

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/80 (2006.01)

G01N 33/96 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02156800.6

[45] 授权公告日 2006 年 1 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1235048C

[22] 申请日 2002.12.18 [21] 申请号 02156800.6

[71] 专利权人 北京市红十字血液中心

地址 100088 北京市北三环中路 37 号

[72] 发明人 范道旺 孙 芸 钟国萍 姜爱萍

审查员 石剑平

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 黄 健

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称

新生儿溶血病检测试剂盒及其应用

[57] 摘要

本发明提供一种新生儿溶血病检测试剂盒及其应用。该试剂盒包括含有巯基试剂的 IgM 抗体灭活液，抗人球蛋白血清，O 型筛选红细胞，从而实现了新生儿溶血病检测的标准化，并大大提高了检测的准确性，为临床产科及儿科对新生儿溶血病体外进行正确的产前预报及产后早期诊断提供方便。

1. 一种新生儿溶血病检测试剂盒，其包括含有巯基试剂的 IgM 抗体灭活液，抗人球蛋白血清，O 型筛选红细胞；其中所述的 IgM 抗体灭活液含有 0.01M-0.02M 的二硫苏糖醇和滴度为 4-16 的 A 及 B 型物质混合物。
- 5 2. 如权利要求 1 所述的新生儿溶血病检测试剂盒，其中所述的 IgM 抗体灭活液中二硫苏糖醇浓度为 0.01M，A 及 B 型物质混合物滴度为 8。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的新生儿溶血病检测试剂盒，其进一步含有抗人球蛋白增强液，该抗人球蛋白增强液含有
- | | |
|-----------|--|
| 氯化钠 | $(1.73 - 1.77) \times 10^{-3} \text{ g/mL};$ |
| 10 甘氨酸 | $(1.78 - 1.82) \times 10^{-2} \text{ g/mL};$ |
| 叠氮钠 | $(4.7 - 5.3) \times 10^{-4} \text{ g/mL};$ |
| 十二水合磷酸氢二钠 | $(4.66 - 4.68) \times 10^{-4} \text{ g/mL};$ |
| 磷酸二氢钾 | $(2.29 - 2.31) \times 10^{-4} \text{ g/mL};$ |
- 将以上试剂用蒸馏水溶解，调 pH 值为 6.6-6.8。
- 15 4. 如权利要求 3 所述的新生儿溶血病检测试剂盒，其进一步含有标准试剂红细胞或抗-D。
5. 如权利要求 1 或 2 所述的新生儿溶血病检测试剂盒，其进一步含有标准试剂红细胞。
6. 如权利要求 1 或 2 所述的新生儿溶血病检测试剂盒，其进一步
- 20 含有抗-D。
7. 权利要求 1 所述的新生儿溶血病检测试剂盒，其中所述抗人球蛋白血清的制备方法如下：以 IgG 和完全弗氏佐剂免疫动物，静脉取血后，稀释动物血清分别与不同稀释度抗-D 致敏红细胞和抗-Fy^a 致敏红细胞反应，获得最适稀释度抗血清。

8. 权利要求 1 所述的新生儿溶血病检测试剂盒, 其中所述 O 型筛选红细胞的制备方法如下: 选择 O 型红细胞 Rh 血型分别为 CCDee、ccDEE 的俩人份红细胞混合, 经过过滤、洗涤后用红细胞保养液调配成 1.7% 的使用浓度。

5 9. 一种用于新生儿溶血病体外产前预测的试剂盒, 其包括含有巯基试剂的 IgM 抗体灭活液、抗人球蛋白血清、O 型筛选红细胞; 其中所述的 IgM 抗体灭活液含有 0.01M-0.02M 的二硫苏糖醇和滴度为 4-16 的 A 及 B 型物质混合物。

10 10. 一种用于新生儿溶血病体外产后检查的试剂盒, 其包括含有巯基试剂的 IgM 抗体灭活液、抗人球蛋白血清、O 型筛选红细胞; 其中所述的 IgM 抗体灭活液含有 0.01M-0.02M 的二硫苏糖醇和滴度为 4-16 的 A 及 B 型物质混合物。

新生儿溶血病检测试剂盒及其应用

发明领域

- 5 本发明涉及一种试剂盒及其应用。更具体的说，本发明涉及一种新生儿溶血病检测试剂盒及其应用。

背景技术

- 新生儿溶血病(HDN)是由于母子间血型不配合而产生同种免疫引起的。
- 10 当胎儿由父体遗传获得的显性抗原恰为母体缺乏时，此抗原在妊娠时通过胎盘进入母体，刺激母体产生相应的免疫抗体，此抗体可因再次怀孕得到刺激而加强。母体内存在的与胎儿红细胞抗原相对应的免疫性抗体可通过胎盘进入胎儿体内，与胎儿红细胞上相应抗原结合，导致胎儿红细胞破坏，引起死胎、流产或早产。出生后表现为贫血、黄疸，严重会导致心力衰竭
- 15 及核黄疸。

- 对于有新生儿溶血病的患者，胎儿的红细胞上抗原被来自于母体的相对应的免疫性抗体包被后，使得胎儿红细胞被破坏而缩短寿命，引起胎儿造血器官（肝、脾及骨髓）造血机能提高，导致肝大、脾大，一些未成熟红细胞尤其是大量有核红细胞释放进入胎儿循环系统。如果被破坏的红细
- 20 胞不能得到补充，则会导致严重的贫血，引起胎儿水肿及心脏衰竭。

- 红细胞被破坏后，产生大量未结合胆红素。在胎儿期，未结合胆红素与白蛋白结合形成结合胆红素，在母体的肝脏中代谢而排出体外。而新生儿由于肝脏尚未成熟，在出生的早期几天尚不能将直接胆红素转变为间接胆红素（结合胆红素），此红细胞溶血产生的直接胆红素会在富含脂类的中
- 25 枢神经系统中积累，影响新生儿的智力发育，甚至危及新生儿的生命安全。

大量的免疫血液学试验证明, 只有分子量较小的 IgG 免疫抗体能通过胎盘进入胎儿体内, 引起新生儿溶血病。由于免疫产生的血型抗体多数为 IgG 抗体, 而天然存在的血型抗体多数为 IgM 抗体, 因此天然存在的抗-A、抗-B IgM 性质的抗体不能通过胎盘引起新生儿溶血病。

5 新生儿溶血病可以发生在所有能免疫产生 IgG 抗体的血型系统, 但主要发生在 ABO 及 Rh 系统。其中 Rh 系统的新生儿溶血病病情较严重, 常需要换血治疗, 多发生于再次妊娠的胎儿。而 ABO 系统的新生儿溶血病病情一般较轻, 但可在第一次妊娠时发生。因为 O 型母亲的血清或血浆中天然就存在 IgG 抗体, 其高效价的抗-A 及抗-B 就很容易引起新生儿溶血病, 据
10 调查, 每 150 例 O 型母亲中就有一例产生 ABO 系统的新生儿溶血病。

由于新生儿溶血病是新生儿期的常见病之一, 如及早诊断治疗, 治愈率较高, 比较少遗留神经系统后遗症, 未及时诊断治疗者, 可发生严重并发症核黄疸则会遗留智力低下、听觉障碍、抽搐等神经系统后遗症。故及早诊断、治疗是本病的关键。因此, 对新生儿溶血病作产前预报、产后早期
15 诊断以便及时采取防治措施是很重要的。要做到产前预报和产后早期诊断就必须对孕妇作正确的免疫学分析及血型血清学检查。然而, 目前世界上尚无任何新生儿溶血病的试剂盒销售, 我国市场上也无任何有关新生儿溶血病检测的试剂盒销售, 各地医院及血液中心(血站)的检测方法五花八门, 不能准确鉴定能引起新生儿溶血病的抗体实际情况。

20

发明内容

针对目前新生儿溶血病检测的这种现状, 本发明提供一种新生儿溶血病检查试剂盒, 从而实现新生儿溶血病检测的标准化, 并大大提高了检测的准确性, 为临床产科及儿科对新生儿溶血病体外进行正确的产前预报及
25 产后早期诊断提供方便。

根据本发明的一个方面, 本发明提供了一种检测新生儿溶血病的试剂

盒，其内装有一个或多个容器，容器内装有利于新生儿溶血病的一种或多种组分。与之同时提供的可以是经政府药物管理机构审核的有关药品或生物制品制造、使用及销售的信息。

本发明的新生儿溶血病检测试剂盒，其包括含有巯基试剂的 IgM 抗体灭活液，抗人球蛋白血清，O 型筛选红细胞。上述组分可通过任何现有方法制备或商购，只要其满足检测所需的标准即可，其中，

IgM 抗体灭活液：用于灭活 IgM 抗体，使 IgM 抗体分子降解成亚基，排除 IgM 抗体对 IgG 抗体检测的影响。由于只有 IgG 性质的免疫性抗体才能通过胎盘引起新生儿溶血病，而 IgM 抗体因为不能通过胎盘因此不会引起新生儿溶血病，因此在进行新生儿溶血病检查时，必须排除 IgM 抗体对 IgG 抗体检测的干扰，即必须将 IgM 抗体灭活同时又不影响 IgG 活性。本发明针对 IgM 的分子特点，提供的 IgM 抗体灭活液含有过量的巯基试剂，利用其打开亚基间的二硫键（-SH），达到破坏 IgM 抗体，但不影响 IgG 抗体活性的目的；优选的 IgM 抗体灭活液，含有 0.01 - 0.02M 的二硫苏糖醇（DTT）和滴度为 4 - 16 的 A 及 B 型物质混合物；更优选 0.01M 的二硫苏糖醇（DTT）和滴度为 8 的 A 及 B 型物质混合物，既能灭活 IgM 抗体，又能保持 DTT 的稳定。上述 A 及 B 型物质混合物的制备方法为本领域普通技术人员熟知技术，且已有市售的标准 A 及 B 型物质。

抗人球蛋白血清：即抗-IgG，用于直接抗人球蛋白试验（检测新生儿红细胞是否被 IgG 抗体致敏）及间接抗人球蛋白试验（夫妇交叉及不规则抗体效价测定）。本发明提供的试剂盒中含有的抗人球蛋白血清已有市售，可商购获得，优选含有抗人球蛋白血清的最适稀释度的动物血清。在本发明提供的一个优选实施例中，采用免疫家兔方法制备抗人球蛋白血清，免疫原采用人来源的 IgG 抗体，免疫采用肌肉注射方法，包括：以 IgG 和完全弗氏佐剂免疫家兔，静脉取血后，稀释兔血清分别与不同稀释度抗 - D 致敏红细胞和抗 - Fy^a 致敏红细胞反应，获得最适稀释度抗血清；同时该兔血

清无任何非特异性反应。(具体方法参见实施例2)。所谓最适稀释度表示其既能使效价为1的强反应性抗体如抗-D又能使效价为1的弱反应抗体如抗-Fy^a致敏的红细胞均产生1+阳性反应,且无任何非特异性反应的最高稀释度。当然也可以免疫羊、大鼠、小鼠等动物,例如免疫小鼠制备单克隆抗-IgG。

在产前预测新生儿溶血病的试验中,进行夫妇交叉试验是很重要的,即用孕妇灭活IgM抗体后的血清与夫红细胞进行交叉检测,以检查确定孕妇血清中是否存在可能引起新生儿溶血病的与夫红细胞血型抗原对应的免疫性抗体。如果妇血清中存在可能引起新生儿溶血病的与夫红细胞血型抗原对应的免疫性抗体,就必须准确检测此抗体的效价,因为抗体效价越高,引起新生儿溶血病的几率越大。一般而言,妇血清中抗-A或抗-B免疫性IgG效价高于64时,就有可能引发新生儿溶血病。只有利用本发明提供的抗人球蛋白血清,采用间接抗人球蛋白方法才能准确测定出IgG抗体效价(参见实施例4)。酶法测得的IgG抗体效价要比实际效价低,因此不能使用。

15 0型筛选红细胞:用于妇(孕/产)血清中ABO以外的IgG抗体的鉴定,确认是否存在ABO以外的抗体引起新生儿溶血病。要求含有所有的Rh系统抗原。该组分已有市售,可商购获得,本发明的优选实施例中提供的制备方法如下:选择O型红细胞Rh血型分别为CCDee、ccDEE的俩人份红细胞混合,经过过滤、洗涤后用红细胞保养液调配成1.7%的使用浓度。

20 为了缩短试验时间,在本发明的试剂盒中,还可以进一步配备抗人球蛋白增强液,其用于间接抗人球蛋白试验,缩短抗原抗体结合的时间。利用本发明抗人球蛋白增强液中提供了低离子介质,去掉红细胞外围的阳离子,降低红细胞外围的离子氛,使抗体容易与抗原接近,从而促进抗原抗体相结合,缩短红细胞致敏抗体的时间,使原有的间接抗人球蛋白试验从
25 30-60分钟缩短到10分钟,节约了时间,方便了用户。本发明提供的该抗人球蛋白增强液含有

氯化钠 $(1.73 - 1.77) \times 10^{-3} \text{ g/mL};$

甘氨酸 $(1.78 - 1.82) \times 10^{-2} \text{ g/mL};$

叠氮钠 $(4.7 - 5.3) \times 10^{-4} \text{ g/mL};$

十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) $(4.66 - 4.68) \times 10^{-4} \text{ g/mL};$

5 磷酸二氢钾 $(2.29 - 2.31) \times 10^{-4} \text{ g/mL};$

将以上试剂用蒸馏水溶解, 调 pH 值为 6.6-6.8。

作为优选实施方案, 本发明的试剂盒还可以进一步包括 A 及 B 型标准试剂红细胞, 用于 ABO 系统抗体效价的测定及新生儿血清中游离抗体的检测。所述试剂红细胞可以按照说明书的说明或按照本领域普通技术人员常用方法, 现用现配, 不包括在试剂盒中, 也可使用市售的欧美国家采用的所谓阿氏液保养液体系。为了使用方便和更高的标准化要求, 试剂盒中优选包含本发明人先前申请的中国专利中提供的试剂红细胞, 发明名称: 试剂红细胞; 申请号: 02148958.0, 申请日: 2002 年 11 月 14 日。这里引入全文作为参考。该试剂红细胞, 由红细胞保存液和其中所调配的红细胞样本组成, 其中红细胞保存液包括具有如下浓度的组分:

枸橼酸三钠: 23-25 毫摩尔浓度; 磷酸二氢钾: 1.5 毫摩尔浓度;

磷酸氢二钠: 1 毫摩尔浓度; 氯化钠: 68-72 毫摩尔浓度;

葡萄糖: 50-55 毫摩尔浓度; 蔗糖: 19-22 毫摩尔浓度;

腺嘌呤: 1.5-1.7 毫摩尔浓度; 肌苷: 4.5-4.8 毫摩尔浓度;

20 硫酸新霉素: 0.033-0.040%; 氯霉素: 0.01-0.02% ;

以上组分用蒸馏水定容。该试剂红细胞的红细胞浓度为 $1.7 \pm 0.1\%$ 。

作为优选实施方案, 本发明的试剂盒还可以包含市售的抗-D, 用于鉴定妇(孕/产)的 Rh(D)血型, 有助于检查 Rh 系统抗-D 引起的新生儿溶血病。使用试管盐水法检测, 效价在 128 以上。

有益效果:

1. 本发明试剂盒中, 提供了含有巯基试剂的 IgM 抗体灭活液。使用巯基试剂来破坏 IgM 抗体的活性, 排除 IgM 抗体对 IgG 抗体检测的影响。既可以使 IgM 抗体完全灭活, 同时又不会对 IgG 抗体的活性有任何的影响, 5 可以准确测定体内 IgG 抗体的水平。完全摒弃了传统的型物质中和法的不能准确反映体内 IgG 量, 产生错误结果的弊端。现行我国众多的医院、血液中心(中心血站)使用的 IgM 抗体灭活方法采用的是型物质中和法, 即用分泌型人群的唾液中所含有的可溶性的 A 或 B 型抗原来结合 IgM 抗体, 形成“抗原-抗体复合体”来达到灭活 IgM 抗体的目的。由于型物质中可溶性抗原不仅能结合 IgM 抗体, 同时也能结合 IgG 抗体, 而不同人群中的血型 IgM 抗体效价也不同, 因此为每一份样本先检查 IgM 抗体的效价后再来稀释型物质的办法是不可行的。如果使用固定效价的型物质检查不同 IgM 效价的样本, 一旦型物质中可溶性抗原的效价高于 IgM 的效价, 则会使 IgG 抗体被灭活, 则会引起测得的 IgG 效价低于实际效价, 甚至会引起假阴性反应; 反之, 型物质中可溶性抗原的效价低于 IgM 的效价时, 则 IgM 抗体 15 灭活不完全, 则会引起测得的 IgG 效价高于实际效价, 甚至会引起假阳性反应。基于以上情况, 本发明人分析了 IgM 分子的结构特点, 即 IgM 分子是由五个亚基和一条 J 链通过亚基间二硫键(-S-S-)连接在一起, 通过化学试剂(巯基试剂)来打开二硫键(-SH), 达到破坏 IgM 抗体的目的, 但不影响 IgG 抗体的活性。为此本发明试剂盒中配制的 IgM 抗体灭活液, 可以使用过量的巯基试剂, 不论样本中的 IgM 抗体效价高低, 都可以使之破坏而达到失活的目的。 20

2. 本发明提供了抗人球蛋白血清, 利用本发明的抗人球蛋白血清, 采用本发明提供的抗人球蛋白试验方法, 可以准确可靠的测定出 IgG 抗体的 25 特异性及抗体量的水平。避免了传统酶方法漏检抗体、测定 IgG 抗体效价低的弊端。尤其是当利用本发明提供的抗人球蛋白增强液后, 使原有的间

接抗人球蛋白试验从 30-60 分钟缩短到 10 分钟，减少了反应时间，方便了用户。

3. 在本发明的一个优选实施方式中，试剂盒中进行了完善的试剂配备，包括含有 DTT 的 IgM 抗体灭活液，以及用抗人球方法检查免疫性 IgG 抗体效价的方法，并配备了检查新生儿溶血病检查所需要的试剂红细胞、抗人球蛋白血清、抗-D 等，大大提高了检测的准确性，并将间接抗人球蛋白试验缩短到 10 分钟，可以方便的用于新生儿溶血病的检测，便于在临床推广应用。适用于临床医院产科及儿科对新生儿溶血病进行正确的产前预报及产后早期诊断，以达到保障新生儿生命安全及身体健康，提高人口再生产质量的目的。

附图说明

图 1 显示免疫家兔日程流程图。

具体实施方式

实施例 1 试剂盒组分

1. 含有巯基试剂的 IgM 抗体灭活液
 0. 01M 的二硫苏糖醇 (DTT) 和滴度为 8 的 A 及 B 型物质混合物。
 2. 抗人球蛋白血清。
 3. 0 型筛选红细胞。
 4. 抗人球蛋白试验增强液
- | | |
|---|-----------------|
| 氯化钠 (NaCl) | 1.75 ± 0.02 克 |
| 甘氨酸 (氨基乙酸) | 18 ± 0.2 克 |
| 叠氮钠 (NaN ₃) | 0.5 ± 0.03 克 |
| 十二水合磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O) | 0.467 ± 0.001 克 |
| 磷酸二氢钾 | 0.23 ± 0.001 克 |

将以上试剂用蒸馏水溶解并定容至 1000mL,

其 pH 值应该为 6.6 - 6.8, 可用 NaOH 调节。

5. 试剂红细胞。

6. 抗-D (美国 Immucol 公司产品), 使用试管盐水法检测, 效价在
5 128 以上。

实施例 2 免疫血液学中使用的抗人球蛋白 (抗-IgG) 的制备

一、 抗原: 人纯化 IgG。

二、 动物: 未经过任何免疫史及接种疫苗史的健康年轻家兔。

三、 免疫日程 (参见图 1)。

10 四、 每只家兔肌肉免疫量为: IgG 3-5mg/mL+1mL 完全弗氏佐剂, 用
免疫混合器充分混合后注射于家兔的前后腿两内侧共四点, 每点 0.5mL。

五、 取血化验:

1、用二甲苯擦洗家兔的耳静脉活化其静脉, 采血 10mL, 4℃放置过夜
后, 离心分离获得血清, 将血清于 56℃灭活补体 30 分钟。

15 2、人 O 型红细胞的致敏: 人 O 型红细胞用大量盐水洗涤三次后用盐水
配制成 5% 浓度后与等体积效价为 16 的 IgG 性质抗-D 抗体混合, 再加入与
混合物等体积的 10% 的 PEG4000 PBS 溶液, 于 37℃孵育 15 分钟后用大量的
盐水洗涤四次后配制成 1.7% 的红细胞盐水悬液。

20 3、兔血清的稀释: 兔血清用生理盐水 100 倍稀释后再用盐水做 1: 2
的倍比稀释, 从 1: 2 至 1: 512, 每管中有稀释后的抗血清 0.2mL。

4、向每管中加入 0.1mL 致敏后的 O 型红细胞, 混合后于 3000 rpm (900g)
离心 15 秒, 看结果并判读效价, 同时用未致敏的 O 型红细胞检查兔血清的
特异性。

25 5、非特异性凝集素的吸收与去除: 取已洗涤的 O 型、A 型及 B 型混合
的红细胞分成三等份, 每份的体积与待吸收的血清体积相同。

六、 将已预冷至 4℃已灭活的兔血清与一份吸收用的红细胞混合, 4

℃振荡放置过夜后，于 4℃ 3000 rpm (900g)离心 10 分钟，将上清液转入第二份细胞中，混合后 4℃振荡 1 小时，4℃ 3000 rpm 离心 10 分钟，上清转入第二份红细胞中，重复吸收，最后获得的血清中应该不含有红细胞。

七、非特异凝集素的检查：检测吸收后的兔血清

	立即离心	4℃ 5 分钟后
稀释兔血清	A1 B 0	A1 B 0
未稀释原液		
1: 2		
1: 4		
1: 8		
稀释剂		

5 要求所有均呈阴性反应

八、抗人球蛋白最适稀释度的选择：

抗人球 稀释度	不同稀释度抗-D 致敏的红细胞						不同稀释度抗-Fy ^a 致敏的红细胞					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	NHS	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	NHS
100												
200												
400												
800												
1600												
3200												
6400												
12800												
25600												
51200												
标准 AHG												
AHG 稀释剂												

其中：NHS 表示生理盐水，AHG 表示抗人球蛋白试剂。

其中不同稀释度抗-Fy^a致敏的红细胞制备方法如下：

用不同稀释度抗-Fy^a分别和O型Fy^a抗原阳性的5%浓度的红细胞按照等体积比例混合,于37℃孵育1小时后用大量生理盐水洗涤4次后用盐水配制成1.7%浓度备用。

- 另外,最适稀释度选择标准:选择既能使效价为1的强反应性抗体如抗-D又能使效价为1的弱反应抗体如抗-Fy^a致敏的红细胞均产生1+阳性反应,且无任何非特异性反应的免疫后兔血清的最高稀释倍数称之为最适稀释度。

实施例3 O型筛选红细胞的制备

- 选择O型红细胞Rh血型分别为CCDee、ccDEE的俩人份红细胞混合,经过过滤、洗涤后用红细胞保养液调配成1.7%的使用浓度。

其中红细胞保存液包括具有如下浓度的组分:

- | | |
|----------------------|--------------------|
| 枸橼酸三钠: 23-25 毫摩尔浓度; | 磷酸二氢钾: 1.5 毫摩尔浓度; |
| 磷酸氢二钠: 1 毫摩尔浓度; | 氯化钠: 68-72 毫摩尔浓度; |
| 葡萄糖: 50-55 毫摩尔浓度; | 蔗糖: 19-22 毫摩尔浓度; |
| 腺嘌呤: 1.5-1.7 毫摩尔浓度; | 肌苷: 4.5-4.8 毫摩尔浓度; |
| 硫酸新霉素: 0.033-0.040%; | 氯霉素: 0.01-0.02% ; |

以上组分用蒸馏水定容。

实施例4 新生儿溶血病体外产前预测的检验设计

(一)、血样的准备:

- 1、采集不抗凝的女血样3mL,男血样1mL。
- 2、分离出女血清。
- 3、鉴定男女ABO血型,女Rh(D)血型。
- 4、用生理盐水洗涤男红细胞三次后,用生理盐水配制成3-5%的红细胞悬液。

- (二)、女血清中IgM抗体的灭活:排除IgM抗体对IgG抗体检测的干扰在一试管中将6滴(0.3mL)女血清与等量的“IgM抗体灭活液”混合

后于 37℃ 水浴中孵育 30 分钟。

(三)、夫妇交叉试验：目的是检查女体内是否存在与男红细胞上血型抗原相对应的 IgG 抗体，同时检查是否存在 ABO 以外的不规则抗体。

1、 一支已标记的洁净试管中混合 2 滴 (0.1 mL) 灭活后的女血清和
5 1 滴 3-5% 的男细胞。

2、 在另一支已标记的洁净试管中混合 2 滴 (0.1 mL) 灭活后的女血清和 1 滴 3-5% 的 O 型筛选细胞。

3、 向每管中加入 4 滴 “抗人球蛋白试验增强液”，混匀后于 37℃ 水浴孵育 10 分钟。

10 4、 向每管中加入大量盐水，于 3000 rpm (1000 g) 离心 1 分钟，弃上清液，保留压积红细胞扣。如此洗涤红细胞三次，弃净末次洗涤的上清盐水。

5、 向每管中加入 2 滴 “抗球蛋白血清”，混匀悬浮红细胞扣，于 3000rpm 离心 15 秒，悬浮红细胞检查有无凝集发生。

15 结果解释：

项目	反应结果			
女灭活血清+男细胞	+	+	—	—
女灭活血清+O 型筛选细胞	—	+	—	+
解释	女血清中存在与男细胞不合的 ABO 系统 IgG 抗体	女血清中可能存在 ABO 以外的 IgG 抗体，同时也可能存在与男细胞不配合的 ABO 系统 IgG 抗体	女血清中不存在与男细胞不合的 IgG 抗体	女血清中存在与男细胞相合的 ABO 以外的 IgG 抗体
是否可能引起新生儿溶血病	是	是	否	否
是否检测抗体效价	是，检测 ABO 系统 IgG 效价	是，最好送血液中心或血站血型室检查抗体特异性	否	否

+: 有凝集

(四)、效价测定：测定抗体量的水平

I、ABO 系统 IgG 抗体效价测定

- 1、1 至 8 标记 8 支小试管，在每管中分别加入 2 滴 (0.1 mL) 生理盐水。
- 2、向第 1 管中加入 2 滴灭活后的女血清，充分混匀后移出 2 滴混合液加入第 2 支试管。
- 5 3、第 2 管中液体充分混匀后移出 2 滴加入第 3 支试管。以此类推，进行倍比稀释，第八支试管中弃去液体 2 滴。向每管中加入 1 滴对应的 3-5% 的试剂红细胞。
- 4、向每管中加入 4 滴 “抗人球蛋白试验增强液”，混匀后于 37℃ 水浴孵育 10 分钟。
- 10 5、每管加入大量盐水后于 3000 rpm (1000 g) 离心 1 分钟，弃上清液，保留压积红细胞扣。如此洗涤红细胞三次，弃净末次洗涤的上清盐水。
- 6、管中加入 2 滴 “抗人球蛋白血清”，混合悬浮红细胞扣，于 3000rpm 离心 15 秒，悬浮红细胞扣，检查有无凝集发生。

解释:

- 15 1、能产生肉眼可见凝集的最高稀释管的稀释倍数即为效价。从第 1 至第 8 管的效价分别为 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512。
- 2、当 ABO 系统的 IgG 抗体效价 ≥ 64 时，就有可能引起新生儿溶血病。
- 3、ABO 系统效价用红细胞血型的选择:

女血型	0	0	0	A	B
男血型	A	B	AB	B, AB	A, AB
测效价用细胞血型	A	B	A, B	B	A

II、ABO 系统以外 IgG 抗体效价测定

- 20 按 ABO 系统 IgG 抗体效价测定方法中的稀释方法，稀释到第 10 支试管，测定效价使用的红细胞选择 0 型筛选红细胞进行。

(五)、综合结果判断

- 1、当仅存在 ABO 系统的 IgG 抗体，且抗体效价 ≥ 64 时，引起新生儿溶

血病可能性较大。

2、当存在ABO以外的IgG抗体时，需将标本送当地血液中心或血站血型室对抗体作进一步鉴定。

(六)、化验结果报告表

5 新生儿溶血病体外产前预测结果报告

女姓名：_____

女ABO型：_____ 女Rh(D)型：_____ 男ABO型：_____

检验项目	间接抗人球蛋白试验结果
女灭活血清+男红细胞	
女灭活血清+O筛选细胞	

女血清中ABO系统IgG性质抗_____的效价为_____。

女血清中ABO以外IgG性质抗体特异性为抗_____，其效价为_____。

10 实施例5 新生儿溶血病体外产后检查的试验设计

(一)、血样的准备

- 1、采集不抗凝的母血样5 mL，新生儿血样2 mL。
- 2、分离出母血清。
- 3、鉴定母子ABO血型，母Rh(D)血型。
- 15 4、用生理盐水洗涤子红细胞三次后，用生理盐水配制成3-5%的红细胞悬液。

(二)、母血清中IgM抗体的灭活

在一试管中将6滴(0.3 mL)母血清与等量的“IgM抗体灭活液”混合后于37℃水浴中孵育30分钟。

- 20 (三)、子红细胞直接抗人球蛋白试验：检查新生儿红细胞上是否在体内致敏了IgG抗体。

在一洁净的试管中将一滴盐水洗涤3次的3-5%的子红细胞通过离心去除上清液后，加入2滴“抗人球蛋白血清”混合，于3000rpm离心15秒，

悬浮红细胞扣，在显微镜下检查有无红细胞凝集。有凝集即为阳性。

(四)、子血清游离抗体试验：检查新生儿血清中是否还存在未结合的抗体，继续加重病情。

1、在一支已标记的洁净试管中混合 2 滴 (0.1 mL) 子血清和 1 滴 3 - 5% 的子同型红细胞 (细胞选择见效价测定部分)。

2、在另一支已标记的洁净试管中混合 2 滴 (0.1 mL) 子血清和 1 滴 3 - 5% 的 O 型筛选细胞。

3、每管中加入 4 滴 “抗人球蛋白试验增强液”，混匀后于 37℃ 水浴孵育 10 分钟。

10 4、管中加入大量盐水，于 3000 rpm (1000 g) 离心 1 分钟，弃上清液，保留压积红细胞扣，如此洗涤红细胞三次，弃净末次洗涤的上清盐水。

5、每管中加入 2 滴 “抗球蛋白血清”，混匀悬浮红细胞扣，于 3000 rpm 离心 15 秒，悬浮红细胞检查有无凝集发生。

结果解释：

项目	反应结果		
子血清+子同型细胞	+	+	—
子血清+O 型筛选细胞	—	+	—
解释	子血清中存在与子细胞不合的 ABO 系统 IgG 抗体	子血清中可能存在 ABO 以外的 IgG 抗体, 同时也可能存在与子细胞不配合的 ABO 系统 IgG 抗体	子血清中可能不存在与子细胞不合的 IgG 抗体
是否会引起新生儿溶血病	肯定是	肯定是	可能
是否检测母血清效中抗体效价	是, 检测 ABO 系统 IgG 效价	是, 最好送血液中心或血站血型室检查抗体特异性	是

15 (五)、效价测定：检测母体内免疫性抗体的水平：

I、ABO 系统 IgG 抗体效价测定

1、1 至 8 标记 8 支小试管，在每管中分别加入 2 滴 (0.1 mL) 生理盐水。

2、第 1 管中加入 2 滴灭活后的母血清，充分混匀后移出 2 滴混合液

加入第 2 支试管。

3、第 2 管中液体充分混匀后移出 2 滴加入第 3 支试管。以此类推，进行倍比稀释，第 8 支试管中弃去液体 2 滴。向每管中加入 1 滴对应的 3-5%的试剂红细胞。

5 4、向每管中加入 4 滴“抗人球蛋白试验增强液”，混匀后于 37℃水浴孵育 10 分钟。

5、向每管中加入大量盐水后于 3000 rpm(1000 g)离心 1 分钟，弃上清液，保留压积红细胞扣。如此洗涤红细胞三次，弃净末次洗涤的上清盐水。

10 6、向每管中加入 2 滴“抗人球蛋白血清”，混合悬浮红细胞扣，于 3000rpm 离心 15 秒，悬浮红细胞扣，检查有无凝集发生。

解释：

1、产生肉眼可见凝集的最高稀释管的稀释倍数即为效价。从第 1 至第 8 管的效价分别为 4，8，16，32，64，128，256，512。

15 2、当 ABO 系统的 IgG 抗体效价 ≥ 64 时，就有可能引起新生儿溶血病。

3、测 ABO 系统效价用红细胞血型的选择：

母血型	0	0	0	A	B
子血型	A	B	AB	B, AB	A, AB
测效价用细胞血型	A	B	A, B	B	A

II、ABO 系统以外 IgG 抗体效价测定

按 ABO 系统 IgG 抗体效价测定方法中的稀释方法，稀释到第 10 支试管，测定效价使用的红细胞选择 0 型筛选红细胞。

20 (六)、综合结果判断

1、当子红细胞的直接抗人球蛋白试验阳性，或子血清中游离抗体为阳性时，肯定发生新生儿溶血病。

2、当母血清中仅存在 ABO 系统的 IgG 抗体，且抗体效价 ≥ 64 时，引起

新生儿溶血病的可能性较大。

3、当母或子血清中存在 ABO 以外的 IgG 抗体时，需将标本送当地血液中心或血站血型室对抗体进行进一步鉴定。

(七)、化验结果报告表

5 新生儿溶血病产后检测结果报告

母姓名：

母 ABO 型： 母 Rh (D) 型： 子 ABO 型：

子红细胞直接抗人球蛋白试验：

子血清中游离抗体试验与 A 细胞____，与 B 细胞 ____，与 O 细
10 胞 ____。

母血清中 ABO 系统 IgG 性质抗____的效价为____。

母血清中 ABO 以外 IgG 性质抗体特异性为抗____，其效价为____。

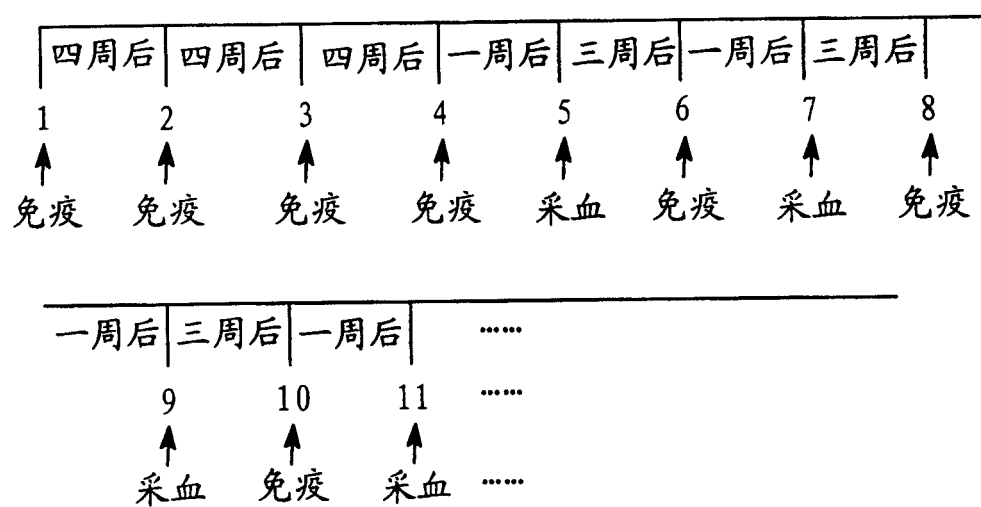


图 1

专利名称(译)	新生儿溶血病检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN1235048C	公开(公告)日	2006-01-04
申请号	CN02156800.6	申请日	2002-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	北京市红十字血液中心		
申请(专利权)人(译)	北京市红十字血液中心		
当前申请(专利权)人(译)	北京市红十字血液中心		
[标]发明人	范道旺 孙芸 钟国萍 姜爱萍		
发明人	范道旺 孙芸 钟国萍 姜爱萍		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/80 G01N33/96		
代理人(译)	黄健		
其他公开文献	CN1508544A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种新生儿溶血病检测试剂盒及其应用。该试剂盒包括含有巯基试剂的IgM抗体灭活液，抗人球蛋白血清，O型筛选红细胞，从而实现了新生儿溶血病检测的标准化，并大大提高了检测的准确性，为临床产科及儿科对新生儿溶血病体外进行正确的产前预报及产后早期诊断提供方便。

