

· 论 著 ·

微量血检测红细胞表面抗体诊断 小儿自身免疫性溶血性贫血研究

李云, 易红玲, 贺湘玲, 梁沫, 汤学专

(湖南省人民医院儿科, 湖南 长沙 410002)

[摘 要] 目的 采用微量血检测自身免疫性溶血性贫血(AIHA)患儿的红细胞表面抗体,对其方法与诊断学进行探讨。方法 对145例疑为AIHA患儿用微量方法检测直接Coombs试验及红细胞表面单价抗体,并对其中30例病人进行了静脉血脱纤维蛋白后的Coombs试验,对两种方法进行比较。结果 145例标本共检出AIHA 13例,所有患者Coombs试验阳性,其中单价抗体IgG阳性有7例,IgG+C₃ 1例,IgG+IgM+C₃ 3例,IgM+C₃ 2例。同时对30例检测对象进行了微量血与脱纤维蛋白血的对比,其中4例阳性者,两种检测方法一致,26例阴性结果中微量血假阳性率3.85%,脱纤维蛋白血假阳性率为7.69%,二者差异无统计学意义($P>0.05$)。对两种方法洗涤后红细胞上清液分析显示,3次洗涤后上清液中所含总蛋白差异无显著性($P>0.05$)。结论 用微量血检测红细胞表面抗体诊断AIHA与静脉脱纤维蛋白血检测结果基本一致,采血少,操作方便,且易于复查。

[关键词] 微量血;Coombs试验;自身免疫性溶血性贫血;儿童

[中图分类号] R556.6+2 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2002)01-0015-03

Micro Blood Sample for RBC Surface Antibody in the Diagnosis of Childhood Autoimmune Hemolytic Anemia

Li Yun, Yi Hong-Ling, He Xiang-Ling, et al.

Department of Pediatrics, Hunan People's Hospital, Changsha 410002, China

Abstract: **Objective** To study the significance of the micro blood sample for surface antibody of red blood cells (RBC) in the diagnosis of childhood autoimmune hemolytic anemia (AIHA). **Methods** The RBC surface antibody was measured in 145 children with suspected AIHA using the micro blood sample. Of them, 30 cases, besides using the micro blood sample, were measured using the routine method — the direct Coombs test by taking venous blood of defibrinogen at the same time. **Results** Of the 145 patients 13 were diagnosed AIHA by the micro blood sample. The direct Coombs test was positive in the 13 cases. Seven of them had a positive result with univalent antibody IgG, 1 with IgG+C₃, 3 with IgG+IgM+C₃ and 2 with IgM+C₃. In 30 cases with the two tests for the RBC surface antibody, 4 had a positive result with the direct Coombs test. The results of the two methods were consistent. In 26 negative cases, there was a false positive (3.85%) of univalent antibody IgM by the minim finger blood test, and 2 false positive (7.69%) of IgM using the routine method. There was no statistic difference between the two methods ($P>0.05$). No difference was noted in the protein of supernatant fluid after centrifugation between the two methods ($P>0.05$). **Conclusions** The micro blood sample for RBC surface antibody in the diagnosis of childhood AIHA is reliable and convenient for re-test.

Key words: Micro blood sample; Coombs test; Autoimmune hemolytic anemia; Child

小儿自身免疫性溶血性贫血(autoimmune hemolytic anemia, AIHA)通过检测红细胞表面存在

的抗体(Coombs试验)诊断,过去采用脱纤维蛋白法获得红细胞,静脉采血,量较多,不适用于小儿。我

们采用微量血检测红细胞表面抗体,较好地解决了这一问题,现报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象

所有对象均来自于本院儿科住院患者,自1996年1月至2000年12月,对145例怀疑急慢性溶血性贫血患儿进行微量血红细胞表面抗体检测,其中30例进行了静脉血脱纤维蛋白后的Coombs试验,观察与微量血阳性与阴性结果的可比性。

1.2 材料与方法

1.2.1 材料 抗人球蛋白试剂及单价IgG,IgM,IgA,C₃抗血清(天津血研所提供),抗D血清(上海血站提供);“O”型Rh阳性红细胞,生理盐水等。

1.2.2 检测方法 所测方法均为Coombs试验直接法,具体操作步骤如下。①生理盐水10 ml置刻度离心管内,手指指尖处采血,用微量吸管采毛细血管血40 μ l,摇匀后离心,用生理盐水洗涤3次后弃上清,加生理盐水1 ml配成约2%红细胞生理盐水悬液;②80×60 ml平板玻璃用蜡笔均分为12个小格,将抗人球蛋白及单价抗人IgG,IgA,IgM和C₃抗血清分别吸出10 μ l,滴入各小格中,每格加入洗涤后的2%被检红细胞悬液20 μ l,摇匀;④放入37℃温箱温盒内,每10 min旋转1次,30 min看结果,阳性者肉眼可见凝集反应或显微镜下可见红细胞凝集。

1.2.3 参照物对照方法 ①脱纤维蛋白红细胞Coombs试验对照 红细胞采集用静脉抽血2~3 ml于小烧瓶内,经玻璃小珠摇晃后去纤维蛋白,红细胞洗涤,浓度配制同前,检测方法同经典操作。②阴性对照,用正常“O”型红细胞加抗人球蛋白血清,结果为阴性。③阳性对照,用不完全抗D抗体致敏Rh阳性红细胞,孵育30 min后反复洗涤3次,配成2%的红细胞悬液,再用抗人球蛋白及单价抗体进行检测,观察阳性结果。④Coombs与单价抗体阳性结果对照,凡抗人球蛋白试验阳性,观察各单价抗体的阳性结果。

1.3 统计学处理

采用医用统计方法进行 χ^2 检验或 t 检验。

2 结果

在检测的标本中,5年145例标本共检出AIHA 13例。所有患者Coombs试验阳性,并有一种或几

种单价抗体阳性。其中单价抗体IgG型7例,IgG+C₃1例,IgG+IgM+C₃3例,IgM+C₃2例。所有病例符合AIHA的临床诊断。病因诊断为婴儿肝炎综合征2例(1例为巨细胞病毒感染,1例弓形虫感染),Evans综合征1例,新生儿Rh血型不合溶血病1例,支原体肺炎2例,继发于淋巴瘤1例,原因不明6例。

在检测过程中,对30例检测对象同时进行了微量血与脱纤维蛋白血的对比。其中有4例Coombs阳性者,单价抗体分别为IgG 3例,IgG+IgM+C₃1例,二种方法结果一致。26例阴性结果中,脱纤维蛋白血有2例单价抗体IgM阳性,微量血1例IgM阳性,假阳性率分别为7.69%和3.85%,两者差异无显著性意义($\chi^2=0.35$, $P>0.05$)。在进行的对照试验中,阳性对照除单价抗体IgA稍不稳定外,均为阳性反应,阴性对照均为阴性反应。

为了解微量法与脱纤维蛋白法红细胞洗涤后上清液的蛋白情况,我们对10份洗涤后红细胞标本进行了蛋白分析对比。第1次洗涤离心后的上清液中,微量血总蛋白为(1.51 ± 0.37)g/L,脱纤维蛋白血总蛋白为(2.9 ± 0.85)g/L,两者比较,差异有显著性意义($t=14.00$, $P<0.01$)。洗涤3次后,离心的上清液中,微量血总蛋白为(1.09 ± 0.18)g/L,脱纤维蛋白血总蛋白为(1.08 ± 0.18)g/L,两者差异无显著性($t=1.42$, $P>0.05$)。白蛋白在第2次洗涤后两组均为零。

3 讨论

AIHA是人类自身免疫性疾病中相对较为常见的疾病,虽目前免疫机理尚不清楚^[1],但开展多年的Coombs试验检查仍为诊断该病的主要依据^[2]。国内1986年施文霞等^[3]首次提出特异性免抗人IgG与C₃的单价抗体Coombs试验以来,迄今已有单价抗体分型的IgG,IgM,IgA,C₃等检查的报告^[5],以成人较多,儿童较少报告,可能与该检测法开展工作较少及由于其抽血困难,限制了工作开展。我们采用微量血测定红细胞表面抗体发现AIHA患者13例,结果符合临床诊断,由于采血少,操作方便,对疑为AIHA的患者,可随时进行检查与复查。如1例Evans综合症的患者,短期内曾进行过5次复查,也证实其阳性结果的一致性。在AIHA单价抗体检测中,其中以单纯IgG型较多,与文献报告结果一致^[4],但与成人组则有差别^[5]。

直接Coombs试验的红细胞处理有多种方

法^[6] ,但均为静脉采血 ,多数专著均采用脱纤维蛋白获得红细胞 ,经反复生理盐水洗涤 ,除去血清中球蛋白及白蛋白类物质 ,通过检测观察红细胞上的抗体与抗人球蛋白结合产生红细胞凝集反应判定阳性结果。我们采用微量血测定红细胞表面抗体 ,主要原理是利用生理盐水具有保护红细胞的作用 ,同时由于少量血进入大量盐水中 ,凝血因子大量稀释而不发生血液凝固。该法测定结果与脱纤维蛋白血比较两者一致。两种采集血液的方法经洗涤后的上清液蛋白含量分析 ,3 次洗涤后 ,两组总蛋白含量差异无显著性 ,说明两者红细胞液均符合试验要求。

微量血与脱纤维蛋白血在检测中均曾出现单价抗体的假阳性反应。由于所测的假阳性者均为罹患某些疾病的患儿 ,在检测中很难完全排除其红细胞表面上不存在少量抗体 ,可能只是未引起临床溶血征象而已 ,因此在判断 Coombs 试验及单价抗体时 ,应从二者结果关系、阳性对照、阴性对照及临床表现加以客观判断。

[参 考 文 献]

[1] Barcellini W ,Clerici G ,Montesano R ,et al. In vitro quantitation of anti-red blood cell antibody production in idiopathic autoimmune hemolytic anemia :effect of mitogen and cytokine stimulation[J]. Br J Haematol ,2000 ,111(2):452 - 460.

[2] 巴德年 . 当代免疫学技术与应用[M]. 北京 :北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社出版 ,1998 ,858 - 560.

[3] 施文霞 ,丁训杰 ,刘文廉 ,等 . 温抗体型自身免疫溶血性贫血的免疫分型及临床意义[J]. 中华血液学杂志 ,1986 ,7(2):81 - 84.

[4] Agarwal B. Autoimmune hemolytic anemia[J]. Indian J Pediatr ,1998 ,65(5):663 - 668.

[5] 张益枝 ,储榆林 ,陈桂棚 ,等 . 164 例 Coombs 试验阳性自身免疫性溶血性贫血的临床研究[J]. 中华血液学杂志 ,1998 ,19(11):573 - 575.

[6] 叶应妩 ,李健斋 ,王玉琛 . 临床实验诊断学[M]. 北京 :人民卫生出版社 ,1989 ,1233 - 1234.

(本文编辑 :刘丽旭)