

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190230

全自动微柱凝胶法用于直接抗人球蛋白试验初筛的临床观察

顾晨晨, 曹敏凤, 戎瑞明, 吴肇颀*

复旦大学附属中山医院输血科, 上海 200032

[摘要] **目的:**观察全自动微柱凝胶法用于直接抗人球蛋白试验初筛的结果及假阳性标本的临床特征。**方法:**采用全自动微柱凝胶法对1 205例临床送检标本进行直接抗人球蛋白试验初筛,阳性结果标本采用试管法进行IgG/C3d分型。**结果:**在1 205例标本中检出阳性180例(阳性率14.9%),凝集强度分布为:+++ 6例、++ 23例、+ 41例、+ 95例、+/- 15例。18例初筛阳性标本试管法分型结果为阴性,所有后续试管法阴性均来自于弱阳性患者,多见于淋巴造血系统疾病及自身免疫性疾病患者中。**结论:**全自动微柱凝胶法用于直接抗人球蛋白试验初筛具有操作标准化、结果清晰可保存、敏感性高的优点,小部分假阳性可通过严格标本前处理质控等操作,来保证结果的可靠性。

[关键词] 全自动微柱凝胶法;直接抗人球蛋白试验;临床观察

[中图分类号] R 457.1⁺3 **[文献标志码]** A

Application of automated microcolumn gel method for clinical screening of direct antiglobulin test

GU Chen-chen, CAO Min-feng, RONG Rui-ming, WU Bo-ting*

Department of Transfusion, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the results of automated microcolumn gel method in direct antiglobulin test screening and the clinical characteristics of false positive results. **Methods:** A total of 1205 samples from Dec. 2016 to Nov. 2017 were included in the study. Automated microcolumn gel method was used for direct antiglobulin test screening, when the result was positive, manual tube method was used to further define the type of IgG/C3d. **Results:** Out of the 1 205 samples, 180 (14.9%) were positive, which were graded as follows: +++, 6 cases; ++, 23 cases; +, 41 cases; +, 95 cases; +/-, 15 cases. And results of 18 cases were positive using the gel method (+, 13; +/-, 5), and were negative using the tube method and mostly were from patients with lymphatic hematopoietic system disease or autoimmune disease. **Conclusions:** Automated microcolumn gel method has the advantages of standardized operation, clear and preservable results and high sensitivity, but may have a certain proportion of false positives which can be excluded by strict pretreatment quality control.

[Key Words] automated microcolumn gel method; direct antiglobulin test; clinical observation

直接抗人球蛋白试验(direct antiglobulin test, DAT)主要用于检测红细胞上结合的不完全抗体,在自身免疫性溶血性贫血、免疫性溶血性输血反应、新生儿溶血病等疾病中具有重要诊断价值,但传统的试管法 DAT 完全依赖手工操作,且需要检测人员具有一定的判读结果经验,并不适合用于大批量临床标本检测^[1-2]。近年来日益成熟的微柱凝胶法与传统试管法相比具有标准化、操作简便、结果清晰、敏感性高等优点,且可实现全自动化检测^[3-5]。复旦大学附属中山医院输血科自2016年开始采用全自动微柱凝胶法用于临床标本的 DAT 初筛,显著提高了报告速度和一致性,但也发现部分全自动微柱凝胶法初筛阳性标本可能受临床因素

干扰而致假阳性。为进一步评估全自动微柱凝胶法用于临床标本 DAT 初筛的价值和报告注意事项,本研究对我院1 205例 DAT 结果进行了总结,并分析了与全自动微柱凝胶法假阳性有关的临床因素,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集2016年12月至2017年11月在复旦大学附属中山医院输血科进行 DAT 检测的住院患者资料1 205例。

1.2 DAT 检测 使用枸橼酸钠抗凝真空采血管送检的患者外周全血标本,采用全自动微柱凝胶法(IH-1000全自动血型分析仪, Biorad, 美国)进行

[收稿日期] 2019-02-23

[接受日期] 2019-10-23

[作者简介] 顾晨晨, 技师. E-mail: gu.chenchen@zs-hospital.sh.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-64041990, E-mail: wu.boting@zs-hospital.sh.cn

DAT初筛。微柱凝胶法低离子抗人球蛋白卡(ID-Card LISS/Coombs)由美国Biorad公司提供。阳性者采用试管法进行复检和分型。试管法直接抗人球蛋白试验操作参见《输血技术学》^[6]。用于试管法的单克隆抗人球蛋白试剂(多特异性、抗-IgG、抗-C3d)由上海血液生物医药有限责任公司提供。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0对所得数据进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验或U检验,计数资料以n(%)表示,采用 χ^2 检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 住院患者DAT检测阳性率及反应强度 2016年12月至2017年11月共进行DAT检测1205例,全自动微柱凝胶法初筛阳性180例(14.9%),其中卅6例(3.3%)、卅卅23例(12.8%)、卅卅41例(22.8%)、+95例(52.8%)、+/-15例(8.3%)。阳性标本采用试管法复检阴性18例(10.0%),其中13例初筛结果为+,其余5例为+/-,详见图1。

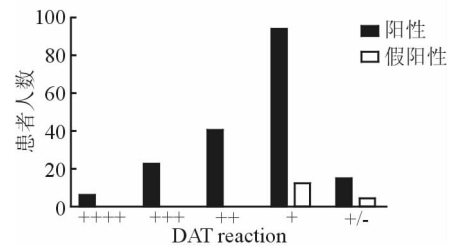


图1 全自动微柱凝胶法DAT初筛阳性标本反应强度分布及相应假阴性比例

2.2 全自动微柱凝胶法DAT初筛假阳性患者临床特征 结果(表1)显示,全自动微柱凝胶法DAT初筛假阳性患者主要来自于血液科(12例),其余包括风湿免疫科(2例)、感染病科(2例)、消化科(1例)及急诊科(1例),其中淋巴造血系统肿瘤患者12例、自身免疫性疾病患者5例、病毒感染患者1例。患者中位年龄63.0(21~90)岁,男性女性各9例,血红蛋白中位值86.5(43~117)g/L,网织红细胞比值1.85(0.6~4.0)%,均未见明显溶血征象。

实验室检查发现白细胞升高4例(例8、例9、例11、例16);血清总球蛋白升高7例(例2、例3、例9、例12、例13、例14、例16),其中1例(例12)血清

表1 全自动微柱凝胶法直接抗人球蛋白试验假阳性患者临床特征

No.	性别	年龄	送检部门	诊断	DAT初筛	Hb (g/L)	Ret (%)	白细胞 ($\times 10^9/L$)	球蛋白 (g/L)	IgG (g/L)	IgA (g/L)	IgM (g/L)	血清蛋白电泳/免疫固定电泳	近期输血史	近期生物制剂应用史
1	女	33	血液科	急性髓系白血病	+	43	1.3	5.09	37	17.87	3.11	3.81	阴性	无	无
2	女	73	血液科	骨髓增殖性肿瘤	+	64	1.9	9.06	44	24.46	2.52	2.17	阴性	无	无
3	男	69	血液科	多发性骨髓瘤	+	116	1.1	7.16	47	28.33	0.34	0.54	阴性	无	无
4	男	41	血液科	骨髓增生异常综合征	+/-	99	1.3	1.37	24	11.12	1.80	1.85	阴性	无	无
5	女	64	血液科	急性B淋巴细胞白血病	+/-	72	2.5	4.65	14	6.19	0.79	0.37	阴性	单采血小板2袋	无
6	女	52	血液科	弥漫大B细胞淋巴瘤	+/-	88	4.0	3.01	22	6.55	2.21	0.39	阴性	无	利妥昔单抗
7	男	71	血液科	单克隆球蛋白血症	+	105	1.1	5.95	32	23.77	0.47	0.25	M蛋白/IgG- κ	无	无
8	男	60	血液科	慢性淋巴细胞白血病	+	105	2.2	19.48	28	15.76	0.23	0.06	M蛋白/IgG- κ	无	利妥昔单抗
9	男	63	血液科	B淋巴母细胞淋巴瘤	+	88	2.1	11.75	45	31.86	2.65	0.57	阴性	悬浮红细胞5U 单采血小板1袋	无
10	男	63	血液科	急性髓系白血病	+/-	115	1.7	1.71	33	22.97	3.30	0.87	M蛋白/阴性	悬浮红细胞2U 单采血小板6袋	无
11	男	65	血液科	慢性髓系白血病	+	62	0.6	134.78	29	12.87	2.23	0.62	阴性	无	无
12	女	21	血液科	免疫性血小板减少症	+/-	74	2.5	2.33	46	18.84	0.92	0.99	阴性	单采血小板1袋	静脉丙种球蛋白
13	女	28	风湿免疫科	系统性红斑狼疮	+	96	ND	2.62	41	30.81	2.19	0.57	阴性	无	无
14	女	64	风湿免疫科	干燥综合征	+	78	2.5	3.05	68	50.34	6.98	1.72	M蛋白/IgG- κ	无	无
15	男	65	感染病科	间质性肺炎	+	85	1.6	8.74	29	ND	ND	ND	阴性	无	无
16	女	50	感染病科	干燥综合征	+	75	ND	13.96	40	30.64	3.81	1.28	M蛋白/阴性	无	无
17	女	90	急诊科	骨髓增生异常综合征	+	44	1.8	2.73	30	ND	ND	ND	阴性	悬浮红细胞2U	无
18	男	39	消化科	慢性乙型肝炎	+	117	3.7	9.69	31	ND	ND	ND	阴性	无	无

所有患者试管法抗人球蛋白试验及分型阴性、抗体筛选阴性,近期输血史和生物制剂应用史均为检测前30天内。ND:未查。单采血小板1袋:血液成分单采机采集来自一个献血者的血小板,含有的血小板数量至少在 2.5×10^{11} 以上

IgG 未见升高但有近期输注静脉丙种球蛋白史,其余 6 例均为血清 IgG 升高(1 例干燥综合征患者血清免疫固定电泳提示 IgG- κ 单克隆球蛋白);另有 2 例(例 7、例 8)血清总球蛋白未见升高但检出 IgG- κ 单克隆球蛋白,1 例(例 1)血清总球蛋白未见升高但血清 IgM 升高。

在 DAT 检测前 30 d 内,5 例患者接受过输血治疗,其中 3 例(例 9、例 10、例 17)输注悬浮红细胞、4 例(例 5、例 9、例 10、例 12)输注单采血小板;3 例患者接受过生物制剂治疗,其中 2 例(例 6、例 8)使用了利妥昔单抗、1 例(例 12)使用了静脉丙种球蛋白。

3 讨论

作为建立于 20 世纪 40 年代的经典免疫血液学实验方法,目前 DAT 仍然是临床诊断红细胞免疫相关疾病时最重要的实验室检查,其技术核心是对红细胞膜上所结合免疫球蛋白的检出,传统试管法 DAT 阳性至少需要每个红细胞上结合 150~500 个 IgG 分子^[1,7]。近年来随着免疫血液学技术的发展,出现了基于微柱凝胶技术、固相技术、流式细胞技术等改良 DAT 检测方法,作为传统试管法 DAT 的补充,一方面可以提高 DAT 检测的敏感性,另一方面有利于将 DAT 检测自动化^[8]。本研究采用全自动微柱凝胶法用于临床标本的 DAT 初筛,在 1 205 例住院患者中总体阳性率为 14.9%,其中弱阳性(+)及(+/-)占 61.1%,而所有后续试管法复检阴性者(18 例)均来自于弱阳性患者,分别占初筛+及+/-总数的 13.7%(13/95)和 33.3%(5/15),其临床资料均未提示溶血征象,考虑全自动微柱凝胶法 DAT 初筛假阳性可能大,此结果也符合既往文献报道 DAT 反应强度是诊断自身免疫性溶血性贫血的最重要指标之一^[8-9],DAT 弱阳性(反应强度+以下)时非特异性病因相对较多。

临床标本 DAT 阳性的机制主要包括红细胞膜上免疫球蛋白/补体致敏、免疫球蛋白非特异性吸附以及致敏红细胞清除速率降低等^[10-13]。临床上导致 DAT 假阳性最常见的原因是免疫球蛋白非特异性吸附,多见于淋巴造血系统肿瘤产生单克隆或寡克隆增高的球蛋白,以及自身免疫性疾病或感染性疾病过程中产生多克隆增高的球蛋白^[10-11],本研究在 18 例 DAT 假阳性患者中发现 10 例存在不同程度的球蛋白升高或异常球蛋白,提示免疫球蛋白

非特异性吸附在全自动微柱凝胶法 DAT 检测中仍是假阳性的主要原因。此外由于全自动检测时简化了红细胞洗涤过程,临床标本中过高的白细胞数也可能干扰受检红细胞在凝胶毛细管中的离心沉降过程,从而导致 DAT 假阳性。血液循环中被免疫球蛋白致敏但未持续活化补体的红细胞通常经由单核-巨噬细胞系统清除,某些病理状况可造成单核-巨噬细胞系统功能异常,如高免疫球蛋白血症时巨噬细胞表面 Fc 受体饱和、系统性红斑狼疮中巨噬细胞吞噬功能下降等,进而导致生理状况下应被清除的红细胞仍存留于循环中,在使用更为敏感的微柱凝胶法时易引起 DAT 弱阳性^[12-13]。

全自动微柱凝胶法 DAT 检测受标本前处理因素影响小、检验过程标准化、结果清晰可保存,很大程度上避免了传统试管法 DAT 检测过程中手工操作和结果判读过程中可能产生的误差,能够满足各级别医疗机构临床标本初筛的要求,但临床部门需注意避免在多次输血或应用特殊生物制剂后短期内送检,以减少 DAT 检测结果解释困难、需要重复送检的情况。本研究进一步指出,全自动微柱凝胶法 DAT 可能存在的假阳性集中于弱阳性标本中,大部分可以发现免疫球蛋白异常、白细胞升高等明确干扰检测的因素。但也有小部分假阳性结果可能反映了疾病相关的单核-巨噬细胞系统功能异常,被免疫球蛋白致敏但未被及时清除的红细胞容易被敏感的方法检测得到,值得扩大标本量进一步研究。

参考文献

- [1] JUDD W J. Red Cell Immunology and Compatibility Testing [M]. 4th edition. Chichester: Wiley-Blackwell Publishing, 2009:69-75.
- [2] BRECHER M. Technical manual AABB[M]. 14th edition. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2002: 497,667.
- [3] NATHALANG O, CHUANSUMRIT A, PRAYOOMWIWAT 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.
- [4] NOVARETTI M C, JENS E, PAGLIARINI T, et al. Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test: a large study [J]. J Clin Lab Anal, 2004, 18(5):255-258.
- [5] 陈学军, 徐兴强, 金小波, 等. 凝胶抗球蛋白试验的特点及实验分析[J]. 检验医学, 2004, 19(4):337-340.
- [6] 王培华. 输血技术学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2003:

- 226-227.
- [7] CHENG D, HAO Y. Comparative evaluation of the microcolumn gel card test and the conventional tube test for measurement of titres of immunoglobulin G antibodies of blood group A and blood group B[J]. *J Int Med Res*, 2011, 39(3):934-943.
- [8] LAI M, LEONE G, LANDOLFI R. Autoimmune hemolytic anemia with gel-based immunohematology tests[J]. *Am J Clin Pathol*, 2013, 139(4):457-463.
- [9] DUBARRY M, CHARRON C, HABIBI B, et al. Quantitation of immunoglobulin classes and subclasses of autoantibodies bound to red cells in patients with and without hemolysis[J]. *Transfusion*, 1993, 33(6):466-471.
- [10] HEDDLE N M, KELTON J G, TURCHYN K L, et al. Hypergammaglobulinemia can be associated with a positive direct antiglobulin test, a nonreactive eluate, and no evidence of hemolysis[J]. *Transfusion*, 1988, 28(1):29-33.
- [11] BIÇAKÇI Z, ÖZTÜRKMEN S, AKYAY A, et al. False positive result of the direct antiglobulin test (DAT): the role of the elevated level of immunoglobulin G [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2012, 29(7):611-619.
- [12] WIN N, ISLAM S I, PETERKIN M A, et al. Positive DAT due to antiphospholipid antibodies in normal health blood donors[J]. *Vox Sang*, 1997, 72(3):182-184.
- [13] LI M, ZHANG W, LENG X, et al. Chinese SLE Treatment and Research group (CSTAR) registry: I. Major clinical characteristics of Chinese patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Lupus*, 2013, 22(11): 1192-1199.

[本文编辑] 翟铖铖, 贾泽军