采血时间的不同对新生儿ABO溶血病诊断的影响

代凤 刘志伟 侯渊博 张盈 胡梦思 韩业韬 王锐

胎儿新生儿溶血病(hemolytic disease of the fetus and newborn, HDN)是一组由于母婴血型不合引起的胎儿或新生儿同种免疫性溶血性疾病^[1,2],是由于母亲体内具有针对婴儿体内遗传自父亲红细胞抗原的抗体,从而导致胎儿和新生儿红细胞的破坏而引起的。母亲体内的IgG类抗体可以通过胎盘进入胎儿的血液循环,结合到相应的红细胞抗原上,使得包被了抗体的红细胞在胎儿脾脏内被巨噬细胞破坏。ABO血型不合导致的HDN已经成为新生儿所有溶血性疾病中最常见最重要的一种^[3]。在新生儿红细胞膜上或血清中检测出对抗其自身红细胞的抗体,是诊断ABO溶血病的重要实验依据,一般需进行3项试验:直接抗人球蛋白试验、游离试验和释放试验,其中释放试验在3项中最为敏感,是确诊HDN的实验^[4]。有相关文献报道,出生后3d内确诊的新生儿溶血病,采取光疗辅以碱化尿液和服用肝酶诱导剂等措施,能有效地控制病情进展,减少静脉丙种球蛋白输注或换血,且改善预后^[5]。本次研究对本院不同采血时间对新生儿ABO溶血病诊断的影响进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2018年8月至2019年12月间在浙江大学医学院附属邵逸夫医院下沙院区检测新生儿溶血的235份血样本为研究对象,根据采血

的时间对其进行分组,分为出生后1~3d、出生后4~5d、出生后6~7d和出生后7d以上。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 血型血清学专用离心机(由台湾贝索企业有限公司生产),HITACHI MC450细胞洗涤专用离心机(由Hitachi Koki公司生产),FYQ型免疫微柱孵育器(由长春博研科学仪器有限责任公司生产)和TD-A血型血清学用离心机(由长春博研科学仪器有限责任公司生产)。抗人球蛋白试剂(由上海血液生物医药有限责任公司生产)1支,酶A细胞,酶B细胞(木瓜酶处理^[6]),低离子溶液Liss液1瓶(由BASO公司生产)和抗人球蛋白检测卡(由长春博讯生物技术有限责任公司生产)。

1.2.2 操作方法 ①直接抗球蛋白试验:将患儿红细胞洗涤3~5次后配制成5%悬液,取1滴红细胞悬液加2滴抗球蛋白试剂,血型血清学专用离心机1000g离心15s,肉眼及显微镜观察结果。②游离抗体测定:取小试管2支,标明游离A、游离B,每管加入患儿血清3滴,再分别加入5%经木瓜酶处理的A、B红细胞悬液1滴,然后每管加入低离子溶液Liss液3滴;混匀后置37℃水浴15min。用HITACHI MC450细胞洗涤专用离心机3~5次,留压积红细胞,用纸吸干,加入抗球蛋白试剂2滴,血型血清学专用离心机1000g离心15s,肉眼及显微镜观察结果。③释放抗体测定:取患儿红细胞15~20滴,用0.9%氯化钠注射液洗涤,血型血清学专用离心机1000g离心1min,吸掉上清,不要吸干,共洗涤3次。转动试管,使红细胞平铺在管壁周围,平放入-20℃低温冰箱,冰冻10~15min。在37℃水浴中融化红细胞,用血型血清学专用离心机1000g离心1min,吸上层含有红色的液体(即释放液)备用。在标有A、B的2个试管中各加入释放液3滴,按标记加入5%经木瓜酶处理的A、B红细胞悬液1滴,

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.012.018

基金资助:浙江省医药卫生科技计划(2016KYA106),浙江省医药卫生科技计划(2017KY419),浙江省基础公益研究计划项目(LGD19H080002),浙江省血液安全研究重点实验室开放基金(2018KF01)

作者单位:310018 浙江杭州,杭州市下沙医院输血科(代凤、张盈、王锐);浙江大学医学院附属邵逸夫医院输血科(刘志伟、侯渊博、胡梦思、韩业韬)

通讯作者:刘志伟,Email:3191038@zju.edu.cn

然后每管加入低离子溶液 Liss 液 3 滴;混匀后置 37 °C 水浴 15 min。同时在抗人球蛋白卡上标记 A、B 孔,用移液枪各加 50 μ l 放散液,分别加入 0.8%~1% 的经木瓜酶处理的 A、B 红细胞悬液,放入 FYQ 型免疫微柱孵育器中孵育 15 min。采用两种检测方法(微柱卡与试管法),比较二者在检测新生儿溶血试验中释放试验的效果。试管法:用 HITACHI MC450 细胞洗涤专用离心机洗涤 3~5 次,留压积红细胞,用纸吸干,加抗球蛋白抗体 2 滴,血型血清学专用离心机 1 000 g 离心 15 s,肉眼及显微镜观察结果。微柱卡:将抗人球蛋白卡直接放入 TD-A 血型血清学用离心机离心,观察结果。

1.3 新生儿 ABO 溶血病诊断标准 母体血型 IgG 抗体阳性,母婴 ABO 血型不合,新生儿血清胆红素增高,新生儿溶血病 3 项试验阳性。判定见表 1^[7]。

表 1 新生儿溶血病 3 项试验判定标准
(直抗、游离试验、释放试验)

直抗试验	游离试验	释放试验	结论
阴性	阴性	阴性	未能证实 HDN
阳性	阴性	阴性	可疑为 HDN
阴性	阳性	阴性	可疑为 HDN
阴性	阴性	阳性	ABO HDN
阳性	阴性	阳性	ABO HDN
阳性	阳性	阴性	ABO HDN
阴性	阳性	阳性	ABO HDN
阳性	阳性	阳性	ABO HDN

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计数资料采用 χ^2 检验,设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同采血时间的新生儿 ABO 溶血病检出率的比较 检测新生儿溶血的 235 份样本中,确诊为 ABO 血型不合导致胎儿新生儿溶血病有 87 例。不同采血时间的新生儿 ABO 溶血病检出率比较见表 2。

表 2 不同采血时间的新生儿 ABO 溶血病检出率的比较

采血时间	n	ABO 溶血	检出率/%
出生后 1~3 d	113	64	56.64
出生后 4~5 d	80	18	22.50
出生后 6~7 d	29	4	13.80
出生后 7 d 以上	13	1	7.70

由表 2 可见,采血时间在出生后 1~3 d 的 ABO

溶血病检出率与其他三组的比较,差异均有统计学意义(χ^2 分别=22.34、16.97、11.18, P 均 < 0.05),而出身后 6~7 d 及出生后 7 d 以上进行采血,其 ABO 溶血病检出率与出生后 4~5 d 进行采血的检出率比较,差异均无统计学意义(χ^2 分别=1.00、1.51, P 均 > 0.05),出生后 6~7 d 与出生后 7 d 以上进行采血的 ABO 溶血病检出率比较,差异亦无统计学意义($\chi^2=0.32, P > 0.05$)。

2.2 微柱法与试管法检测释放抗体的比较见表 3

表 3 235 例新生儿溶血放散试验结果

检测方法	n	释放试验(阳性)	阳性率/%
微柱法	235	87	37.02*
试管法	235	55	23.40

注:*:与试管法比较, $P < 0.05$ 。

由表 3 可见,微柱法检测释放抗体阳性率明显高于试管法检测释放抗体阳性率,差异有统计学意义($\chi^2=7.43, P < 0.05$)。

3 讨论

HDN 是由于 ABO 血型或/和其他血型系统的胎母血型不相合,从而可能发生胎母输血综合征,胎儿血型抗原刺激母体产生抗体, IgG 性质抗体通过胎盘进入胎儿体内结合胎儿红细胞抗原,使得包被了抗体的红细胞在胎儿脾脏内被巨噬细胞破坏,同时可能会出现孕产妇早期流产、胎儿贫血、水肿、肝脾肿大、新生儿溶血、胆红素脑病等并发症,严重时遗留智力运动发育障碍等神经系统后遗症,甚至导致胎儿及新生儿死亡等情况^[8,9]。

HDN 的早期临床表现为黄疸,患儿通常皮肤染黄迅速,血清胆红素水平短时间内也会上升很快,并随即出现不同程度的贫血,病情严重者甚至能诱发心力衰竭、呼吸窘迫,威胁生命。为确保新生儿生命健康,临床需尽早发现新生儿溶血风险并及时对确诊者进行针对性救治^[10]。新生儿溶血三项试验^[11]包括检测新生儿红细胞直接抗人球蛋白试验、检测新生儿血浆(血清)游离抗体试验、检测新生儿红细胞致敏抗体释放试验,其准确的检测结果是作为临床诊断和临床治疗的最重要证据之一,其检测方法均采用抗人球蛋白法,但是传统的试管法和微柱卡各有其特点。

游离抗体阳性意味着病程将持续一段时间,游离试验是在新生儿血清中发现有不配合的抗体,由于抗体不足而导致检测结果阴性,故阳性率较低^[12];

抗体释放试验是判断新生儿红细胞被IgG抗-A(B)致敏的有效方法,其阳性即可确诊ABO-HDN^[13,14];直接抗人球蛋白试验由于Ig抗体通过胎盘进入胎儿体后,部分抗体被中和,阳性说明婴儿红细胞已被血型抗体致敏,故只有单项直接抗人球蛋白试验呈阳性时临床免疫反应较轻^[15]。本研究发现,出生后1~3 d的ABO溶血检出率为56.64%,出生后4~5 d的ABO溶血检出率为22.50%,出生后6~7 d的ABO溶血检出率为13.80%,出生后>7 d的ABO溶血检出率为7.70%。出生后1~3 d的ABO溶血检出率明显高于其他分组(P 均 <0.05),随着采血天数的增加,ABO溶血检出率明显降低。因此尽早采集患儿的血液标本行血清学检测能提高新生儿ABO溶血病的检出率。通常情况下,ABO HDN的诊断是在患儿出现黄疸后查母婴血型,血型不合再查溶血3项,往往可能已经在出生2~3 d,若确诊后再进行治疗,其治疗效果明显低于出生后48 h内进行干预者^[16]。因为黄疸的迟发,这也是导致很多患儿采血时间在4 d后的原因。再者HDN的临床表现轻重不一,轻症仅出现轻度黄疸,临床上对没有明显溶血征象的新生儿并不采取特殊干预,易被视为生理黄疸而漏诊,可能造成新生儿神经系统不可逆损伤。因此,为了避免HDN的漏诊和误诊,应该在孕妇围产期体检时就检查夫妻血型,当孕妇为O型,其丈夫非O型时,用微柱凝胶法进行IgG抗A(B)的抗体效价测定,更加有利于新生儿ABO溶血病的诊断与治疗。

本次研究结果还显示,微柱卡与试管法在ABO新生儿溶血放散试验的应用效果比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。微柱凝胶技术是建立在传统血型血清学基础上的一项免疫检测技术^[17]。该方法可避免抗人球蛋白被洗涤后残留的盐分稀释而产生的假阴性^[18]。其敏感度高于试管法^[19],微柱凝胶法对抗体效价的检出水平比试管法平均高出1~3个滴度^[20]。微柱卡试验结果与临床表现符合率高,提高了临床诊断和治疗的精准性,可发挥重要作用^[21,22],避免漏检、耽误早期治疗。在ABO-HDN中采用传统试管酶试验法,由于该操作步骤繁多,时间较长,重复性相对较差,抗体性质和亲和力低,易出现假阴性,容易发生漏诊^[23]。

综上所述,随着采血时间的推移,新生儿的溶血病阳性检出率逐渐下降。在进行溶血3项测定时,一定要重视标本的采集因素,确保检验结果的准确性。对于有临床表现而溶血3项试验阴性者,

就要考虑是否因为疾病的发展而导致溶血性抗体消耗以致检测结果假阴性还是其他疾病导致的溶血病。因此,及时有效尽早地采集标本,对新生儿溶血病的检出具有重要的意义,也为尽早有效的治疗提供更有效的依据。并且采用微柱卡结合抗人球蛋白法做溶血释放试验结果更加可靠。

参考文献

- 1 蔡晓红,王学锋.胎儿新生儿溶血病的实验诊断[J].诊断学理论与实践,2015,14(6):507-510.
- 2 张爱,郭永建.英国孕产妇出血管理系列指南主要推荐及启示(二)—《存在红细胞抗体孕妇管理指南》[S].中国输血杂志,2016,29(6):658-666.
- 3 Basu S, Kaur R, Kaur G. Hemolytic disease of the fetus and newborn: Current trends and perspectives[J]. Asian J Transfus Sci, 2011, 5(1):3-7.
- 4 张勇萍,杨世明,苏小花.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.
- 5 李伟生,杨辅直.新生儿ABO溶血病早期诊治及转归分析[J].广东医学,2012,33(10):1429-1430.
- 6 闫沁,陈剑,赵虹.2种放散试验方法对于新生儿ABO溶血病检测的临床效果评价[J].国际输血及血液学杂志,2016,39(6):480-483.
- 7 黄柳梅.890例新生儿ABO溶血三项试验检测结果分析[J].国际检验医学杂志,2015,36(1):113-115.
- 8 王婧,潘家华.母婴Rh血型不合溶血病的诊治进展[J].中国新生儿科杂志,2016,31(2):152-155.
- 9 Moise KJ. Hemolytic disease of the fetus and newborn[J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2013, 11:664-666.
- 10 马琳,杨涛.TBA检测对新生儿溶血症的临床意义[J].中国妇幼保健,2015,30(18):2999-3000.
- 11 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.
- 12 Zonneveld R, Schonewille H, Brand A, et al. Evaluation of the presence of clinically significant hemolytic disease of the fetus and newborn due to RhD antibodies in multi-ethnic suriname[J]. Ann Glob Health, 2016, 82(3):395-396.
- 13 阳志勇,孙涛.抗体筛查在门诊产科常规检测中预防HDN的应用价值——附1例抗-M引起的新生儿溶血病[J].中国免疫学杂志,2017,33(2):278-279.
- 14 Levitt RN, Gourri E, Gassner C, et al. Molecular characterization and multidisciplinary management of Gerbich hemolytic disease of the newborn[J]. Pediatr Blood Cancer, 2018, 65(6):27014.

(下转第1125页)

多篇小样本临床研究认为年龄与颅内出血转化无明显相关,均以80岁作为年龄分界进行分组比较^[8,9]。

综上所述,老龄(>74岁)可能是急性缺血性脑卒中静脉溶栓后出血性转化的危险因素。本次研究为单中心回顾性研究,故具有一定的局限性,仍需大样本量的临床研究验证。

参考文献

- 1 Yaghi S, Willey JZ, Cucchiara B, et al. Treatment and outcome of hemorrhagic transformation after intravenous alteplase in acute ischemic stroke: A scientific statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association[J]. Stroke, 2017, 48(12):152-171.
- 2 Seet RC, Rabinstein AA. Symptomatic intracranial hemorrhage following intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke: A critical review of case definitions[J]. Cerebrovasc Dis, 2012, 34(2):106-114.
- 3 吴娅, 刘承春, 李玮, 等. 5种评分系统对不同时间窗急性脑梗死静脉溶栓后出血转化风险预测差异的比较研究[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(17):1744-1749.
- 4 谷远峰, 陈会生. 五种评分系统对急性缺血性脑卒中静脉溶栓后出血转化风险预测差异的比较研究[J]. 解放军医药杂志, 2016, 28(3):26-32.
- 5 Kimura K, Minematsu K, Yamaguchi T. Japan Multicenter Stroke Investigators' Collaboration (J-MUSIC). Atrial fibrillation as a predictive factor for severe stroke and early death in 15,831 patients with acute ischaemic stroke[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005, 76(5):679-683.
- 6 Heo SH, Yi SH, Lee D, et al. Prediction of hemorrhagic transformation and functional outcome using hat score in acute ischemic stroke patients treated with intravenous alteplase[J]. J Korean Neurol Assoc, 2012, 30(2):110-115.
- 7 Josef Y. Effectiveness of alteplase in the very elderly after acute ischemic stroke[J]. Clin Interv Aging, 2013, 24(8):963-974.
- 8 杨建道, 胡丽燕, 宋彦彦, 等. 高龄急性脑梗死患者重组组织型纤溶酶原激活剂静脉溶栓的疗效及安全性分析[J]. 中国卒中杂志, 2014, 9(11):905-910.
- 9 张立红, 彭道勇, 张策, 等. 不同年龄急性脑梗死患者阿替普酶静脉溶栓疗效及安全性分析[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2018, 20(9):962-965.

(收稿日期 2020-08-13)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第1122页)

- 15 贾金平, 黄小霞. 脐带血清学检测在新生儿ABO溶血病早期诊断中的应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(2):161-163.
- 16 沈美萍, 陈士华. 脐带血标本用于检测新生儿溶血三项的临床价值[J]. 浙江医学教育, 2014, 13(2):48-50.
- 17 Nathalang O, Chuansumrit A, Prayoonwivat W, et al. Comparison between the conventional tube technique and the gel technique in direct antiglobulin tests[J]. Vox Sang, 1997, 72(3):169-171.
- 18 武建. 柱凝集技术的临床应用及其实验研究现状[J]. 中国输血杂志, 2003, 16(5):369-371.
- 19 钟月华, 谭静, 黄华华. 微柱凝胶技术在新生儿溶血性疾病诊断的应用[J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(8):613-614.
- 20 李永乾, 张紫棉, 王毅. 两种方法检测新生儿溶血三项的对比研究[J]. 河北医科大学学报, 2005, 46(6):72-73.
- 21 黄会金. 微柱凝胶卡式法和试管抗人球蛋白法在新生儿ABO溶血三项试验中的效果观察[J]. 中国当代医药, 2015, 22(18):129-131.
- 22 韦光萍, 杨文勇. 新生儿溶血病148例临床及实验室检查结果分析[J]. 中国中西医结合儿科学, 2014, 6(1):67-68.
- 23 符宝铭, 黄柳梅, 石明芳. 新生儿溶血三项试验两种方法的对比分析[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(21):3270-3272.

(收稿日期 2020-11-10)

(本文编辑 蔡华波)