

新生儿 ABO 溶血病微柱凝集法 放散试验中放散液剂量优化研究*

屈柯暄¹, 周丽华², 王淑霞¹, 吕孟兴¹

(1. 昆明市儿童医院输血科, 昆明 650228; 2. 昆明市妇幼保健院检验科, 昆明 650031)

摘要:目的 比较不同剂量放散液在 ABO 溶血病微柱凝集法放散试验中阳性检出率的差异, 得到最佳放散液剂量。方法 收集 2018 年 1~9 月, 临床诊断符合 ABO 溶血病的新生儿血液标本, 采用微柱凝集法, 根据微柱凝集卡反应腔容量, 选取低、中、高三种剂量的放散液进行平行试验。结果 微柱凝集法放散试验中不同剂量放散液(25 μ l 组, 50 μ l 组, 100 μ l 组)的阳性检出率分别为 82.09%, 82.77% 和 99.55%; 25 μ l 与 50 μ l 两组间阳性检出率比较, $\chi^2=0.0313$, $P>0.05$, 差异无统计学意义。100 μ l 组与 25 μ l 和 50 μ l 两组间阳性检出率比较, 差异均有统计学显著性意义($\chi^2=78.5196$, 74.9486 , 均 $P<0.001$), 故 100 μ l 放散液组阳性检出率最佳。结论 在 ABO 溶血病微柱凝集法放散试验中, 推荐使用 100 μ l 剂量放散液, 以提高放散试验阳性检出率。

关键词:新生儿 ABO 溶血病; 微柱凝集法; 放散试验; 放散液剂量; 阳性检出率

中图分类号: R722.18; R457.1 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)03-121-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.03.030

Study on Different Doses of Diffuser in Serological Test of ABO-Hemolytic Disease of Newborns

QU Ke-xuan¹, ZHOU Li-hua², WANG Shu-xia¹, LÜ Meng-xing¹ (1. Department of Blood

Transfusion, Kunming Children's Hospital, Kunming 650228, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Kunming Maternal and Child Health Care Hospital, Kunming 650031, China)

Abstract: Objective To compare the difference of positive detection rate of different doses of radiation solution in neonatal hemolytic disease serological test, and obtain the best dosage of radiation solution in erythrocyte antibody dispersal test.

Methods From January 2018 to September 2018, neonates with jaundice or hyperbilirubinemia, incompatibility of maternal and infant blood groups, and clinical symptoms conforming to ABO-hemolysis were collected. Microcolumn agglutination method was used to test erythrocyte antibody diffusion in neonates with ABO-hemolytic disease. Three doses of low, medium and high were selected and administered respectively. Parallel experiments were conducted and the results were analyzed statistically. **Results** Among 441 cases clinically diagnosed as ABO-hemolytic disease of newborn, the positive detection rates of different doses of radiation solution (25 μ l, 50 μ l and 100 μ l groups) were 82.09%, 82.77% and 99.55%. There was no significant difference between 25 μ l and 50 μ l groups ($\chi^2=0.0313$, $P>0.05$). The positive detection rates of 100 μ l group and other dosage groups were significantly different ($\chi^2=78.5196$, 74.9486 , all $P<0.001$), and the positive detection rate of 100 μ l radiation solution was the highest. **Conclusion** In the erythrocyte antibody diffusion test of ABO-hemolytic disease in neonates (microcolumn agglutination method), 100 μ l dose of radiation solution is recommended to improve the positive detection rate of hemolytic disease in neonates.

Keywords: ABO hemolytic disease of the newborns; microcolumn agglutination test; the erythrocyte antibody diffusion test; different doses of diffuser; positive detection rate

新生儿溶血病(hemolytic disease of the newborns, HDN)主要是指母婴血型不合引起的新生儿同种免疫性溶血性疾病, 在我国以母婴 ABO 血型不合导致的 ABO 溶血病(ABO-HDN)最多见。该病的诊断主要依靠血型血清学检查, 放散试验阳性是确诊新生儿溶血病最重要的依据^[1-2]。由于新生儿血液的特点(血型抗原表达数量少及发育不完

全, 血浆抗体效价低等), 在日常工作中放散试验往往出现较弱的阳性结果, 与患儿临床症状不相符; 部分患者临床症状符合新生儿溶血病, 或按照新生儿溶血病治疗效果良好, 放散试验结果却为阴性, 给临床早期诊治带来极大困扰。为提高放散试验的阳性检出率, 为临床早诊断早治疗提供实验室依据, 降低 ABO-HDN 对新生儿造成的损害, 我们采

* 基金项目: 昆明市科学技术局社会科技发展重点项目, 项目编号 2017-1-S-14363。

作者简介: 屈柯暄(1983—), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事输血免疫学研究, E-mail: qukexuan@etyy.cn。

通讯作者: 吕孟兴(1977—), 男, 硕士, 副主任医师, 临床输血, E-mail: lvmengxing@etyy.cn。

用目前敏感度高、特异度强的微柱凝集法 (micro-column gel test, MGT) 对临床诊断为 ABO-HDN 的新生儿血液标本进行检测, 根据微柱凝集卡反应腔容量, 每个血标本同时选择三种不同剂量的放散液进行平行试验, 现将结果报道如下:

1 材料与方法

1.1 研究对象 2018 年 1~9 月, 以黄疸或高胆红素血症收入三级甲等儿童医院的新生儿患者 869 例, 排除母亲和新生儿血型相同的病例 257 例; 排除不规则抗体引起的新生儿 HDN 患者 5 例; 排除其它原因 (感染、窒息、母乳性黄疸等) 引起的高胆红素血症的患儿 166 例, 最终选取母婴 ABO 血型不合、出生后 24 h 内出现黄疸或高胆红素血症并迅速发展, 按照 ABO-HDN 治疗效果好的新生儿 441 例, 采集患儿 EDTA 抗凝血标本 3 ml 备用。新生儿高胆红素血症诊断参考文献[3]; HDN 诊断标准参考文献[4]。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂耗材: ABO 血型反定型试剂盒 (人血红细胞)、不规则抗体检测试剂 (人血红细胞)、低离子强度盐溶液、ABO, RhD 血型定型检测卡 (单克隆抗体)、ABO, RhD 血型检测卡 (微柱凝集)、抗人球蛋白检测卡 (不规则抗体筛检), 以上试剂均由长春博迅生物技术有限责任公司提供; 昆明南疆制药 0.9 g/dl 氯化钠注射液; 泰州科健医疗用品有限公

司 12 * 100mm 玻璃试管; 泰州为尔康医疗用品有限公司 2 ml 一次性塑料吸管。

1.2.2 仪器设备: 长春博研科学仪器有限公司 TD-3A 型血型血清学用离心机、FYQ 型免疫微柱孵育器; 安徽中科中佳科学仪器有限公司 LC-10C 低速离心机; 日本 Kubota 公司 KA-2200 血型血清学专用离心机; 上海跃进医疗器械有限公司 HH-W21-600S 型电热恒温水浴箱; Eppendorf 移液器。

1.3 方法 纳入研究的 441 例新生儿血液标本, 均采用微柱凝集法进行放散试验, 试验操作参照《输血技术操作规程 (输血科部分)》^[5] 及试剂盒说明书。根据微柱凝集卡反应腔容量 (约 200 μ l), 每个血标本均同时选择低 (25 μ l), 中 (50 μ l), 高 (100 μ l) 三种剂量的放散液进行平行试验, 操作步骤: ①取微柱凝集抗人球蛋白检测卡一张, 做好 25, 50, 100 μ l 标记。用低离子强度盐溶液将 ABO 血型反定型试剂盒 (人血红细胞) 配成 0.8 ml/dl~1 ml/dl 浓度, 分别加入微管中, 各 50 μ l。②按标记剂量逐一加入制备好的放散液, 最后一管加入末次洗涤液 50 μ l。③置 37℃ 免疫微柱孵育器, 孵育 15 min。TD-A 型血型血清学专用离心机离心 5 min, 取出, 观察结果。④凝集强度判定同检测卡操作说明书结果解释部分, 见图 1。⑤放散试验结果判读^[6]参照表 1。

表 1

放散试验结果判读

与 ABO 血型反定型试剂盒 (人血红细胞) 的反应			结果判读
A 细胞	B 细胞	O 细胞	
+	-	-	放散液中检出 IgG 抗-A 抗体 (确诊 ABO-HDN)
-	+	-	放散液中检出 IgG 抗-B 抗体 (确诊 ABO-HDN)
+	+	-	放散液中检出 IgG 抗-A、抗-B 或抗-AB 抗体 (确诊 ABO-HDN)
-/+	-/+	+	放散液中检出非 ABO 系统抗体或同时存在 ABO 系统抗体
-	-	-	放散液中未检出抗体

注: “+”代表阳性, 包括凝集强度为 \pm , 1+, 2+, 3+, 4+ 的凝集; “-”代表阴性。

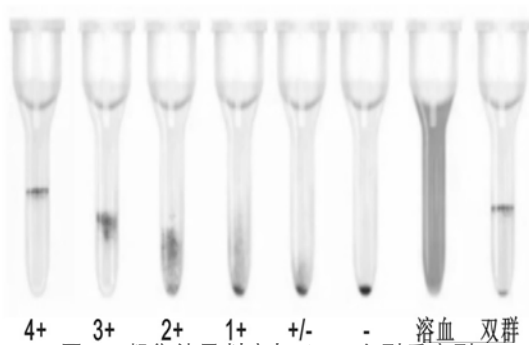


图 1 凝集结果判定与 ABO 血型反定型

将试验结果按照三种剂量分为 25 μ l 组, 50 μ l 组和 100 μ l 组。计算三组实验结果的阳性百分

率。

1.4 统计学分析 采用 SPSS17.0 软件对数据进行处理, 收集的三种剂量试验结果属于计数资料, 用百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 当 $P < 0.05$ 表示阳性检出率差异有统计学意义, 当 $P < 0.001$ 表示阳性检出率差异有统计学显著性意义, 比较三种剂量放散液阳性检出率, 得到最佳放散液剂量。

2 结果

2.1 2018 年 1~9 月纳入研究的新生儿基本情况统计 见表 2。

表2 研究对象基本情况

项 目	分 类	百分率[n(%)]
研究对象	排除血型相同 257 例, 排除不规则抗体溶血 5 例, 排除其它原因引起高胆红素血症 166 例, 最终入选的新生儿 441 例。	441(100)
性 别	男	247(56.0)
	女	194(44.0)
日 龄(天)	<1 天	4(1.0)
	1~3 天	139(31.5)
	4~6 天	146(33.1)
	7~10 天	91(20.6)
	>10 天	61(13.8)
母婴血型组合	母亲 O 型、新生儿 A 型	255(57.8)
	母亲 O 型、新生儿 B 型	186(42.2)
总胆红素水平 μmol/L	0~100	1(0.2)
	101~200	14(3.2)
	201~300	147(33.3)
	301~400	187(42.4)
	≥401	92(20.9)

2.2 不同剂量放散液阳性检出率的比较 见表3。在临床诊断为 ABO-HDN 的 441 例新生儿血液标本中, 三种剂量放散液阳性检出率为 82.09%, 82.77% 和 99.55%。25 μl 和 50 μl 两组阳性检出率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 25 μl 和 100 μl 两组阳性检出率比较差异有统计学显著性意义 ($P<0.001$); 50 μl 和 100 μl 两组阳性检出率比较差异有统计学显著性意义 ($P<0.001$)。

表3 不同剂量放散液阳性检出率比较

放散液 剂量	检测结果(n)		阳性检 出率(%)	χ^2	P
	-	+(±4+)			
25 μl 组	79	362	82.09	0.031 3 ^a	>0.05 ^a
50 μl 组	76	365	82.77	74.948 6 ^b	<0.001 ^b
100 μl 组	2	439	99.55	78.519 6 ^c	<0.001 ^c

注:^a代表 25 μl 组和 50 μl 组比较;^b代表 50 μl 组和 100 μl 组比较;^c代表 25 μl 组和 100 μl 组比较。

3 讨论 ABO-HDN 是儿科最常见的急性溶血性疾病, 引起的高胆红素血症一般在出生后 24 h 内出现并迅速发展, 引起胆红素脑病或继发性核黄疸, 对新生儿造成永久性神经系统发育损伤, 由此可见 ABO-HDN 引起的潜在危险性不容忽视^[1,7-8]。但是由于新生儿血液特点(血型抗原表达数量少及发育不完全, 血浆抗体效价低等), 同时溶血性抗体随疾病进展而逐渐消耗等原因, 可能造成确诊疾病的放散试验出现假阴性结果, 给临床早期诊断带来困扰。

本研究收集三级甲等儿童医院近 10 个月的黄疸或高胆红素血症新生儿病例资料 869 例, 通过排除法, 最终得到符合研究条件的新生儿 441 例。在统计病例资料时, 我们发现 64.6% 的新生儿在 1~6 天的日龄范围内出现明显的黄疸或高胆红素血症等临床症状; 有 75.7% 的新生儿静脉血胆红素值在 201~400 μmol/L 的较高水平, 说明 ABO-HDN 疾病进展快, 胆红素水平高, 容易引起胆红素脑病或继发性核黄疸, 严重危害新生儿健康。因此, 对 ABO-HDN 放散试验进行优化研究有重要临床意义。

有文献报道, 增加放散液的剂量, 可以提高放散试验的阳性检出率, 放散液增加到 75 μl 时, 阳性检出率提高到 73.19%^[9]。国内外文献报道微柱凝集法进行新生儿溶血病血清学检测试验, 敏感度高, 特异度强, 有助于提高新生儿溶血病的阳性检出率^[10-12]。为了提高 ABO-HDN 放散试验的阳性检出率, 我们选择美国血库协会^[13]、英国血液标准化委员会推荐的, 有助于提高新生儿溶血病阳性检出率的微柱凝胶抗人球蛋白法(MGT)方法进行放散试验的优化研究。根据微柱凝集卡反应腔的容量(约 200 μl), 设计低、中、高三种剂量放散液进行平行试验, 结果显示: 在临床诊断为 ABO-HDN 的 441 例患儿中, 25 μl 放散液组有 79 例结果表现为假阴性、未被检出; 50 μl 放散液组有 76 例结果表现为假阴性、未被检出; 而 100 μl 放散液组只有 2 例结果表现为假阴性、未被检出。将 3 个剂量组阳性检出率进行统计分析, 我们发现 100 μl 组阳性检出率明显高于其它剂量组, 检验效果最佳。其次, 在研究中我们发现增大放散液剂量能有效增强凝集强度。当 25 μl 和 50 μl 放散液组试验结果阳性时, 凝集强度较弱, 多为 ±, 1+, 2+; 使用 100 μl 剂量放散液时, 凝集强度较强, 多为 3+ 至 4+。100 μl 组放散液检测结果为较弱的 1+ 或 ± 时, 25 μl 和 50 μl 组检测结果就会出现假阴性等漏检的情况。我们分析多是因为新生儿血型抗原表达数量少及发育不完全, 其结合的 IgG 类血型抗体少, 经过热放散后放散液中 IgG 抗体效价低导致。

综上所述, 在 ABO-HDN 微柱凝集法放散试验中, 选取 100 μl 剂量放散液, 试验效果好、阳性检出率高、凝集强度大, 能有效提升放散试验临床诊断价值, 为早期 ABO-HDN 诊断提供有力的实验室依据, 减轻溶血病对新生儿造成的严重危害。同时, 为新生儿溶血病血清学检测标准操作程序的制定提供参考依据。

参考文献:

(下转 127 页)

- [1] 李君,侯金友,张慧,等. 临床实验室早期诊断 ABO-HDN 三种增强试验应用比较研究[J]. 现代检验医学杂志,2018,33(3):133-135.
LI Jun,HOU Jinyou,ZHANG Hui,et al. Comparative study on the three enhanced tests for early diagnosis of ABO-HDN in clinical laboratory[J]. J Mod Lab Med,2018,33(3):133-135.
- [2] 黄志稳,李金花. 三项试验在新生儿溶血病诊治中的应用价值[J]. 吉林医学,2016,37(10):2436-2438.
HUANG Zhiwen, LI Jinhua. Application value of three tests in the diagnosis and treatment of hemolytic disease of newborn[J]. Jilin Medicine,2016,37(10):2436-2438.
- [3] 杨锡强,易著文. 儿科学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社,2005:134-136.
YANG Xiqiang, YI Zhuwen. Pediatrics[M]. 8th Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005:134-136.
- [4] 桂永浩,申昆玲,毛萌,等. 小儿内科学高级教程[M]. 北京:人民军医出版社,2014:81-84.
GUI Yonghao, SHEN Kunling, MAO Meng, et al. Pediatric internal medicine advanced course[M]. Beijing: People's Military Medical Publishing House, 2014:81-84.
- [5] 汪德清. 输血技术操作规程(输血科部分)[M]. 北京:人民卫生出版社,2016.
WANG Deqing. Operating procedures for blood transfusion technology[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2016.
- [6] 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.
Department of Blood Transfusion Physicians, Chinese Medical Association. Recommended scheme for immunohematology test of neonatal hemolytic disease (HDN) [J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2012,25(2):95-100.
- [7] BHAT Y R, KUMAR C G. Morbidity of ABO haemolytic disease in the newborn[J]. Paediatr Int Child Health,2012,32(2):93-96.
- [8] 张钦辉. 临床输血学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2000:97-105.
ZHANG Qinhui. Clinical blood transfusion[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2000:97-105.
- [9] 曾德理,石明芳. 3 种不同剂量放散液检测新生儿 ABO 溶血病的结果分析[J]. 广西医学,2011,33(11):1447-1448.
ZENG Deli, SHI Mingfang. Analysis on results of detecting ABO hemolytic disease of newborns with 3 different doses of diffuse fluids [J]. Guangxi Medicine, 2011,33(11):1447-1448.
- [10] 朱梅,陶存武,张循善,等. 微柱凝集技术在新生儿 ABO 溶血病检测中的应用[J]. 临床输血与检验,2013,15(3):224-227.
ZHU Mei, TAO Cunwu, ZHANG Xunshan, et al. Application of microcolumn gel technique in detection of newborn ABO hemolytic disease[J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2013,15(3):224-227.
- [11] 梁慧晶,蔡葵,徐杰伟. 124 例新生儿溶血病实验室检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2015,30(20):3052-3053.
LIANG Huijing, CAI Kui, XU Jiewei. Analysis of laboratory results of 124 cases of hemolytic disease of newborns [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2015,30(20):3052-3053.
- [12] 施顺秋,张英. 微柱凝胶试验在新生儿溶血病检测中的应用[J]. 现代检验医学杂志,2003,18(3):35.
SHI Shunqiu, ZHANG Ying. Application of microcolumn gel test in the detection of hemolytic disease of newborn[J]. J Mod Lab Med, 2003,18(3):35.
- [13] FUNG M K, GROSSMAN B J, HILLYER C D, et al. Technical manual[M]. 18th Ed. Bethesda: AABB Press, 2014:291-315.

收稿日期:2019-03-07

修回日期:2019-03-26