

# 微柱凝胶法 甘氨酸/EDTA 放散试验检测 新生儿溶血病 277 例

黎海澜, 焦伟, 黎英兰, 莫柱宁, 阳子骥, 李保才

基金项目: 广西卫计委科研课题(编号:Z2012304)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院输血科(黎海澜,焦伟,黎英兰,莫柱宁,阳子骥); 530100 广西,武鸣县人民医院输血科(李保才)

作者简介: 黎海澜(1969-),女,大学本科,医学学士,副主任技师,研究方向:输血医学、免疫血液学。E-mail:1041413019@qq.com

通讯作者: 李保才(1963-),男,大学本科,医学学士,副主任技师,研究方向:输血医学、检验医学。E-mail:1059967447@qq.com

**[摘要]** 目的 评价联合应用微柱凝胶法和甘氨酸/EDTA 放散试验进行诊断母婴血型不合新生儿溶血病(HDN)的临床价值。方法 对355例疑为母婴血型不合 HDN 的黄疸患儿血标本联合应用微柱凝胶法和甘氨酸/EDTA 放散试验检测。结果 确诊为母婴血型不合 HDN 277 例(HDN 的阳性检出率为 78.03%),其中 Rh-HDN 2 例(0.72%),ABO-HDN 275 例(99.28%)。ABO-HDN 275 例中,母婴血型为 O/A 的占 48.73%,O/B 的占 51.27%,B/AB 和 A/AB 组合均为 0 例。在出生时间  $2\text{ h} \leq n \leq 3\text{ d}$ 、 $3\text{ d} < n \leq 5\text{ d}$ 、 $5\text{ d} < n \leq 7\text{ d}$ 、 $7\text{ d} < n \leq 13\text{ d}$  的黄疸儿中,HDN 检出率分别为 86.10%、73.02%、31.58%、14.29%。结论 联合应用微柱凝胶法和甘氨酸/EDTA 放散试验检测 HDN,能够准确、及时地为临床诊治提供依据,值得推广。

**[关键词]** 母婴血型不合; 新生儿溶血病; 微柱凝胶法; 甘氨酸/EDTA 放散试验; 高胆红素血症

**[中图分类号]** R 722.18 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2015)04-0308-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.04.05

**Combined application of micro-gel method and glycine/EDTA diffuse method in the detection of hemolytic disease of the newborn: report of 277 cases** Li Hai-lan, JIAO Wei, LI Ying-lan, et al. Department of Transfusion, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the clinical value of combined application of micro-gel method and glycine/EDTA diffuse method in the diagnosis of hemolytic disease of the newborn(HDN) caused by maternal-fetal blood type incompatibility. **Methods** Micro-gel method and glycine/EDTA diffuse method were jointly used to detect 355 blood samples from newborn with suspected HDN caused by maternal-fetal blood type incompatibility. **Results** HDN caused by maternal-fetal blood type incompatibility was diagnosed in 277 cases, the positive rate was 78.03%, of which Rh-HDN was detected in 2 cases(0.72%), ABO-HDN in 275 cases(99.28%). In 275 cases of ABO-HDN, mother and baby were both blood type O/A accounted for 48.73%, O/B accounted for 51.27%, no B/AB and A/AB blood type. For these newborn with jaundice between  $2\text{ h} \leq n \leq 3\text{ d}$ ,  $3\text{ d} < n \leq 5\text{ d}$ ,  $5\text{ d} < n \leq 7\text{ d}$ ,  $7\text{ d} < n \leq 13\text{ d}$  after birth. HDN positive detection rates were 86.10%, 73.02%, 31.58%, 14.29%, respectively. **Conclusion** Joint application of micro-gel method and glycine / EDTA diffuse method in the detection of HDN, can accurately and timely provide the basis for clinical diagnosis and treatment.

**[Key words]** Maternal-fetal blood type incompatibility; Hemolytic disease of the newborn; Micro-gel method; Glycine/EDTA diffuse method; Hyperbilirubinemia

母婴血型不合新生儿溶血病(hemolytic disease of the newborn, HDN)是母体血液中针对胎儿红细胞的免疫抗体 IgG 通过胎盘进入胎儿循环,发生同种免疫而引起的溶血。HDN 临床表现为不同程度

黄疸、贫血、水肿、肝脾肿大,严重者可发生胆红素脑病(核黄疸),甚至死亡<sup>[1]</sup>,已受临床广泛重视。HDN 诊断依据主要是血型血清学检查即“三项试验”,包括直接抗球蛋白试验(DAT)、游离抗体试验(IAT)

和抗体释放(放散)试验。为评价微柱凝胶法和甘氨酸/EDTA放散试验在HDN血清学检测中的应用价值,及时为临床诊治HDN提供依据,笔者对355例疑似HDN患儿血标本进行血清学检测及分析,现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源及处理** 标本来自2012-01~2014-02本院住院的355例疑似母婴血型不合HDN的黄疸患儿及其母亲血标本,其中男性患儿172例,女性患儿183例。患儿年龄在2h~13d。出生时间 $2\text{h} \leq n \leq 3\text{d}$  259例, $3\text{d} < n \leq 5\text{d}$  63例, $5\text{d} < n \leq 7\text{d}$  19例, $7\text{d} < n \leq 13\text{d}$  14例,临床主要表现为贫血和黄疸,需进行实验室的病因确认者。母亲、新生儿血标本为静脉(必要时脐带血)EDTA.K干粉抗凝血。母亲血标本用于血型鉴定及抗体检测。患儿抗凝血标本经 $1\,000 \times g$ 离心2min,分离血浆及压积红细胞。压积红细胞用生理盐水充分洗涤3次,留取末次洗液作对照。取压积红细胞 $10\ \mu\text{l}$ 配成2%、1%红细胞盐水悬液备用。在试管中加入洗涤好的压积红细胞1ml,待做酸放散试验。

**1.2 试剂** 标准抗-A(B)血清、IgM抗-D、E、C、c、e及抗人球蛋白试剂、谱细胞等均来自上海血液生物医药有限责任公司。筛选细胞购自江阴血液生物医药有限责任公司。ABO标准红细胞为本实验室自制。酸放散试剂盒购自长春博迅生物技术有限公司,放散液A为低pH值的甘氨酸缓冲液,放散液B为乙二胺四乙酸液,中和液为Tris液。DiaMed低离子/抗人球卡、DiaMed卡式专用离心机, DiaMed专用卡孵育系统等均由珠海保瑞达公司提供。其它仪器有KA2200型离心机(日本久保田研究所),恒温水浴箱等。所用试剂均在有效期内。

## 1.3 方法

**1.3.1 血型鉴定和实验方案** 参照临床检验操作规程<sup>[2]</sup>,鉴定患儿及母亲ABO及Rh血型,必要时进行母亲血清抗体检测等。

**1.3.2 直接抗球蛋白试验** 在DiaMed低离子/抗人球凝胶卡(用前离心)中加入患儿1%红细胞悬液 $50\ \mu\text{l}$ ,置卡式离心机 $85 \times g$ 离心10min,观察并记录结果。当直抗阳性强度达到或超过“++”、其母亲血型抗体筛查阳性时,对患儿红细胞抗体放散液及母亲血清用微柱凝胶法进行红细胞血型抗体鉴定。

**1.3.3 游离抗体试验** 微柱凝胶法:按产品说明书操作。DiaMed低离子/抗人球卡(用前离心),分别标记Ac、Bc、Oc,撕开铝箔,按标记分别加入 $50\ \mu\text{l}$

1% A、B、O试剂红细胞悬液,然后每孔加患者血清 $50\ \mu\text{l}$ ,置卡式专用孵育器15min后,立即放入卡式离心机 $85 \times g$ 离心10min,观察记录结果。

**1.3.4 抗体放散试验** 严格按酸放散试剂盒说明书操作。酸放散液配制:将放散液A与放散液B按4:1比例混合均匀(必须现配现用)。将1ml洗涤好的待检压积红细胞与1ml配制好的酸放散液混合均匀,室温孵育1min后,以 $1\,000 \times g$ 离心1min(勿超时),取上清放散液与中和液按 $500\ \mu\text{l}:60 \sim 80\ \mu\text{l}$ 比例混匀,再以 $1\,000 \times g$ 离心2min,取出上清备用。取DiaMed低离子/抗人球卡(用前离心),分别标记AcE、BcE、OcE、对照,撕开铝箔,按标记分别加入 $50\ \mu\text{l}$  1% A、B、O试剂红细胞悬液,然后每孔加放散液 $50\ \mu\text{l}$ ,对照孔加入 $50\ \mu\text{l}$  1%与患儿ABO、Rh同型试剂红细胞悬液,然后加入末次洗液 $50\ \mu\text{l}$ ,置卡式孵育器15min后,立即放入卡式离心机 $85 \times g$ 离心10min,观察记录结果。

**1.4 结果判定** 结果判读按产品说明书,红细胞聚集在凝胶卡凝胶带上部或凝胶中为阳性反应,全部沉淀在凝胶卡底部为阴性反应。直抗试验以出现凝集为阳性,游离和放散试验以检出与新生儿红细胞反应的抗体为阳性。放散试验对照孔只有其中检不出任何抗体才可判定放散试验的准确性。

## 1.5 母婴血型不合新生儿溶血病诊断标准<sup>[3]</sup>

(1)母子血型不合;(2)抗体释放试验或直接抗人球蛋白试验阳性;(3)发生高胆红素血症。母婴ABO血型不合,新生儿血浆和(或)红细胞放散液中检出了可致敏新生儿红细胞的ABO血型抗体者诊断为ABO-HDN。新生儿血浆和(或)红细胞放散液中检出了与母亲血浆相同特异性、并可致敏新生儿红细胞的不规则抗体者(新生儿红细胞表达抗体对应的抗原)诊断为非ABO-HDN。

## 2 结果

**2.1 血型血清学检测结果** 在355例疑为母婴血型不合黄疸患儿中,78例排除了HDN,确诊为母婴血型不合HDN 277例(阳性检出率78.03%)。其中ABO-HDN 275例(99.28%),Rh-HDN 2例(0.72%)。在275例ABO-HDN中,母/婴血型为O/A组合134例(48.73%),O/B组合141例(51.27%),B/AB及A/AB组合0例。355例受检黄疸儿中,放散试验阳性277例(78.03%),IAT阳性165例(46.48%),DAT阳性86例(24.23%);DAT阳性86例、IAT阳性的165例黄疸儿血样抗体释放试验结果全部阳性。2例Rh-HDN三项试验均阳性。见表1。

表1 355例疑为母婴血型不合 HDN 患儿血型血清学检测阳性结果[n(%)]

母婴血型	例数	直接抗球蛋白试验阳性	游离抗体试验阳性	抗体释放试验阳性	HDN
O-A	159	50(31.45)	83(52.20)	134(84.28)	134
O-B	181	34(18.78)	80(44.20)	141(77.90)	141
B-AB	9	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0
A-AB	4	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0
D 阴性-D 阳性	1	1(100.00)	1(100.00)	1(100.00)	1
CCDee-CcDE	1	1(100.00)	1(100.00)	1(100.00)	1
合计	355	86(24.23)	165(46.48)	277(78.03)	277

2.2 三项试验检测结果与 HDN 构成比 在 277 例 HDN 三项试验检测结果中,以抗体释放试验单项阳性最多见,IAT 阳性加抗体释放试验阳性次之,DAT 阳性加抗体释放试验阳性最少见。见表 2。

表2 277例母婴血型不合 HDN 患儿三项试验检测结果[n(%)]

直接抗球蛋白试验	游离抗体试验	抗体释放试验	例数	构成比 (%)
-	-	+	104	37.55
-	+	+	89	32.13
+	+	+	74	26.71
+	-	+	10	3.61

2.3 黄疸患儿中 DAT、IAT 结果与 HDN 的关系

86 例 DAT 阳性黄疸患儿全部被证实为 HDN,而 269 例 DAT 阴性黄疸患儿中只有 191 例(71.0%)被证实为 HDN;165 例 IAT 阳性黄疸患儿全部被证实为 HDN,而 190 例 IAT 阴性黄疸患儿中只有 112 例(58.95%)被证实为 HDN。

2.4 黄疸患儿出生时间与 HDN 的关系 355 例黄疸患儿出生天数与 HDN 的关系见表 3。

表3 355例黄疸患儿出生天数与 HDN 的关系[n(%)]

黄疸儿出生天数	检测例数	证实为 HDN 例数	阳性检出率 (%)
2 h ≤ n ≤ 3 d	259	223	86.10
3 d < n ≤ 5 d	63	46	73.02
5 d < n ≤ 7 d	19	6	31.58
7 d < n ≤ 15 d	14	2	14.29

### 3 讨论

3.1 母婴血型不合 HDN 是引起新生儿病理性黄疸主要原因之一,早期诊断以及防治对患儿的生存质量来说具有十分重要的临床意义<sup>[4]</sup>。本研究对 355

例高胆红素血症患儿联合应用微柱凝胶法、甘氨酸/EDTA 放散试验进行血清学检查,确诊为母婴血型不合 HDN 277 例,及时采用包括光疗在内的综合治疗,必要时予以输血或换血治疗,取得满意疗效。本组高胆红素血症新生儿 HDN 的阳性检出率 78.03%,与文献报道<sup>[5]</sup>近似,而明显高于卢磊等<sup>[6]</sup>报道的 43.9%,这可能是本研究联合应用微柱凝胶法、甘氨酸/EDTA 放散试验进行 HDN 相关血型血清学检测之故,甘氨酸/EDTA 放散试验敏感性、红细胞致敏抗体放散效能优于传统的热放散试验血清学检测方法,结果已在研究中得到证实(另文待发表)。近年来兴起的甘氨酸/EDTA 放散法主要通过甘氨酸/EDTA 处理、解离致敏红细胞上的全部或部分抗体<sup>[7]</sup>,操作简便,且更敏感,结果可靠。微柱凝胶法检测 IgG 抗体具有可操作性强、便捷及结果可靠等优点,已被临床认可。国外实验室已常规应用微柱凝胶法、甘氨酸/EDTA 放散试验进行 HDN 相关血型血清学检测。微柱凝胶法、甘氨酸/EDTA 放散试验检测新生儿溶血病试验条件要求不高,结果稳定可靠、便捷,值得推广。相信在国内实验室也将逐步以之取代传统的试管抗球蛋白法、热放散试验进行 HDN 血清学检测。

3.2 本研究发现,在 277 例 HDN 患儿中,出生时间 2 h ≤ n ≤ 3 d 的患儿 223 例(占 80.51%),明显高于出生时间 3 d < n ≤ 5 d 的患儿 46 例(占 16.61%)、5 d < n ≤ 7 d 的患儿 6 例(占 2.17%)、7 d < n ≤ 13 d 的患儿 2 例(占 0.72%)。出生时间 2 h ≤ n ≤ 3 d、3 d < n ≤ 5 d 黄疸儿 HDN 的检出率分别为 86.10%、73.02%,而 5 d < n ≤ 7 d、7 d < n ≤ 13 d 黄疸患儿 HDN 的检出率分别为 31.58%、14.29%。出生时间 ≤ 5 d 黄疸儿 HDN 的检出率明显高于出生时间 > 5 d 的患儿。结果支持黄疸儿 HDN 的检出与出生时间密切相关的观点<sup>[8,9]</sup>,笔者认为出生时间 ≤ 3 d 是 HDN 就诊进行血清学检测的最佳时间。母婴血型不合 HDN 部分黄疸出现时间在日龄 2 ~ 3 d,与生理性黄疸的出现时间时有重叠,所以临床一旦发现高胆红素血症的新生儿应尽早采用敏感、准确快捷的方法进行血清学检测,以期提高母婴血型不合 HDN 的检出率。这要求产科、儿科医生必须对本病有足够的认识和警惕,及早明确诊断,及时治疗。学者指出,早诊早治 HDN 患儿可有效地控制病情进展并改善血型不合溶血病患儿的预后,能缩短病程这是最为重要的<sup>[10-12]</sup>。另外,本组 14 例出生天数 7 d < n ≤ 13 d 的黄疸儿中,有 2 例被确诊为 HDN(2/14),提示临

床上对出生天数7~13 d黄疸儿血清血学检测、血清胆红素等监测仍然不能松懈,以免延误治疗。

**3.3 人类红细胞血型系统中 ABO 血型不合的 HDN 最为多见,其次为 Rh 血型系统,其他血型系统导致的 HDN 较为少见<sup>[13]</sup>,在 ABO 血型系统 HDN 中,又以母/子血型 O/A 和 O/B 组合的新生儿发生 HDN 最为多见。本组 Rh-HDN 2 例(0.72%),ABO-HDN 275 例(99.28%),其中母婴/血型为 O/A 组合占 48.73%,O/B 组合占 51.27%,B/AB 及 A/AB 组合 0 例,与文献报道一致。笔者认为,对 ABO-HDN 的防治应作为本地区防治 HDN 的重点,但对 Rh-HDN 也不容忽视,本组 2 例 Rh-HDN 病情均较严重,抗 D 引起的 HDN 经及时换血、光照、药物等综合治疗,得以痊愈出院,抗 Ec 引起的 HDN 经光照、药物、输血等治疗康复出院。**

**3.4 文献报道<sup>[14-16]</sup>,HDN 血清学检验结果中,抗体释放试验是判断新生儿红细胞被血型抗体致敏最灵敏、准确的方法,也是判定新生儿溶血病最有力的证据。本研究也证实这一点,在 HDN 三项试验中,抗体释放试验阳性率最高,直接抗球蛋白试验阳性率最低。直接抗球蛋白试验阳性的 86 例、游离抗体试验阳性的 165 例新生儿血样抗体释放试验结果全部阳性。抗体释放试验在检测 HDN 中明显敏感于直接抗球蛋白试验、游离抗体试验。由于抗体释放试验所使用的红细胞比直接抗人球蛋白试验多几百倍,因此有可能达到较高的敏感度,此试验一旦阳性,即可明确诊断。表 2 显示,277 例 HDN 三项试验检测结果中,以抗体释放试验单项阳性最多见(104 例,占 37.55%),IAT 阳性加抗体释放试验阳性次之(32.13%),三项试验均阳性 74 例,DAT 阳性加抗体释放试验阳性最少见,这些与 HDN 患儿病情严重程度及预后有无密切关联,尚待深入研究。86 例 DAT 阳性黄疸患儿全部被证实为 HDN,而 269 例 DAT 阴性黄疸患儿中有 191 例被证实为 HDN;165 例 IAT 阳性黄疸患儿全部被证实为 HDN,而 190 例 DAT 阴性黄疸患儿中有 112 例被证实为 HDN。说明新生儿 DAT 阳性、IAT 阳性与 HDN 均密切相关。有学者<sup>[17]</sup>认为,很有必要取新生儿脐带血进行血型**

及 DAT 检测,以及早筛查、发现 HDN,并及时采取有效干预措施。

#### 参考文献

- 1 林凤茹,王艳,李石磊.新生儿溶血病诊治进展[J].中国实用内科杂志,2012,32(5):335-337.
- 2 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].第3版.南京:东南大学出版社,2006:246-271.
- 3 王永午主编.实用儿科手册[M].北京:人民军医出版社,1997:343.
- 4 刘玉生.儿科学[M].北京:人民卫生出版社,2009:1244-1245.
- 5 钟月华,谭静,黄华华,等.微柱凝胶技术在新生儿溶血性疾病诊断中的应用[J].临床和实验医学杂志,2011,10(8):613-614.
- 6 卢磊,刘燕.微柱凝胶技术在新生儿溶血病检测中的应用[J].中国现代医生,2010,48(13):38-39.
- 7 童军,刘庆海,杨文冲.血型血清学实验方法[A]//李勇,马学严.实用血液免疫学[M].北京:科学出版社,2006:659-660.
- 8 夏世勤,周晓璐,王竹英,等.156例新生儿溶血病患儿血清学检测结果及相关因素分析[J].国际检验医学杂志,2014,35(1):22-24.
- 9 林琼琳,郭雅春,彭燕,等.微柱凝胶法检测南昌地区新生儿溶血病及其相关性分析[J].中国输血杂志,2013,26(8):741-742.
- 10 山艳春.母婴 ABO 血型不合新生儿溶血病的早期诊断 74 例分析[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2001,22(4):111-113.
- 11 符宝铭,袁茜茜,覃宜飞.新生儿 ABO 溶血病血清学检测及其临床应用[J].中国妇幼保健,2013,28(18):2925-2927.
- 12 栾劲,程静辉.早期溶血试验在改善新生儿 ABO 溶血病预后中的效果观察[J].中国当代医药,2013,20(35):36-37.
- 13 Novaretti MC, Jens E, Pagliarini T, et al. Hemolytic disease of the newborn due to Anti-U[J]. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo, 2003,58(6):320-323.
- 14 张勇萍,杨世明,苏小花,等.新生儿溶血病 ABO 血型免疫性抗体检测分析[J].细胞与分子免疫学杂志,2010,26(11):1154-1155.
- 15 高峰.输血与输血技术[M].北京:人民卫生出版社,2003:102.
- 16 黎海澜.ABO 新生儿溶血病实验室检测方法及其临床应用[J].检验医学与临床,2013,10(2):200-202.
- 17 贾金平,黄小霞,李芳芳,等.脐血胆红素和溶血 3 项对早期诊断新生儿 ABO 溶血病的价值[J].中国妇幼保健,2014,29(2):227-230.

[收稿日期 2014-09-24][本文编辑 韦所苏]