

• 临床研究 •

应用微柱凝胶技术评估并优化 IgG 抗 A/B 吸收试验*

刘峰¹ 李归宁¹ 李敏芳¹ 张敏¹ 胡丽华¹

[摘要] 目的:探讨适用于以微柱凝胶技术为基础的 IgG 抗 A/B 吸收试验。方法:选取 30 例 IgG 抗 A 及抗 B 起始效价从 64~1 024 的血清样本,与 A 型或 B 型红细胞于 37℃ 进行吸收试验,于 5 min、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h 吸收时间后分离并测定吸收后血清的效价。结果:①IgG 抗 A 和抗 B 均存在吸收效果伴随吸收时间变化的趋势,起始效价在 128~1 024 基本上于 2 h 后进入平台期。②IgG 抗 A 和抗 B 起始效价为 128 与 256、512 与 1 024 的时间变化趋势均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$);IgG 抗 B 起始效价为 256 与 512、1 024 之间的时间变化趋势均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。③相同吸收时相的 IgG 抗 A 与抗 B 吸收效果之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:在依赖微柱凝胶技术条件下,采取 37℃ 2 h 吸收 1 次后再结合 1 次 1~2 h 就能对起始效价小于 1 024 的 IgG 抗 A 和抗 B 能使其充分吸收。

[关键词] 微柱凝胶技术;吸收试验;IgG;抗 A/B;效价

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)12-0761-03

Application microcolumn gel technique to assess and optimize the adsorption test of IgG anti-A/B

LIU Feng LI Guining LI Minfang ZHANG Min HU Lihua

(Department of Blood Transfusion, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China)

Corresponding author: HU Lihua, E-mail: xhhlh@126.com

Abstract Objective: To investigate the optimal protocol of IgG anti-A/B adsorption test based micro column gel technique. **Method:** 30 random cases of serum samples with IgG anti-A or anti-B were collected and assimilated by the corresponding A or B cells, then the isolated serum post adsorption test contained the reaction time of 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, respectively. **Result:** ① The alternative tendency of adsorption effects varied in the different adsorption time, and the platform stages of adsorption effects in the initial titration from 128 to 1 024 occurred after about 2 hours. ② The tendency of adsorption effects along with time in IgG anti-A and anti-B with the initial titration of 128 were significant different from those initial titration of 256, 512 and 1 024 ($P < 0.05$), the same was true of IgG anti-B with the initial titration between 256 and 512 or 1 024 ($P < 0.05$). ③ In the same adsorption time, the tendency of adsorption effects between IgG anti-A and IgG anti-B were no obvious difference ($P > 0.05$). **Conclusion:** Combined an adsorption test with 2 hours in 37℃ and another adsorption test with 1 to 2 hour, the largest efficacy in adsorption test of IgG anti-A/B whose initial titration is beneath 1 024 can be obtained.

Key words microcolumn gel technique; adsorption test; IgG; anti-A/B; titration

早在 2000 年卫生部颁发的《临床输血技术规范》中就明确规定对于反复输血或具有妊娠史的患者应进行意外抗体的检测,以保证临床输血安全。在临床实际工作中,意外抗体出现一般多为 IgG 类,常常伴随自身抗体或者与 IgM 或 IgG 类抗 A、抗 B 同种抗体共存,因而在检测意外抗体时有时需要利用自身红细胞^[1]或同种 A、B 红细胞进行吸收试验对影响检测的其他类型抗体加以去除;而吸收试验另一个主要的临床应用价值就是结合放散技

术用于血型亚型的鉴定^[2]。目前随着微柱凝胶检测技术在我国各地输血实验室的广泛应用,因其操作简便、灵敏度及准确度均较高,已经成为了当前血型血清学检测主流技术之一。但是当前对吸收试验的操作及效果的评估^[3]多为在早期抗球蛋白试管法条件下进行的,故而常规的吸收程序是否会影响到基于微柱凝胶技术进行的试验,目前尚无研究及报道,因此有必要对基于微柱凝胶技术水平下对抗体吸收试验的参数进行评估及优化。本研究以 IgG 抗 A、抗 B 吸收试验为例,对吸收试验去除效果进行分析,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

随机选取 2010-10—2011-12 我院孕妇产前

* 基金项目:卫生部卫生行业科研专项项目(No:200902008-07)

¹ 华中科技大学同济医学院附属协和医院输血科(武汉, 430022)

通信作者:胡丽华, E-mail: xhhlh@126.com

IgG 抗 A/B 效价的血清标本共 30 例,其中 IgG 抗 A 和抗 B 效价为 64 各 3 例,IgG 抗 A 和抗 B 效价为 128 各 3 例,IgG 抗 A 和抗 B 效价为 256 各 3 例,IgG 抗 A 和抗 B 效价为 512 各 3 例,IgG 抗 A 和抗 B 效价为 1 024 各 3 例。所有标本意外抗体检测均阴性。

1.2 方法

1.2.1 吸收用 A、B 压积红细胞制备 吸收用 A、B 红细胞均选自正常献血者血液标本,经单克隆抗 A、抗 B 血型诊断试剂(购自长春博德生物技术有限责任公司,批号:20091120)鉴定,要求血型鉴定时凝集强度均为 4+,同时直接抗人球蛋白试验(抗 IgG, C₃d 抗人球蛋白试剂购自上海血液生物医药有限责任公司,批号:20080331)为阴性。随机混合 3 人份红细胞经生理盐水三洗后制备成压积红细胞备用。

1.2.2 IgG 抗 A/B 去除效果的评估 ①待吸收血清标本和吸收用的 A、B 压积红细胞均在吸收试验前 37℃ 水浴条件下平衡 30 min;②取 6 支洁净玻璃小试管,分别加入 200 μ l 待吸收血清标本及 200 μ l 相应 A/B 吸收用压积红细胞,混匀并立即置于 37℃ 水浴;③在吸收后 5 min、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h 时间点取出一支试管立即离心并分离出上清液;④取 100 μ l 上清液加入 100 μ l 0.01 mol/L 1,4-二巯代苏糖醇(2-DTT)破坏 IgM 抗体,水浴孵育 30 min 后,用 Diamed Liss-coombs 微柱凝胶检测卡测定 IgG 抗 A/B 效价;⑤若步骤④中出现检测为阴性时,则不必加入 2-DTT 预处理 IgM 抗体,直接取 100 μ l 上清液进行原倍检测,同时以盐水试管法作为检测对照;⑥记录各时间段上清液 IgG 抗体效价,换算成 $\log_2$ 对数值后^[4]制作吸收曲线。

1.3 统计学处理

计算不同吸收时相效价 $\log_2$ 对数值的与起始效价 $\log_2$ 对数值差值,再采用 SPSS18.0(PASW Statistics 18)统计学软件进行重复数据方差分析^[5],包括一般线性模型(general linear model, GLM)的 repeated measures 和 multivariate 过程对其进行重复测量方差分析和多元方差分析,并进行不同时间点和不同组间的两两比较。

2 结果

2.1 IgG 抗 A 与 IgG 抗 B 不同起始效价的吸收曲线

详见图 1。从图 1 中可知,IgG 抗 A 和抗 B 起始效价均在 128~1 024 基本上于 2 h 后进入平台期,效价不再出现明显下降。如:IgG 抗 A 起始效价为 1 024 经过 2~4 h 吸收后效价基本可降至 32,IgG 抗 B 起始效价为 1 024 基本可降至 64;但 IgG 抗 A 和抗 B 起始效价为 64 经过 30 min~1 h 后,原倍血清的效价基本都测定不出。

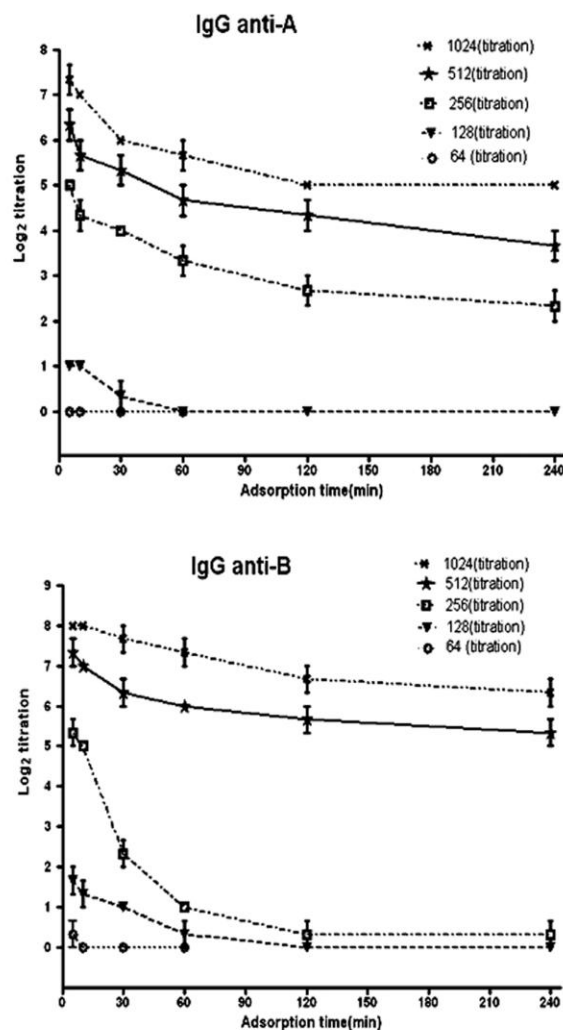


图 1 IgG 抗 A/B 吸收曲线示意图

2.2 IgG 抗 A/B 去除效果的统计学评估

IgG 抗 A 吸收效果经 Mauchly 球形度检验, $P < 0.01$,说明不同吸收时相重复测量的数据间存在高度的相关性,经 Greenhouse-Geisser 检验,吸收时相差异有统计学意义($F = 52.452, P < 0.01$),说明吸收效果有随吸收时间变化的趋势;时间和起始效价分组的交互作用差异无统计学意义($F = 1.058, P > 0.05$)。经 Bonferroni 法进行两两比较可知,IgG 抗 A 起始效价为 256、512 及 1 024 之间的时间变化趋势差异无统计学意义($P > 0.05$),但起始效价为 128 与 1 024、512 及 256 的时间变化趋势均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

IgG 抗 B 经 Mauchly 球形度检验($P > 0.05$),吸收时相差异有统计学意义($F = 87.466, P < 0.01$),说明吸收效果也有随吸收时间变化的趋势;时间和起始效价分组的交互作用差异无统计学意义($F = 1.322, P > 0.05$)。经 Bonferroni 法进行两两比较可知,IgG 抗 B 起始效价为 512 与 1 024 之间的时间变化趋势差异无统计学意义($P >$

0.05)。但起始效价为128与256、512、1 024的时间变化趋势均差异有统计学意义($P < 0.05$);而起始效价为256与512、1 024及的时间变化趋势差异有统计学意义($P < 0.05$)。

考虑到IgG抗A及抗B起始效价为64在执行吸收实验的30 min~1 h后,其原倍血清已测定不出效价,故而无法获取其转换成 $\log_2$ 对应值导致统计数据缺失,因此未能将其纳入统计学处理。相同吸收时相的IgG抗A与抗B吸收效果之间差异无统计学意义($P > 0.05$),提示实际吸收实验中可不需要考虑抗体类型是抗A还是抗B。

3 讨论

具有临床意义的意外抗体出现一般多为IgG类,多数因为反复输血或妊娠后产生。因为孕龄期O型女性体内主要主要为IgG类抗A及抗B更容易引起胎儿及新生儿溶血病,因此产前筛查时需要同时关注其体内的意外抗体以及体内同存的IgG抗A、抗B等同种抗体的干扰,尽管常见意外抗体筛选使用的谱细胞要求为O型,但对于罕见的意外抗体有时受到鉴定细胞来源限制,有时可能需要使用非O型的鉴定细胞,此时就需要通过吸收试验等技术去除IgG抗A、抗B等同种抗体。另一方面,ABO亚型鉴定中经常运用吸收及后续的放散试验来进行特异性血型抗原或抗体鉴定,因此,吸收试验仍旧是常规血型血清学技术中最重要的试验技术之一。但目前使用的吸收试验仍就源自早期在抗人球蛋白试管法的技术条件下形成的程序,该程序是否能匹配当前在免疫血液学广泛应用的微柱凝胶技术,目前尚无文献报道,这应引起输血实验人员足够的重视。

IgG抗A与抗B的吸收效果均存在随吸收时间变化的趋势,从图1可知,IgG抗A和抗B起始效价均在128~1 024基本上于2 h后进入平台期,效价不再出现明显下降,如:起始效价为1 024的IgG抗A及抗B经过2~4 h吸收后效价基本可降至32及64;而IgG抗A和抗B起始效价为64经过30 min~1 h后,原倍血清的效价基本测定不出。进一步通过统计学处理后我们发现:IgG抗A起始效价为256、512及1 024之间的时间变化差异无统计学意义($P > 0.05$),而起始效价为128与256、512及1 024的时间变化趋势均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),这提示起始效价为128可能是IgG抗A吸收效果出现差异的分界值,即起始效价在128及以下的吸收更快速、有效;IgG抗B起始效价为1 024与512之间的时间变化趋势差异

无统计学意义($P > 0.05$),但起始效价为128与256、512、1 024及256与512、1 024的时间变化趋势均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),这提示起始效价为128及256可能是IgG抗B吸收效果出现差异的分界值,即起始效价在256及以下的吸收更快速、有效。因此,不同的起始效价IgG抗A和抗B进行吸收试验时将出现不同吸收时间变化趋势,这就需要实验人员引起足够的重视。在实际工作中,若IgG抗A和抗B起始效价未知,而为了通过吸收试验达到最大的IgG抗A和抗B去除或结合效果时,可采取首次常规条件在2 h吸收1次后再结合1次1~2 h的吸收,就能对起始效价小于1 024的IgG抗A和抗B充分吸收,即达到在微柱凝胶方法下原倍血清无法再被检出;另一方面,我们的试验结果提示吸收试验可不需要考虑待吸收的IgG抗体是抗A还是抗B($P > 0.05$)。考虑本次研究对象为IgG抗A和抗B,故而吸收温度采用了37℃^[3],至于4℃条件下的吸收效果有待于下一步研究证实。对于评估其他需要通过吸收试验分离或检测的同种抗体或自身抗体时,则可以借鉴本研究的策略进行,以期达到能在微柱凝胶试验条件下高效、科学的实施。

总之,随着免疫血液学实验技术即血型血清学技术的不断发展,对于新涌现的技术方法我们应该理性对待,尤其是在具体试验项目应用中尚无最佳的技术程序或参数时,我们不宜完全照搬以往的技术程序或经验,而应该进行必要的分析与探讨,总结出最佳的试验程序或参数,以充分匹配该新技术方法下的试验项目,保障临床输血检验的有效性与正确性。

参考文献

- [1] 杨世明,张红丽,张勇萍,等.自身免疫性溶血性贫血患者的血清学特性检测分析[J].细胞与分子免疫学杂志,2008,24(8):834-835.
- [2] 杨世明,张勇萍,崔颖.微柱凝胶法检测疾病对ABO血型抗原的影响及血清学特性分析[J].细胞与分子免疫学杂志,2005,21(6):755-759.
- [3] 胡丽华.临床输血与检验试验指导[M].北京:人民卫生出版社,2007:18-21.
- [4] REVERBERI R. The statistical analysis of immunohaematological data[J]. Blood Transfusion, 2008, 6: 37-45.
- [5] 邱宏,金国琴,金如锋,等.水迷宫重复测量数据的方差分析及其在SPSS中的实现[J].中西医结合学报, 2007, 5(1):101-105.

(收稿日期:2012-04-29)