

· 论 著 ·

2 种方法检测孕妇免疫球蛋白 G 抗-A(B)效价的对比研究

谭兵¹, 李青¹, 杨婷², 刘慧¹, 余泽波^{1△}

(1. 重庆医科大学附属第一医院输血科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016)

摘要:目的 探讨微柱凝胶法和抗人球蛋白试管法检测 O 型孕妇血清免疫球蛋白 G(IgG)抗-A(B)效价的差异及相关性。方法 采用微柱凝胶法和抗人球蛋白试管法同时检测 133 例 O 型孕妇血清 IgG 抗-A(B)水平, 并比较 2 种方法的检测结果。结果 2 种检测方法结果呈高度相关。若以凝集强度 1+ 为判定终点, 微柱凝胶法比抗人球蛋白试管法检测结果高出 2 个稀释倍数; 微柱凝胶法以 256 作为临床参考值, 试管法以 64 作为临床参考值, 2 种方法阳性检出率差异无统计学意义($P > 0.05$)。若微柱凝胶法以凝集强度 3+ 为判定终点, 试管法以 1+ 为判定终点, 2 种方法检测结果差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 2 种检测方法的一致性较好, 微柱凝胶法的灵敏度高于抗人球蛋白试管法。若以凝集强度 1+ 为判定终点, 推荐微柱凝胶法正常参考值为小于 256; 若以凝集强度 3+ 为判定终点正常参考值为小于 64。

关键词:微柱凝胶法; 抗人球蛋白试管法; 免疫球蛋白 G 抗体效价; 新生儿溶血病

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.04.014 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)04-0492-03

Comparison of 2 methods for detection of anti-A(B) titer of IgG in pregnant women

TAN Bing¹, LI Qing¹, YANG Ting², LIU Hui¹, YU Zebo^{1△}

(1. Department of Transfusion, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. College of Laboratory of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To compare a microcolumn gel test(MG) and the conventional tube test(CTT) for IgG anti-A(B) titer in serum of pregnant woman with blood type O, and to investigate the reference value of IgG anti-A(B) titer in serum of pregnant woman with blood type O by MG. **Methods** The titers of antibody in ABO blood in 133 cases of group O pregnant woman blood specimens were measured simultaneously used MG and CTT, and then made an comparative analysis on the test results. **Results** The anti-A(B) titer results determined by MG and CTT were positively correlated. On average, two titers higher was found with MG that gives a 1+ reaction is referred to as the titer than CTT. No statistically significant difference in the positive rate was found between MG with titers of 256 as the critical value and CTT with titers of 64 as the critical value($P > 0.05$). No statistically significant difference result was found between MG that gives a 3+ agglutination is referred to as judgment criteria and CTT that gives a 1+ agglutination is referred to as judgment criteria($P > 0.05$). **Conclusion** The two detection methods were in good consistency. The MG was more sensitive than CTT. In addition, the normal reference value of MG suggested by this study should be less than 256. Or the normal reference value was still less than 64, if 3+ agglutination is referred to as judgment criteria for MG.

Key words: microcolumn gel card test; conventional tube test; IgG antibody titer; hemolytic disease of newborn

新生儿溶血病(HDN)是指母胎血型不合所致的胎儿或新生儿的一种免疫性溶血性疾病。我国 HDN 大部分是由 ABO 血型不合引起, 轻者导致新生儿出现贫血、水肿、肝脾肿大, 严重者造成新生儿发生核黄疸或病死^[1]。由 ABO 血型不合引起 HDN 发病程度与母体内免疫球蛋白 G(IgG)抗-A(B)效价密切相关, 发病率随母体抗-A(B)效价的升高而增加^[2]。因此, 用准确的方法定期检测孕妇血清 IgG 抗-A(B)效价是预防 HDN 的重要环节。目前, 孕妇血清 IgG 抗-A(B)效价的临床参考值是以试管法为基础而建立, 该法操作繁琐, 主观性强^[3]。近年来, 微柱凝胶法因其快速、简便、稳定、结果直观等优点得到广泛应用, 但其检测的灵敏度和判断标准等方面与传统的试管法差异尚有待评价。现采用微柱凝胶法和抗人球蛋白试管法同时检测 O 型血孕妇血清 IgG 抗-A(B)抗体效价, 并进行对比, 探讨微柱凝胶法检测孕妇血清 IgG 抗-A(B)抗体的适用临床参考值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 3—4 月在重庆医科大学附属第一医院产科门诊就诊的 O 型血孕妇, 共 133 例, 其配偶均非 O 型血者。年龄 21—43 岁, 其中配偶为 A 型血者 67 例, B 型血

者 47 例, AB 型血者 19 例。

1.2 仪器与试剂 微柱凝胶抗人球蛋白卡, 由西班牙 Diagnostic Grifols, S. A 公司提供; 单特异性抗人球蛋白试剂由荷兰 Sanquin 公司提供; A、B 型红细胞悬液由江阴力博医药生物技术有限公司提供; 2-巯基乙醇(2-Me)应用液由本实验室自制。

1.3 方法

1.3.1 标本预处理 抽取受检孕妇静脉血 3 mL, 离心(3 000 r/min, 5 min), 分离血清。取孕妇血清 400 μ L 和 400 μ L 2-Me 应用液混合, 放入一次性塑料试管中, 加塞密封, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 以充分破坏血清 IgM 抗体。取小试管 10 支, 分别加入生理盐水 200 μ L, 然后取用 2-Me 处理过的血清 200 μ L 加入第 1 管, 混匀后从第 1 管中取出 200 μ L 加入到第 2 管中, 依次倍量稀释至第 10 管(第 1~10 管稀释度依次为 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1 024、1:2 048)。

1.3.2 微柱凝胶法检测标本 取抗人球蛋白微柱凝胶卡(一卡 8 孔)1 张, 各孔中加入对应父亲血型的 1% 红细胞悬液 50 μ L(丈夫血型为 AB 型的取 2 张卡, 分别加入 A、B 型 1% 红细胞悬液), 从第 3~10 管对应将稀释血清 25 μ L 加入检测卡孔

后,孵育器孵育 15 min 后专用离心机离心 10 min。结果判断:分别以红细胞凝集强度 1+, 2+, 3+ 为 3 种判断终点(按公司提供的操作说明书进行结果判读),抗体效价为红细胞凝集强度最高稀释倍数的倒数。

1.3.3 抗人球蛋白试管法检测标本 按照《全国临床检验操作规程》^[4] IgG 抗-A(B)测定进行操作。取玻璃试管 10 支,取对应的倍量稀释的血清 100 μL 加入对应的小试管中,加入对应父亲血型的 5% A 或者 B 红细胞悬液 100 μL,置 37 ℃ 水浴 1 h。红细胞未见凝集的试管,以生理盐水洗涤 3 次,除去洗涤液,留取压积红细胞;每管各加生理盐水 2 滴,混合;再每管各取 1 滴,分别移至另 1 排小试管中,再各加最适稀释度抗人球蛋白血清,混合;1 000 r/min 离心 1 min;轻轻摇动试管,观察结果。结果判断:以红细胞凝集强度 1+ 作为判断终点,抗体效价为红细胞凝集强度 1+ 的最高稀释倍数的倒数。

1.4 统计学处理 以某效价为界值的阳性检出率=大于或者等于该界值全部效价检出阳性例数之和/全部检测例数。采用 Excel 进行数据处理分析。抗体效价先做对数转换,进行直线相关性分析;微柱凝胶法与抗人球蛋白试管法效价比较采用配对 *t* 检验;阳性检出率比较使用四格表配对资料 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 种方法检测结果比较 133 例 O 型孕妇的血清标本进行检测,其中 IgG 抗-A 86 例, IgG 抗-B 66 例。微柱凝胶法分别以 1+, 2+, 3+ 为判定终点;试管法以 1+ 为判定终点。见表 1。

表 1 2 种方法检测 IgG 抗-A(B)效价分布 (n)

效价	IgG 抗-A				IgG 抗-B			
	试管法	卡式法	卡式法	卡式法	试管法	卡式法	卡式法	卡式法
	1+	1+	2+	3+	1+	1+	2+	3+
<64	53	16	32	55	46	18	35	46
64	14	16	23	14	13	17	11	14
128	12	23	14	5	4	11	14	3
256	4	14	5	10	2	14	3	2
512	2	5	10	1	1	3	2	1
≥1 024	1	12	2	1	0	3	1	0
合计	86	86	86	86	66	66	66	66

2.2 2 种检测方法的相关性分析 2 种方法均以 1+ 作为判断终点,微柱凝胶法检测 IgG 抗-A(B)效价均高于试管法。微柱凝胶法 IgG 抗-A 效价的几何均数为 143.29,试管法为 37.90,前者比后者高 3.78 倍;2 种方法的检测结果具有相关性($r=0.941, P < 0.01$),回归方程式为 $Y=0.971X+0.622$ 。微柱凝胶法 IgG 抗-B 效价的几何均数为 90.50,试管法为 23.35,前者比后者高 3.87 倍;2 种方法的检测结果具有相关性($r=0.961, P < 0.01$),回归方程式为 $Y=1.015X+0.567$,见图 1、2。

2.3 微柱凝胶法不同判定终点与试管法的比较

2.3.1 微柱凝胶法以 1+ 作为判断终点,检测标本 IgG 抗-A 效价 2 种方法的检测结果差异有统计学意义($t=31.57, P < 0.05$);若微柱凝胶法以 2+ 作为判断终点,2 种方法的检测结果差异有统计学意义($t=15.20, P < 0.05$);微柱凝胶法以 3+ 作为判断终点,差异无统计学意义($t=1.18, P > 0.05$)。见表 2。

2.3.2 微柱凝胶法以 1+ 作为判断终点,检测标本 IgG 抗-B

效价,2 种方法的检测结果差异有统计学意义($t=32.69, P < 0.05$);微柱凝胶法以 2+ 作为判断终点,差异有统计学意义($t=16.09, P < 0.05$);微柱凝胶法以 3+ 作为判断终点,差异无统计学意义($t=0.50, P > 0.05$)。见表 2。

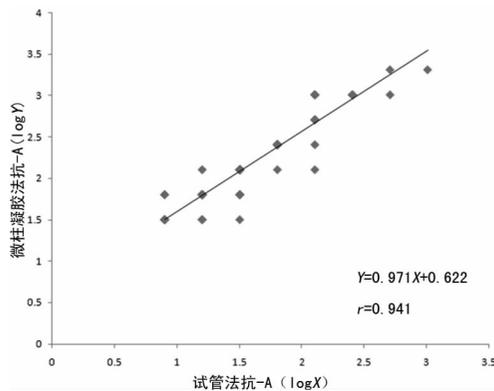


图 1 2 种方法检测 IgG 抗-A 的相关性

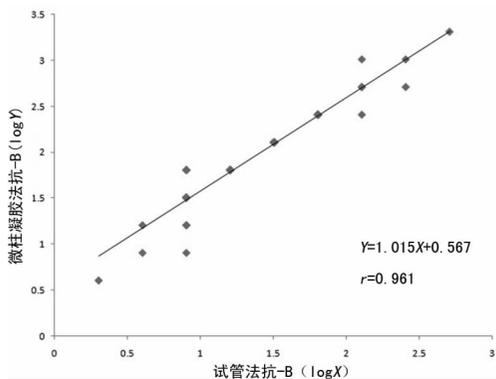


图 2 2 种方法检测 IgG 抗-B 的相关性

表 2 微柱凝胶法不同判定终点与试管法的检测结果比较

项目	IgG 抗-A 效价				IgG 抗-B 效价			
	试管法	卡式法	卡式法	卡式法	试管法	卡式法	卡式法	卡式法
	1+	1+	2+	3+	1+	1+	2+	3+
几何均数	37.90	143.29	71.64	36.11	23.35	90.50	45.25	22.86
<i>t</i>		31.57	15.20	1.18		32.69	16.09	0.50

2.4 相同判定终点不同临床参考值的阳性率结果比较 2 种方法均以 1+ 作为判断终点,试管法以 64 作为临床参考值,微柱凝胶法分别以 64、128、256 作为临床参考值。试管法 IgG 抗-A 阳性检出率为 38.37%, IgG 抗-B 阳性检出率为 30.30%。见表 3。

2.4.1 IgG 抗-A 效价测定,若微柱凝胶法以 64 作为临床参考值,2 种方法的阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=35.04, P < 0.05$);若微柱凝胶法以 128 作为临床参考值,2 种方法阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=19.05, P < 0.05$);若微柱凝胶法以 256 作为临床参考值,2 种方法阳性检出率差异无统计学意义($\chi^2=1.5, P > 0.05$)。见表 3。

2.4.2 IgG 抗-B 效价测定,若微柱凝胶法以 64 作为临床参考值,2 种方法的阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=26.04, P < 0.05$);若微柱凝胶法以 128 作为临床参考值,2 种方法的阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=9.09, P < 0.05$);若微柱凝胶法以 256 作为临床参考值,2 种方法阳性检出率差异无统计学意义($\chi^2=0, P > 0.05$)。见表 3。

表 3 2 种方法检测 IgG 抗-A(B)效价阳性检出率

项目	IgG 抗-A 效价				IgG 抗-B 效价			
	试管法 64	卡式法 64	卡式法 128	卡式法 256	试管法 64	卡式法 64	卡式法 128	卡式法 256
阳性例数(n)	33	70	54	31	20	48	31	20
阳性率(%)	38.37	81.40	62.79	36.04	30.30	72.72	46.97	30.30
χ^2		35.04	19.05	0.5		26.04	9.09	0

3 讨 论

母婴血型不合可引起 HDN, 溶血结果可致胎儿及新生儿贫血及高胆红素血症。早期严重的高胆红素血症可造成核黄疸, 导致新生儿听力丧失、脑性瘫痪、智力发育障碍等后遗症, 给社会及家庭带来沉重负担。与 HDN 相关的血型抗原超过 50 种以上, 其中以 ABO 血型抗原最为常见。

产前测定孕妇血清免疫性抗体效价是预测母婴血型不合、HDN 发生及程度的重要依据之一。有研究表明 A 或 B 型人血清中的血型抗体主要为 IgM, IgG 抗体含量极少, 然而 O 型个体血清中不仅含有 IgM 抗体, 还有一定的 IgG 抗体, IgG 抗-A(B)抗体因相对分子质量较小而能通过胎盘破坏非 O 型胎儿的红细胞, 引起新生儿溶血^[5]。所以, 夫妻间血型不合的 O 型孕妇应定期进行产前 IgG 抗体效价检测, 对抗体效价异常增高者应定期进行妊娠期干预治疗以预防和减少新生儿溶血病的发生。

检测孕妇血清 IgG 抗-A(B)效价的方法有传统的间接抗人球蛋白试管法、微柱亲和试验、微柱凝胶法、表面胞浆质共振等。其中最常用的方法为传统的试管法和凝胶微柱分析。试管法是在盐水介质中凝集, 采用“轻轻摇动试管, 观察结果”的方式来判断结果, 是检测孕妇血清 IgG 抗-A(B)效价的经典方法和推荐方法^[3]。但该方法由于主观判断性强, 判定结果不好控制, 易产生假阴性, 操作步骤多且复杂耗时较长, 重复性差等原因, 不适合用于大批量标本检测。Lapierre 等^[6]报道检测红细胞抗原抗体反应的一种新方法——微柱凝胶试验, 该方法是在微柱凝胶介质中通过凝胶分子筛作用, 利用离心力将抗原抗体反应后的凝集红细胞与未凝集红细胞通过凝胶间隙到达凝胶柱底部所形成的不同分布判断结果。以微柱凝胶试验为基础建立的微柱凝胶法具有操作简便、耗时较短、结果易判断和可较长时间保存等优点。近年来, 凝胶微柱法在国内外输血界已逐渐作为常规应用。

鉴于凝胶微柱法在检测红细胞抗体效价时比试管法具有更高的灵敏度^[7]。研究者认为各实验室应在试验基础上确立微柱凝胶法相应的参考值, 以避免灵敏度过高对正确分析病情造成干扰^[8]。目前微柱凝胶法检测孕妇血清 IgG 抗-A(B)效价, 其临床参考值无统一标准, 已有的研究报道观点不尽相同^[9]。为确立微柱凝胶法检测 IgG 抗-A(B)效价的临床参考值, 本研究使用传统试管法和微柱凝胶法平行测定 133 例孕妇标本 IgG 抗-A(B)效价, 结果显示微柱凝胶法灵敏度高于试管法, 2 种方法检测 IgG 抗-A(B)具有高度的相关性。微柱凝胶法参考值的确定, 本研究采用 2 种模式, 其一是以红细胞凝集强度 1+ 为判定终点, 微柱凝胶法分别以 64、128、256 作为临床参考值与试管法进行比较, 结果显示微柱凝胶法以 256 作为 IgG 抗-A(B)效价的临床参考值, 2 种方法阳性检出率差异无统计学意义($P>0.05$), 与刘燕等^[10]研究一致, 与参考值设为 128 存在差异, 可能与使用不同厂家的产品和试验方法等原因

有关。其二固定临床参考值为 64, 微柱凝胶法以不同凝集强度(1+、2+、3+)为判定终点与试管法进行比较, 结果显示当微柱凝胶法以红细胞凝集强度 3+ 为判断终点时, 2 种方法检测 IgG 抗-A(B)效价的结果差异无统计学意义($P>0.05$), 即 2 种方法检测结果相同。

综上所述, 由于微柱凝胶法在检测红细胞抗体效价时比试管法具有更高的灵敏度, 且不同实验室使用的微柱凝胶产品不同, 因此各实验室需建立微柱凝胶法检测 IgG 抗-A(B)的参考值。通过本研究结果表明, 微柱凝胶法检测孕妇 IgG 抗-A(B)效价临床参考值的设定有 2 种参考意见, 第一, 若以红细胞凝集强度 1+ 作为判定终点, 临床参考值应设为 256; 第二, 若仍以 64 作为临床参考值, 则应该将红细胞凝集强度 3+ 作为微柱凝胶法的判断标准。

参考文献

- [1] 王卫平. 儿科学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 123-124.
- [2] 梁延连, 苏宇清, 喻琼, 等. 深圳地区妊娠期孕妇血清 IgG 抗体效价与产后 HDN 的相关性[J]. 临床输血与检验, 2010, 12(1): 43-45.
- [3] 中国医师协会输血科医师分会. 新生儿溶血病(HDN)免疫血液学试验推荐方案[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(2): 95-100.
- [4] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜, 等. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 257-258.
- [5] 孙晓春, 龚道元. 临床输血检验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 15.
- [6] Lapierre Y, Rigal D, Adam J, et al. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions [J]. Transfusion, 1990, 30(2): 109-113.
- [7] Novaretti MC, Jens E, Pagliarini T, et al. Comparison of conventional tube test with diamed gel microcolumn assay for anti-D titration[J]. Clin Lab Haematol, 2003, 25(5): 311-315.
- [8] 高小华, 胡永红, 陈小洁. 两种方法检测孕妇产前血清中 ABO 血型 IgG 抗体效价的结果分析[J]. 广州医药, 2010, 41(6): 48-49.
- [9] 何烁晴, 韩君儒. 微柱凝胶法在孕妇 IgG 抗体效价检测中的临床应用[J]. 中外医学研究, 2010, 8(22): 73.
- [10] 刘燕, 郭一星. 微柱凝胶法和试管法检测孕妇 IgG 血型抗体效价分析[J]. 中国计划生育学杂志, 2013, 21(7): 464-465.