

• 检验技术与方法 •

微柱凝胶法检测孕妇 IgG 抗-A(B)抗体效价结果的判定

李 明,武建新

(广东省广州市荔湾区第二人民医院检验科 510160)

摘 要:**目的** 建立微柱凝胶法检测孕妇 IgG 抗-A(B)抗体效价的结果判定标准。**方法** 用微柱凝胶法和试管法平行测定 126 例孕妇 IgG 抗-A(B)抗体效价,分别统计试管法和微柱凝胶法 1+、3+凝集结果;比较两种方法的阳性率,并对结果进行相关性分析,对微柱凝胶法 IgG 抗-A(B)抗体效价以 1+判定、1:256 为决定值和以 3+判定、1:64 为决定值结果的评价指标比较。**结果** 微柱凝胶法 1+、3+凝集和传统试管法阳性例数和阳性率分别为 90 例(71.40%)、26 例(21.40%)、24 例(19.05%);微柱凝胶法 3+凝集报告与试管法阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。微柱凝胶法以凝集 1+、3+报告,与传统试管法结果相关系数分别为 0.897、0.919,均高度相关。以微柱凝胶法 1+凝集判定结果、效价 1:256 为决定值和以 3+凝集判定结果、效价 1:64 为决定值,两者差异无统计学意义($P>0.05$);两者相对于试管法的灵敏度、特异度及准确度分别为 0.958、0.961、0.960、0.833、0.960 和 0.936。**结论** 以微柱凝胶法 3+凝集判定的结果,可以直接报告结果。

关键词:血型鉴定; 微柱凝胶法; IgG 抗体检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.030 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)11-1347-03

微柱凝胶法是近二十年发展起来的血型血清学试验方法,相对于传统试管法抗人球蛋白试验,具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果直观等优点,有望取代传统试管,成为检测免疫性抗体的常规方法^[1-2]。由于微柱凝胶法灵敏度较高,如何与原有的诊断标准和参考范围进行衔接,是检验与临床不得不面对的问题。笔者将传统试管法抗人球蛋白试验结果与微柱凝胶法不同凝集强度的试验结果进行比较,摸索出既与原有的参考范围统一又便于检验人员报告的结果判定标准,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 9 月至 2011 年 12 月在本院进行产前检查,与丈夫 ABO 血型不合的 Rh(D)阳性的 O 型待产孕妇 126 例,年龄 20~45 岁,其中 67 例检测 IgG 抗-A 抗体,59 例检测 IgG 抗-B 抗体。

1.2 仪器与试剂 微柱凝胶试剂卡为长春博讯生物技术有限公司提供的不完全抗体检测卡;抗人球蛋白试剂由上海血液生物医药有限公司提供。ABO 试剂红细胞由本院按《全国临床检验操作规程》第 3 版中试剂红细胞悬液制备方法制备^[3],使用前配制成 1%浓度;0.2 mol/L 巯基乙醇(2-ME)由长春博迅生物技术有限责任公司提供;长春博德生物技术有限公司提供 BYD 多用途离心机;微柱凝胶卡专用孵育器由长春博德生物技术有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 标本预处理 200 μL 血清标本和 200 μL 0.2 mol/L

2-ME 应用液充分混匀,试管口盖橡胶盖,置 37 ℃ 水浴 30 min,裂解血清中 IgM 类抗体,用生理盐水做倍比稀释,稀释度分别为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1 024。

1.3.2 试管法抗人球蛋白试验 取上述 1:2~1:1 024 稀释度血清各 100 μL,严格按《全国临床检验操作规程》操作,结果以显微镜观察到“1+”凝集的最高稀释度为抗体效价。以 1:64 效价作为临床参考界值。

1.3.3 微柱凝胶法球蛋白试验 取上述制备的 1%浓度与孕妇丈夫同型的 A(B)试剂红细胞悬液和 1:2~1:1 024 稀释度的孕妇血清各 50 μL 分别加入微柱凝胶卡,37 ℃ 孵育 15 min 后以 900 r/min 离心 2 min,再以 1 500 r/min 离心 3 min。观察结果并记录红细胞 1+、3+凝集的稀释度。判定标准:红细胞复合物位于中近底部为 1+,大部分红细胞复合物位于凝胶表面为 3+,少部分位于凝胶中上部^[4]。所有标本同时使用试管法和微柱凝胶法进行检测。

1.4 统计学处理 采用 Excel 统计软件进行数据处理分析,试管法和微柱凝胶卡法阳性检出率比较采用四格表配对资料 χ^2 检验,并对两种方法进行直线相关性分析(抗体效价先作对数转换)。

2 结 果

2.1 126 例 IgG 抗-A(B)抗体效价试管法和微柱凝胶卡法不同凝集强度分布结果见表 1。

表 1 两种方法检测 126 例 IgG 抗-A(B)抗体不同凝集强度分布(n)

方法	稀释度									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1 024
试管法	1	5	33	34	29	16	6	1	1	0
微柱凝胶法 1+	0	0	2	4	30	34	32	12	8	4
微柱凝胶法 3+	1	4	28	35	32	14	7	3	1	1

2.2 微柱凝胶法不同凝集强度与试管法阳性检出率比较见表 2。其中试管法以 IgG 抗-A(B)抗体以 1:64 效价作为阳性参考界值。

2.3 微柱凝胶法不同凝集强度与试管法直线相关性分析结果及对应试管法的参考界值见表 3。

2.4 微柱凝胶法 IgG 抗-A(B)抗体效价以红细胞 1+凝集判

定,1:256 为参考界值和以红细胞 3+凝集判定,1:64 为参考界值所得结果阳性率比较经 χ^2 检验, $\chi^2=0.25, P>0.05$, 差异无统计学意义,两种判定标准的评价指标见表 4。

表 2 微柱凝胶法不同凝集强度及试管法阳性检出率比较			
参数	试管法	微柱凝胶法	
		1+	3+
阳性例数(n)	24	90	26
阳性率(%)	19.05	71.40*	21.40

*: $P<0.01, \chi^2=19.6$, 与试管法的阳性率比较。

表 3 微柱凝胶法不同凝集强度与试管法相关性分析结果及对应试管法的参考界值			
与试管法相关性分析参数	微柱凝胶法凝集强度		
	1+	3+	
相关系数 r	0.897	0.919	
相关系数 t 值	22.5	26.1	
相关显著性	$P<0.01$ 高度相关	$P<0.01$ 高度相关	
对应试管法参考界值*	246.6	73.4	

*: 试管法以 IgG 抗-A(B)抗体效价 1:64 为参考界值,对应试管法的参考界值根据回归方程计算。

表 4 两种判定标准的评价指标		
评价指标	红细胞 1+凝集判定 1:256 为参考界值	红细胞 3+凝集判定 1:64 为参考界值
敏感度	0.958	0.833
特异度	0.961	0.960
准确度	0.960	0.936

3 讨 论

新生儿溶血病(HDN)是由于母亲的 IgG 抗体透过胎盘包被新生儿的红细胞,导致溶血引起,以 Rh 血型不合 HDN 和 ABO 血型不合 HDN 常见,其中后者在我国多见;虽然研究表明孕妇产前 IgG 抗-A(B)抗体水平的高低与 ABO 血型不合 HDN 的发病率没有绝对的一致性,但有高度的相关性^[5-6]。目前检测孕妇产前 ABO 血型 IgG 抗体效价仍然是预防 ABO 血型不合 HDN 发生的一个重要参考指标。一般认为只有当抗体效价大于或等于 1:64 时才有可能发生 HDN,临床上通常以 1:64 作为参考界值。因此,选择一种灵敏、准确且重复性好的 IgG 抗-A(B)抗体效价测定方法很有必要。目前较常用的方法有试管抗人球蛋白法、凝聚胺法和微柱凝胶法;试管法繁琐费时,难以常规开展;凝聚胺法结果观察与振荡方式有关,且灵敏度较低^[7-8]。微柱凝胶法灵敏度高、操作简便、结果易观察,已逐步取代传统的试管法抗人球蛋白试验;但笔者在试验中发现,微柱凝胶法的敏感性远大于传统的抗人球蛋白法,如果以微柱凝胶法红细胞 1+凝集报告结果,阳性率远高于传统的抗人球蛋白法,极易误导临床。已有的文献报道观点也不尽相同,有的认为与传统试管抗人球蛋白法差别不大^[9-11],即以 1:64 效价为参考界值;有的则认为参考界值应设在 1:128 左右^[12-15];还有的认为参考界值应设在 1:256 附近^[16-19]。因此,有必要根据科室的情况设立自己的标准。因微柱凝胶法的凝集强度是以红细胞在微柱中的下沉位置判定,易于观察,只

要适当地稀释标本,每个试验都能够区分出红细胞的不同凝集强度;如果适当提高判定标准,使结果与原有的参考范围吻合,这样既方便临床诊断,又便于检验人员报告。

根据表 2 所得结果,以临床上有意义的 IgG 抗-A(B)抗体效价 1:64 作为阳性参考界值,微柱凝胶法红细胞 1+凝集报告,试管法与微柱凝胶法检出 IgG 抗-A(B)抗体阳性例数和阳性率分别为 24 例(19.05%)、90 例(71.40%),微柱凝胶法明显高于试管法,差异有统计学意义($P<0.01$);如以此发报告将对临床造成误导。但以微柱凝胶法红细胞 3+凝集报告,阳性例数和阳性率为 26 例(21.40%),与试管法阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。微柱凝胶法测定 IgG 抗-A(B)效价以红细胞凝集 1+、3+报告的结果,均与传统试管法高度相关,相关系数分别为 0.897、0.919;说明二者存在高度的相关性;如以试管法效价 1:64 为标准,红细胞 1+、3+凝集的对应该参考界值分别为 246.6、73.4。同时,笔者也对以微柱凝胶法红细胞 1+凝集判定结果、效价 1:256 为参考界值和以红细胞 3+凝集判定结果、效价 1:64 为参考界值进行 χ^2 检验,差异无统计学意义($\chi^2=0.25, P>0.05$),两者的灵敏度、特异度及准确度分别为 0.958、0.961、0.960、0.833、0.960 和 0.936,差异极微;因此笔者认为以微柱凝胶法红细胞 3+凝集判定的结果,可以直接报告,不用改变原有的 1:64 效价参考界值。

将一个新的检验方法用于已有的检验项目,如果其检验效能与原有方法不同,需要尽早建立新的参考范围,或者套用已有的参考范围;如果没有公认的权威性标准,将会带来混乱;笔者希望能够有大规模、多中心的合作,发布新方法权威性的试验参数,以便推广使用和质控监管。

参考文献

[1] Jaiprakash M, Gupta PK, Kumar H. Role of gel based technique for Coomb's test[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2006, 49(3):370-372.

[2] Weisbach V, Kohnhäuser T, Zimmermann R, et al. Comparison of the performance of microtube column systems and solid-phase systems and the tube low-ionic-strength solution additive indirect antiglobulin test in the detection of red cell alloantibodies[J]. Transfus Med, 2006, 16(4):276-284.

[3] 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, 2007:246-248.

[4] 李勇, 马学严. 实用血液免疫学血型理论和实验技术[M]. 北京:科学出版社, 2006:562-584.

[5] 聂川, 柳国胜, 杨慧, 等. O 型孕妇血清 IgG 抗体效价与新生儿溶血病和高胆红素血症发生的关系[J]. 暨南大学学报:医学版, 2002, 23(6):48-51.

[6] 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.

[7] 林甲进, 朱碎永. 三种方法检测产前免疫性抗体与新生儿溶血病结果比较[J]. 江西医学检验, 2003, 21(4):300.

[8] 谢作听, 王春香, 陈钦宏, 等. 三种方法测定人血清 IgG 抗 A、抗 B 效价的比较[J]. 临床输血与检验, 2002, 4(1):25-26.

[9] 吴元健, 冯丽瑾, 曹颖, 等. 微柱凝胶免疫反应技术在检测 IgG 抗-A(B)效价中的应用[J]. 苏州医学, 2006, 29(1):38-39.

[10] 雷厉, 曾劲峰. 微柱凝胶技术检测孕妇血型抗体效价的研究[J]. 中国热带医学, 2005, 5(6):1175-1176.

[11] 李永乾, 龙志芳, 姚瑶, 等. 3 种方法检测孕妇体内免疫性抗体的

- 对比研究[J]. 河北医药, 2010, 32(18): 2600-2601.
- [12] 何静, 陈方祥, 刘建忠, 等. BioVue 微柱凝胶法检测孕妇产前抗体效价分析[J]. 重庆医学, 2007, 36(24): 2482-2493.
- [13] 李凌波, 王冬倩, 陈云声, 等. 国产微柱凝胶免疫检测试剂卡检测孕妇 IgG 血型抗体效价的实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(12): 1138-1141.
- [14] 刘智勇, 董玉红, 何凤娥, 等. 微柱凝胶法在检测孕妇 IgG 抗体中的应用研究[J]. 成都医学院学报, 2010, 5(2): 149-151.
- [15] 吴穗, 董伟群, 佟力, 等. 孕妇血型抗体效价检测的方法学探讨[J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(9): 49-51.
- [16] 张健, 董建红, 孙佰秀, 等. 微柱凝胶法检测 1 610 例 O 型血孕妇

- IgG 抗体效价的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(2): 67.
- [17] 李建新, 吴夏枫, 陈梅莲, 等. 抗人球蛋白微柱凝胶法和试管法检测孕妇 IgG 抗-A(B)的比较[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(3): 213-214.
- [18] 谢一唯. 孕妇血清 IgG 抗-A(B)抗体效价微柱凝胶法室内参考值测定[J]. 全科医学临床与教育, 2009, 7(5): 476-477.
- [19] 彭小虎, 刘竞, 赵国胜, 等. 微柱凝胶法测定孕妇 IgG 抗-A(B)效价的评价[J]. 实用预防医学, 2006, 13(3): 773-774.

(收稿日期: 2012-02-20)

• 检验技术与方法 •

自制乙型肝炎病毒表面抗原中和抗体的临床应用

曹树正, 范庆坤[△], 王文武, 张真路

(湖北省武汉市亚洲心脏病医院检验中心 430022)

摘要:目的 通过自制乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)中和抗体, 评价其在临床检验中的应用。方法 选取 HBsAg 经微粒子酶免疫分析技术(MEIA)初筛标本速率值/临界值(S/CO)在 0.80~10.0 之间的血清标本 149 例, 使用自制 HBsAg 中和抗体进行验证。**结果** 149 例标本经自制 HBsAg 中和抗体验证后, 112 例(75.2%)结果确认为阳性, 5 例(3.3%)为阴性, 26 例(17.5%)为假阳性, 6 例(4.0%)为不确定。自制 HBsAg 中和抗体与罗氏确证试剂对 30 例标本进行比对验证, 总符合率 96.7%(29/30)。**结论** 自制 HBsAg 中和抗体验证试验可提高 HBsAg 检测准确性, 处于灰区水平的检测结果应采用更灵敏的方法进行验证。

关键词: 肝炎表面抗原; 乙型; 中和抗体; 验证试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.031

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)11-1349-02

乙型肝炎病毒(HBV)感染呈世界性流行, 但不同地区 HBV 感染的流行强度差异很大。中国属 HBV 感染高流行区^[1]。乙型肝炎的筛查和诊断常用血清学指标中以乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)最为重要^[2]。因此, 对于 HBsAg 检测的准确度就显得尤为重要。目前, 检测方法主要有 ELISA 法、微粒子酶免疫分析(MEIA)法、电化学发光分析(ECLIA)法等。由于各种方法均设定阳性判断值(cutoff), 处于 cutoff 周围的弱反应性的标本则可能影响较大^[3]。因此, 国内外报道均提出如 HBsAg 检测结果呈有反应性则需进一步验证^[4-6]。目前, 国内外 HBsAg 确证试剂价格昂贵, 未能广泛应用于常规检测。基于现状, 本院自制 HBsAg 中和抗体, 针对弱反应性标本做验证试验, 对其临床应用进行初步分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院 2009 年 1~10 月血清标本 13 772 例, 选择 HBsAg 经 MEIA 法检测标本速率值/临界值(S/CO)在 0.80~10.0 之间的标本做验证试验, 最终入选 149 例。并从 149 例标本中随机选取 30 例标本, 以德国罗氏公司 HBsAg 确证试剂作为标准, 与自制 HBsAg 中和抗体验证试验结果进行比对。

1.2 仪器与试剂 美国雅培公司 AxSYM 免疫分析系统, 德国罗氏公司 E601 免疫检测系统, 芬兰 Labsystems Dragon Multiskan III 酶标仪。美国雅培公司 AxSYM 配套 HBsAg(V2)试剂盒, 批号: 78264LF03; 德国罗氏公司 E 601 配套 HBsAg II、乙型肝炎病毒表面抗体(HBsAb)试剂盒, 批号分别为: 152836、152088; 罗氏公司 HBsAg 中和试剂盒, 批号: 152443-01。上海科华生物工程股份有限公司乙型肝炎两项(HBsAg、HBsAb)

ELISA 法诊断试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 原理 自制 HBsAg 中和抗体验证试验反应原理参照美国雅培公司 ARCHITECT HBsAg V.1 确证试剂说明书。HBsAg MEIA 法检测灵敏度为 0.1~0.6 ng/mL, ECLIA 法检测灵敏度为 0.05~0.1 ng/mL。所有操作及结果判定严格按照试剂说明书进行。

1.3.2 自制含 HBsAg 中和抗体血清及对照血清的筛选与制备 所选血清标本均要求无溶血、黄疸、脂血, 甲型肝炎病毒 IgM 抗体、丙型肝炎病毒抗体、艾滋病毒抗体、梅毒抗体检测均为阴性。其中, 选择数例($n > 30$)经 ELISA 法检测 HBsAg 阴性、HBsAb S/CO > 20.0 的血清混合制备 HBsAg 中和抗体血清; 选择数例($n > 30$)经 ELISA 法检测 HBsAg、HBsAb 均阴性的血清混合制备对照血清。经 56℃水浴灭活 10 h, 最终分别经 ECLIA 法检测, 含 HBsAg 中和抗体血清: HBsAg S/CO < 0.500 , HBsAb $> 3\ 000$ IU/L; 对照血清: HBsAb < 2.00 IU/L, HBsAg S/CO < 0.500 。分装并放置-80℃冰箱中保存、备用。

1.3.3 验证试验 取 50 μ L 含 HBsAg 中和抗体血清及对照血清分别与 200 μ L 被检血清混合, 并分别标记为中和管、对照管, 同时加做阳性、阴性质控。放置 37℃水浴 1 h, 采用 MEIA 法检测各管 HBsAg, 经 MEIA 法初筛标本 HBsAg S/CO < 1.00 时, 则延长反应时间, 另用 ECLIA 法检测 HBsAg, 以 ECLIA 法作为结果判断标准, 所测得 S/CO 值计算 HBsAg 的抑制率, 计算公式为:

[△] 通讯作者, E-mail: fanqingkun@hotmail.com.