

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材

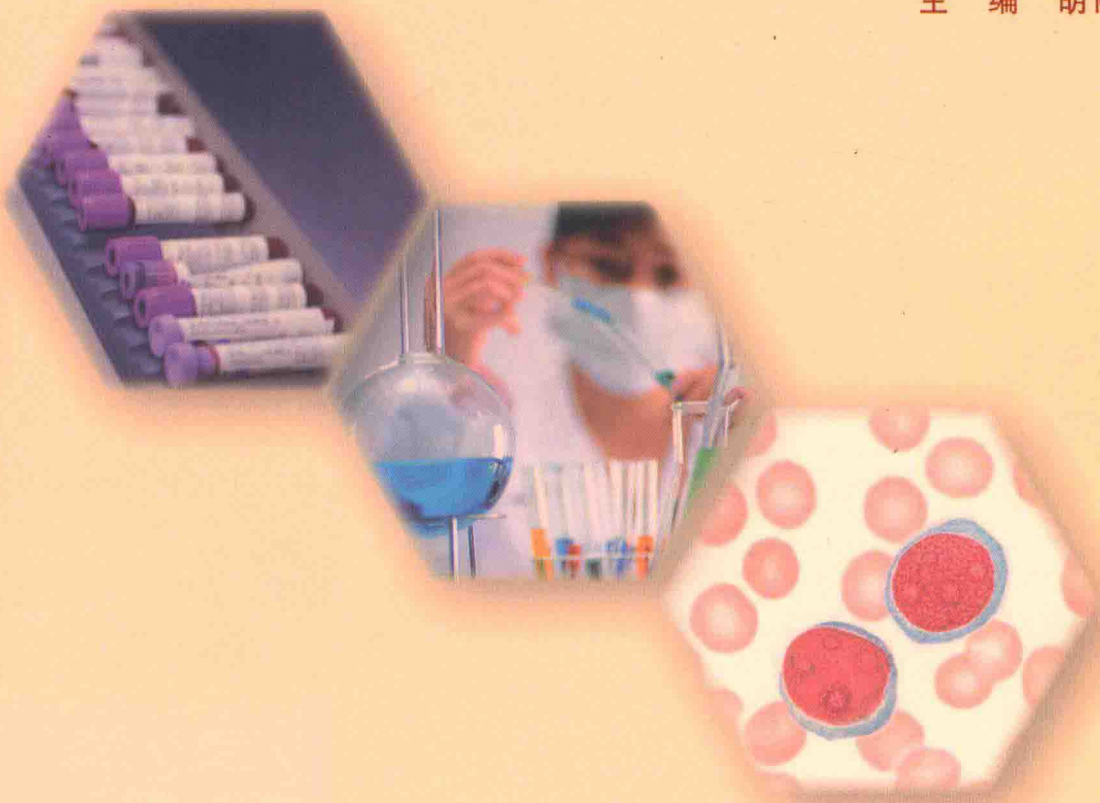
国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材配套教材
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材配套教材

全国高等学校配套教材

供医学检验技术专业用

临床输血学检验技术 实验指导

主 编 胡丽华



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材

国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材配套教材
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材配套教材

全国高等学校配套教材
供医学检验技术专业用

临床输血学检验技术 实验指导

主 编 胡丽华

编 者(以姓氏笔画为序)

李志强 上海交通大学医学院
赵国华 中国医学科学院肿瘤医院
胡丽华 华中科技大学同济医学院
夏 荣 复旦大学上海医学院
钱宝华 第二军医大学
阎 石 中国医学科学院血液学研究所
谢 珏 浙江大学医学部
穆士杰 第四军医大学

秘 书

刘 峰 华中科技大学同济医学院

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

临床输血学检验技术实验指导/胡丽华主编.—北京:人民卫生出版社,2015

全国高等学校医学检验专业第六轮暨医学检验技术专业第一轮规划教材配套教材

ISBN 978-7-117-20249-7

I. ①临… II. ①胡… III. ①输血-血液检查-医学院校-教学参考资料 IV. ①R446.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 020409 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

临床输血学检验技术实验指导

主 编: 胡丽华

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 北京市卫顺印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 5

字 数: 125 千字

版 次: 2015 年 3 月第 1 版 2015 年 3 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-20249-7/R·20250

定 价: 16.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

前 言

《临床输血学检验技术实验指导》是《临床输血学检验技术》的配套实验教材。本书适于全国高等医药院校医学检验技术专业的实验教学使用,也可以作为医院输血科(血库)、各级血站实验工作人员的参考用书。

本教材以培养临床输血医学专业技术人才为宗旨,全书贯穿理论联系实际的编写原则,着重介绍了常见临床输血学检验相关实验的基本知识与操作技术,包括红细胞血型系统检测技术、人类白细胞抗原检测技术、血小板血型检测技术、血液成分的制备技术等,从实验原理、操作步骤、实验结果、临床意义、方法学评价与注意事项等方面进行了较为详尽的阐述,同时部分实验增加了病例分析,使学生不仅能又快又好地掌握临床输血学检验技术的各项实验基础知识与操作技能,还能结合具体的病例进行综合分析,提高学生在实践中综合运用知识、分析和解决问题的能力。

由于编写时间较短,书中难免存在不足之处,敬请各位专家和广大读者批评指正。

胡丽华

2015年1月

目 录

第一章 红细胞血型系统检测技术	1
第一节 红细胞血型试验	1
实验一 ABO 血型鉴定	1
实验二 RhD 血型鉴定	3
实验三 ABO 亚型鉴定	4
实验四 Rh 表型分型	6
实验五 MNS 血型鉴定	7
实验六 P 血型鉴定	9
实验七 唾液中 HAB 血型物质测定	9
实验八 ABO 基因分型	11
第二节 意外抗体筛选及鉴定	16
实验九 红细胞意外抗体筛选试验	16
实验十 红细胞抗体鉴定试验	18
第三节 交叉配血试验	22
实验十一 盐水介质交叉配血试验	22
实验十二 酶介质交叉配血试验	23
实验十三 抗人球蛋白介质交叉配血试验	24
实验十四 低离子聚凝胺介质交叉配血试验	26
实验十五 微柱凝胶介质交叉配血试验	27
第四节 吸收放散试验	29
实验十六 吸收试验	29
实验十七 放散试验	34
第五节 新生儿溶血病检测	38
实验十八 母体血清 IgG 抗体效价测定	38
实验十九 ABO 血型不合新生儿溶血病检查	39
实验二十 非 ABO 血型不合新生儿溶血病检查	42
第二章 人类白细胞抗原检测技术	46
实验二十一 血清学分型方法	46
实验二十二 HLA 分子生物学分型方法(PCR-SSP)	49
实验二十三 群体反应性抗体(PRA)测定	51

第三章 血小板血型检测技术	56
实验二十四 简易致敏红细胞血小板血清学实验(SEPSA)	56
实验二十五 <i>HPA</i> 基因分型实验(PCR-SSP)	58
实验二十六 微柱凝胶血小板相容性试验	60
第四章 血液成分的制备	63
实验二十七 悬浮红细胞的制备	63
实验二十八 洗涤红细胞的制备	64
实验二十九 冰冻与解冻去甘油红细胞的制备	65
实验三十 浓缩血小板的制备	67
实验三十一 单采血小板的制备	68
实验三十二 新鲜冰冻血浆的制备	69
实验三十三 冷沉淀的制备	70
第五章 临床输血检验技术设计性试验	72
实验三十四 疑难血型鉴定	72
实验三十五 疑难交叉配血	73

第一节 红细胞血型试验

实验一 ABO 血型鉴定

【实验原理】

依据红细胞表面的 A 及 B 抗原可将 ABO 血型系统划分为 A、B、O 及 AB 型。而其体内血清中存在相对应的抗体。用已知特异性的血型抗体试剂鉴定红细胞的抗原[forward typing, 正定型; 细胞定型(red cell grouping)], 同时用已知血型的试剂红细胞鉴定血清中的抗体[reverse typing, 反定型; 血清定型(serum grouping)], 根据正反定型结果判定血型。常用检测方法有玻片法、试管法、微柱凝胶血型卡法等。

【器材、试剂与标本】

1. 器材 滴管、玻片、洁净小试管、标记笔、离心机、显微镜、微柱凝胶血型卡、专用微柱凝胶血型卡离心机等。
2. 试剂 单克隆或多克隆的抗-A 及抗-B、抗-A,B 试剂(可选), 0.8% ~ 1% 及 2% ~ 5% A₁ 型、B 型和 O 型试剂红细胞, 生理盐水等。
3. 标本 2 ~ 4ml 抗凝或不抗凝待检血液标本(红细胞与血清已分离或分层)。

【操作步骤】

(一) 玻片法

1. 取 3 张洁净玻片, 标记为抗-A、抗-B 及抗-A,B。
2. 在相应的玻片上分别滴加 1 滴抗-A、抗-B 及抗-A,B 试剂。
3. 将待检血液稀释成 10% 浓度的红细胞悬液, 再用滴管分别加入 1 滴红细胞悬液至相应玻片中, 轻摇并充分混匀。
4. 观察有无凝集, 2 分钟后仍无凝集则判为阴性。

(二) 试管法

1. 正定型(细胞定型)

(1) 取 2 支洁净小试管, 分别标记抗-A、抗-B、抗-A,B(可选), 分别加入抗-A、抗-B 和抗-A,B 试剂各 1 滴于试管内, 再加入 1 滴配制成 2% ~ 5% 待检的红细胞盐水悬液, 轻摇混匀。

(2) 以(900 ~ 1000) × g 离心 15 秒。

(3) 轻摇试管使细胞扣(cell buttons) 悬起, 观察有无凝集现象, 记录正定型结果。

2. 反定型(血清定型)

(1) 取 3 支洁净小试管, 分别标记 A_{1c}、B_c 和 O_c, 用滴管分别加入 2 滴受检者血清于试

管,再分别加入1滴2%~5% A₁、B及O型试剂红细胞,混匀。

(2)以(900~1000) × g 离心15秒。

(3)轻摇试管使细胞扣(cell buttons)悬起,观察有无凝集及溶血现象,记录反定型结果。

(三) 微柱凝胶血型卡法

1. 取出并标记微柱凝胶血型卡,撕去铝箔,垂直放置在卡槽内。

2. 在中性凝胶 A₁ 及 B 管中分别移入 50μl 0.8%~1% A₁ 及 B 试剂红细胞,再分别移入 50μl 待检者血浆或血清。

3. 在 A-B-D-Ctl 四管中分别移入 50μl 配制成 0.8%~1% 的待检者红细胞悬液。

4. 在室温(18~25℃)下孵育10分钟。

5. 将卡在专用微柱凝胶血型卡离心机上离心10分钟,判读结果。

【实验结果】

ABO 血型检测结果及判定参见表 1-1;玻片法通过正定型分析,试管法结果联合正反定型分析,微柱凝胶血型卡法联合正反定型进行判定(要求 Ctl 管不出现阳性结果,否则结果无效)。

表 1-1 ABO 血型正反定型结果判定表

正定型(细胞定型)			反定型(血清定型)			判定结果
抗-A	抗-B	抗-A,B	A _{1c}	B _c	O _c	
0	0	0	+	+	0	O
+	0	+	0	+	0	A
0	+	+	+	0	0	B
+	+	+	0	0	0	AB

+ :凝集;0:不凝集

【临床意义】

ABO 血型检测是输血前检验的必备实验项目之一,同时亦可用于个体的遗传识别及 ABO 血型不合新生儿溶血病(ABO-HDN)产前诊断等方面。

【方法学评价】

玻片法多只用于全血或者红细胞正定检测,因此多只用于 ABO 血型初筛;试管法简便易行,是当前应用最广泛的血型检测技术之一;微柱凝胶法目前已有成熟的商品试剂及自动分析仪供使用,检测灵敏度和可靠性俱佳,结果易于记录和保存,但不适于直抗阳性(即已致敏)的红细胞检测。

【注意事项】

1. 玻片法结果可疑时应改用试管法或其他方法进行复查。

2. 试管法正定加样时诊断试剂与待检红细胞比例多为 1:1,使用的细胞浓度宜控制在 2%~5%,而反定加样时诊断细胞与待检血清或血浆比例多为 1:2;微柱凝胶血型卡法加样量及浓度须参考相应微柱凝胶血型卡供应商的操作说明书进行。

3. ABO 血型检测出现问题,常见于正反定型不一致(ABO discrepancy),首先需要排除操作和技术问题,如离心不当、血清和细胞比例不当、忽略内源性溶血的识别等,其次需要考虑 ABO 血型亚型存在,以及通过病史资料等确立特殊的生理及病理状态造成的

影响,如新生儿反定型无 ABO 抗体、ABO 异型输血、换血或移植后的血样、意外抗体干扰等。

【思考题】

1. ABO 正反定不一致的原因及进一步分析策略有哪些?
2. ABO 血型检测试管法的细胞加样浓度、血清与细胞的加样比例通常为多少?
3. 意外抗体是否会干扰血型反定型? 排除干扰的相应策略有哪些?

(胡丽华)

实验二 RhD 血型鉴定

【实验原理】

用抗-D 试剂通过凝集反应对红细胞上 RhD 抗原进行鉴定。常用检测方法有玻片法、试管法、微柱凝胶血型卡法等。

【器材、试剂与标本】

1. 器材 滴管、玻片、洁净小试管、标记笔、离心机、显微镜、微柱凝胶血型卡、专用微柱凝胶血型卡离心机等。
2. 试剂 单克隆混合(IgM + IgG)抗-D 试剂、RhD 阳性和阴性对照红细胞、生理盐水等。
3. 标本 1~2ml 抗凝或不抗凝待检血液标本(全血标本须将红细胞与血浆分离或分层)。

【操作步骤】

(一) 玻片法

1. 取 3 张洁净玻片,标记为待测、阴性及阳性对照。
2. 在相应玻片上分别滴加 1 滴单克隆混合(IgM + IgG)抗-D 试剂。
3. 滴加 30%~50% 浓度的待检红细胞悬液、RhD 阳性和阴性对照红细胞各 2 滴至相应玻片上,轻摇并充分混匀;观察有无凝集并记录结果,2 分钟后仍无凝集则判为阴性。

(二) 试管法

1. 取 3 支洁净小试管,标记为待测、阴性及阳性对照。
2. 在相应试管中分别滴加 1 滴单克隆混合(IgM + IgG)抗-D 试剂。
3. 再滴加 2%~5% 浓度的待检红细胞悬液、5% RhD 阳性和阴性对照红细胞各 1 滴至相应试管中,充分混匀。
4. 以(900~1000) × g 离心 15 秒。
5. 轻摇试管使细胞扣(cell buttons)悬起,观察有无凝集现象,记录结果。

(三) 微柱凝胶血型卡法

1. 取出并标记微柱凝胶血型卡,撕去铝箔,垂直放置在卡槽内。
2. 在中性凝胶 D 管中分别移入 50 μ l 待检者 0.8%~1% 红细胞悬液。
3. 专用微柱凝胶血型卡离心机上离心 10 分钟,判读结果。

【实验结果】

阴性对照管无凝集,阳性对照管出现凝集,若被检标本管出现凝集则为 Rh 阳性,反之为阴性。

【临床意义】

RhD 血型检测是输血前检验的必备实验项目之一,同时亦可用于个体的遗传识别及 Rh-HDN 产前诊断等方面。

【方法学评价】

玻片法多只用于全血或者红细胞检测,但易受到血清意外抗体的干扰且灵敏度较低;试管法简便易行,是当前应用最广泛的 Rh 血型检测技术之一;微柱凝胶法灵敏度和可靠性俱佳,结果易于记录和保存,但不适于直抗阳性(即已致敏)的红细胞检测,目前已有成熟的商品试剂及自动分析仪供使用。

【注意事项】

1. Rh 血型系统的抗体多由后天免疫刺激(输血、妊娠及移植)产生,血型鉴定时不需做抗体检测,亦不能通过抗体检测来推导 Rh 血型。

2. RhD 血型鉴定检测目的可因检测对象出现不同的诊断,对于供血员而言,RhD 初次检测为阴性时需要进一步进行 RhD 阴性确认试验(有条件时加做部分 D 鉴定试验),以免将弱 D 和部分 D 血型误诊为阴性造成临床给 RhD 阴性患者使用而引起不良的免疫输血反应;对于患者而言,RhD 初次检测为阴性需要进行弱 D 试验,诊断为弱阳性时应建议其输注 RhD 阴性血液制剂。

3. Rh 血型检测出现问题,即 RhD 血型初测与复测不一致或者历史结果比对不一致,首先需要排除操作和技术问题,如离心不当、血清和细胞比例不当、抗-D 试剂的类型(IgG、IgM)及其适用方法等,考虑 Rh 亚型存在及检测试剂的性能差异等,有条件时可以进行 RhD 基因诊断。

【思考题】

1. Rh 血型两次检测不一致的原因及进一步分析策略有哪些?
2. 什么是弱 D 和部分 D? 如何鉴定? 各自有什么临床输血参考价值?

(胡丽华)

实验三 ABO 亚型鉴定

【实验原理】

ABO 亚型通常表现为红细胞上 A 抗原或 B 抗原数量的减少,而 H 抗原往往表达增强。在人群中,A 亚型多于 B 亚型;临床上最主要的 A 亚型是 A₁ 和 A₂ 型,其中 A₂ 型是相对常见并且比较重要的一种 A 亚型。A₁ 型红细胞上有 A 抗原和 A₁ 抗原,A₂ 型红细胞上仅有 A 抗原。A₁ 型红细胞与抗-A 试剂、抗-A₁ 试剂和适当稀释的植物血凝素双花扁豆均反应;而 A₂ 型红细胞仅与抗-A 试剂反应。部分 A₂ 型人血清中有抗-A₁ 抗体。下面以 A₂ 亚型为例,进一步描述其血清学特点。

【器材、试剂与标本】

1. 器材 血型血清学专用离心机、显微镜、加样器、一次性吸管、试管等。
2. 试剂 抗-A、抗-A₁、抗-H、抗-B 试剂,A₁、B、O、A₂ 试剂红细胞(可选择)(浓度约 2%~5%)。
3. 标本 EDTA 抗凝或非抗凝血标本。

【操作步骤】

1. 取 4 支干净试管进行标记并分别加入抗-A、抗-A₁、抗-H、和抗-B 试剂各 50μl

(1 滴)。

2. 取一定量受检者压积红细胞,洗涤 3 次($1000 \times g$, 1 分钟),悬浮在生理盐水中制备成 2% ~ 5% 受检者的红细胞悬液。

3. 标记好的试管中分别加入 50 μ l(1 滴)制备好的 2% ~ 5% 受检者的红细胞悬液。

4. 另取 4 支干净试管标记,标记好的上述试管中分别加入受检者血浆或血清 100 μ l。

5. 依次分别加入 A₁、A₂、B 和 O 试剂红细胞各 50 μ l。

6. 轻轻混匀,根据试剂厂商的使用说明书进行离心。通常条件是室温,(900 ~ 1000) \times g 离心 15 ~ 30 秒。

7. 轻轻摇动试管,判断结果并记录。

【实验结果】

详见表 1-2。

表 1-2 A₁、A₂ 血型鉴定试验结果

受检者红细胞与血清试剂凝集反应				受检者血浆/血清与试剂红细胞凝集反应				结果判读
抗 A	抗 A ₁	抗 H	抗 B	A ₁	A ₂	B	O	A
++++	++++	+	-	-	-	++++	-	A ₁
++++	-	+++	-	-	-	++++	-	A ₂
++++	-	+++	-	+	-	++++	-	A ₂

+ :凝集; - :不凝集

【临床意义】

ABO 亚型鉴定有助于准确诊断出正反定不一致或疑难血型,从而有利于患者顺利、有效和安全的输血。

【方法学评价】

在血型血清学试验中,以试管法的鉴定结果作为最终的血型鉴定结果;当判断血型出现困难时,可进行家系调查、唾液型物质检测、吸收放散试验及分子生物学等方法确认血型。

【注意事项】

1. 实验过程中要有效评估血清试剂质量,特别是抗-A₁试剂的质量。与 A₁ 和 A₂ 红细胞均凝集,或与 A₁ 和 A₂ 对照红细胞都不凝集(延长反应时间依然不凝集),提示抗-A₁试剂无效。

2. 随着单克隆 ABO 定型试剂取代人源定型血清,可能难以按这些血清学反应特征对一些 ABO 亚型的抗原进行鉴别定型。

3. 新生儿红细胞 ABO 血型抗原较弱,新生儿和近期输血者不宜进行亚型鉴定。

4. 使用血清学方法进行亚型判断困难时,可使用分子生物学方法如 PCR-限制性片段长度多态性(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、PCR-序列特异性引物(PCR-sequence specific primer, PCR-SSP)进行血型鉴定。

5. ABO 血型其他亚型的鉴定通常根据其血型血清学反应格局进行鉴定(表 1-3)。

表 1-3 ABO 亚型的血清学反应鉴定表

血型	受检者红细胞与血清试剂凝集反应					受检者血浆/血清与试剂红细胞凝集反应				唾液
	抗 A	抗 B	抗 A,B	抗 A ₁	抗 H	A ₁	A ₂	B	O	
A ₃	++ mf	0	++ mf	0	+++ / ++++	0 / +	0	++++	0	A/H
A _x	0/W	0	+ / ++	0	++++	+	0	++++	0	A/H
A _m	0/W	0	0/W	0	++++	0	0	++++	0	A/H
A _{end}	+ mf	0	+ mf	0	++++	0 / +	0	++++	0	H
A _{el}	0(el)	0	0(el)	0	++++	++	0 / +	++++	0	H
B ₃	0	++ mf	++ mf		++++	++++	+++	0	0	B/H
B _x	0	0/W	W / ++		++++	++++	+++	W	0	(B)/H
B _m	0	0/W	0/W		++++	++++	+++	0	0	B/(H)
BeI	0	0(el)	0(el)	0	++++	0	0	0 / +	0	H
B(A)	0	++++	++++	0	+	++++	++++	0	0	B/H
A(B)	++++	0	++++	++++	+++	0	0	++++	0	AH
cisAB	++++	++ mf	++++	0	++	0	0	W	0	H/A/B

+ :凝集;0:不凝集;mf:混合外观

【思考题】

1. 对于未产生抗-A₁抗体的A型受血者,当输注红细胞时,输血原则是什么?
2. 待检红细胞与抗-A出现凝集,与抗-A₁无凝集,考虑哪些可能性?

(赵国华)

实验四 Rh 表型分型

【实验原理】

用抗-D、抗-E、抗-C、抗-c、抗-e试剂鉴定待测红细胞上的相应Rh血型抗原。

【器材、试剂与标本】

1. 器材 滴管、试管、标记笔、离心机、显微镜。
2. 试剂 抗-D、抗-E、抗-C、抗-c、抗-e试剂,生理盐水。
3. 标本 2%~5%的抗凝或不抗凝待检红细胞生理盐水悬液。

【操作步骤】

1. 取5支小试管,做好标记,分别加入抗-D、抗-E、抗-C、抗-c、抗-e血清定型试剂1滴。
2. 再分别加入1滴2%~5%的待检红细胞生理盐水悬液。
3. 轻轻混匀,根据试剂厂商的使用说明书进行离心。通常条件是室温,(900~1000)×g离心15~30秒。
4. 轻轻摇动试管,判断结果并记录。

【实验结果】

5种抗血清与红细胞所确定的Rh表型结果判断见表1-4。

表 1-4 Rh 表型结果判断

抗血清					表型
抗-D	抗-C	抗-E	抗-c	抗-e	
+	+	-	+	+	CcDee
+	+	-	-	+	CCDee
+	+	+	+	+	CcDEe
+	-	-	+	+	ccDee
+	-	+	+	+	ccDEe
+	-	+	+	-	ccDEE
+	+	+	-	+	CCDEe
+	+	+	+	-	CcDEE
+	+	+	-	-	CCDEE
-	-	-	+	+	ccdee
-	+	-	+	+	Ccdee
-	-	+	+	+	ccdEe
-	+	+	+	+	CcdEe

+ :凝集; - :不凝集

【临床意义】

Rh 血型系统通过输血或妊娠可产生免疫性抗体,当与相应抗原结合,可发生溶血反应或新生儿溶血病;严重者可致患者致残或死亡。而 D 抗原的抗原性最强,其抗体与输血的关系仅次于 ABO 血型,故一般临床输血中需要做 D 抗原的血型鉴定。

【方法学评价】

试管法进行 RhD 血型鉴定时,当反应强度 < ++ 时,应该进一步排除弱 D 型。当判断血型出现困难时,可采用分子生物学等方法确认血型。

【注意事项】

1. 如果临床上只要检查 Rh 阳性或阴性,只需用抗-D 血清进行鉴别,如果为阴性反应,应进一步排除弱 D 型,再做 Rh 表型分型。
2. 鉴定结果只与抗-D 血清凝集,不和抗-E、抗-C、抗-c 和抗-e 凝集,则待检者为 Rh 缺失型,以“-D-”表示。

【思考题】

1. 哪些是中国人常见的 Rh 表型?
2. RhD 阳性患者,血浆中检出抗-E 抗体,输血时可选择哪种 Rh 表型红细胞?

(赵国华)

实验五 MNS 血型鉴定

【实验原理】

用 IgM 类特异性抗-M、抗-N、抗-S 和抗-s 标准血清来鉴定红细胞上有无相应的 M、N、S、s 抗原。

【器材、试剂与标本】

1. 器材 滴管、试管、标记笔、离心机、显微镜等。
2. 试剂 单克隆抗-M、抗-N、抗-S、抗-s 试剂,生理盐水。
3. 标本 2% ~5% 待检红细胞生理盐水悬液。

【操作步骤】

1. 取4支小试管,分别标记抗-M、抗-N、抗-S和抗-s,然后加入相应的抗-M、抗-N、抗-S和抗-s试剂血清1滴。
2. 分别加入2% ~5%的待检红细胞生理盐水悬液1滴。
3. 轻轻混匀,根据试剂厂商的使用说明书进行离心。通常条件是室温,(900 ~1000) ×g 离心15 ~30秒。
4. 轻轻摇动试管,判断结果并记录。

【实验结果】

结果判断见表1-5。

表1-5 MNSs 血型鉴定表

红细胞与相应抗血清反应				判定血型
抗-M	抗-N	抗-S	抗-s	
+	-	/	/	MM
+	+	/	/	MN
-	+	/	/	NN
/	/	+	-	SS
/	/	+	+	Ss
/	/	-	+	ss

+ :凝集; - :不凝集; / :未检测

【临床意义】

1. IgM类抗-M和抗-N偶尔可见有天然抗体,导致交叉配血实验不合。
2. IgG类抗MNS血型系统抗体(抗-S、抗-s抗体)可引起新生儿溶血病及溶血性输血反应。如怀疑该系统抗体时,需要对患者进行相应抗原检测。
3. 我国汉族人群中M型在45% ~50%之间。

【方法学评价】

不能用酶法鉴定M、N抗原,因为木瓜蛋白酶或菠萝蛋白酶会破坏大部分糖蛋白A和B上的抗原,造成假阴性结果。

【注意事项】

抗-M及抗-N血清系用含M或N的红细胞免疫家兔和再吸收后制成。每次试验应严格掌握温度和试剂,同时需要做阳性及阴性对照。

【思考题】

1. 抗-M、抗-N抗体是否有临床意义?
2. 检测M、N抗原时,能否用酶法,为什么?

(赵国华)

实验六 P 血型鉴定

【实验原理】

P 血型系统只有 P_1 抗原, P_1 抗原阳性者为 P_1 表型, P_1 抗原阴性者为 P_2 表型, P_1 、 P_2 表型是最常见的表型。临床上用抗- P_1 血清将红细胞分为 P_1 和 P_2 两种表型。

【器材、试剂与标本】

1. 器材 滴管、试管、标记笔、离心机、显微镜。
2. 试剂 抗 P_1 血清, P_1 和 P_2 红细胞生理盐水悬液。
3. 标本 2% ~ 5% 待检红细胞生理盐水悬液。

【操作步骤】

1. 取 3 支试管, 分别标记为待检者、 P_1 对照、 P_2 对照, 各加入抗- P_1 血清 1 滴。
2. 再按标记分别加入待检者 2% ~ 5% 的待检红细胞生理盐水悬液、 P_1 、 P_2 红细胞生理盐水悬液各 1 滴。
3. 轻轻混匀, 根据试剂厂商的使用说明书进行离心。通常条件是室温, $(900 \sim 1000) \times g$ 离心 15 ~ 30 秒。
4. 轻轻摇动试管, 判断结果并记录。

【实验结果】

P_1 对照凝集, P_2 对照不凝集, 此时待检者红细胞凝集者为 P_1 表型, 不凝集者则 P_2 表型。

【临床意义】

1. P_2 表型者可自然产生抗- P_1 , 抗- P_1 一般为冷抗体, 通常在 30°C 以上不出现凝集现象, 故一般不引起输血反应, 不会引起新生儿溶血病。
2. 我国汉族人群中 P_1 型占 39.67%, P_2 型占 60.33%。

【方法学评价】

P 血型鉴定应注意反应时间, 否则易出现假阳性。

【注意事项】

抗- P_1 常为冷凝集 IgM, 4°C 为最适反应温度。

【思考题】

抗- P_1 抗体是否具有临床意义?

(赵国华)

实验七 唾液中 HAB 血型物质测定

【实验原理】

HAB 血型物质除存在于人红细胞上外, 也存在于某些人的分泌液中, 大约 78% 的个体能生成水溶性的 HAB 抗原, 分泌液中含有血型物质的个体称为分泌型, 反之则称为非分泌型。

唾液中 HAB 血型物质为半抗原, 属糖蛋白, 能特异性地与相应抗体结合, 从而抑制抗体与相应红细胞发生凝集, 通过 HAB 抗血清抑制试验能够证明这些血型物质存在于唾液中, 有助于 ABO 亚型的分类及某些特殊情况下血型的鉴定。

【器材、试剂与标本】

1. 器材 烧杯、电炉、离心机、试管。

2. 试剂 抗-A、抗-B和抗-H血清试剂,A、B、O型和Le(a+b-)试剂红细胞,生理盐水。

3. 标本 待检唾液10ml,已知分泌型、非分泌型个体唾液,Le阳性、Le阴性个体唾液。

【操作步骤】

1. 唾液标本的制备

(1)在一个小烧杯或敞口试管中收集10ml唾液。为了促进唾液分泌,提供唾液者可以咀嚼蜡、石蜡或橡皮带等物,但不能是口香糖或任何含糖或蛋白质的东西。

(2)将收集的唾液1000×g离心10分钟。

(3)将上清转移到一支洁净试管中,放入沸水浴中煮沸10分钟,使唾液淀粉酶失活。

(4)1000×g离心10分钟,留取上清液于另一洁净试管中。

(5)如果试验要在几个小时内完成,可将样品保存在4℃。如果试验不能在一天内完成,则将标本保存在-20℃。

2. 抗血清的标化

(1)准备倍比稀释的血型试剂(抗血清)稀释液。

(2)取4组小试管,分别标记抗-A、抗-B、抗-H和抗-Le^a。

(3)在已标记好的试管中分别加1滴血型试剂稀释液和1滴5%的红细胞悬液。用A、B和O型红细胞分别检测A、B或H分泌型,用Le(a+b-)红细胞检测Lewis分泌型。

(4)1000×g离心15秒,肉眼观察凝集。

(5)选择凝集反应出现++的试剂的最高稀释度进行凝集抑制试验。

3. HAB血型物质凝集抑制试验

(1)标记4支试管,对于HAB检测,标记“分泌型”、“非分泌型”、“盐水对照”和“待检”;对于Lewis检测,标记“Lewis阳性”、“Lewis阴性”、“盐水对照”和“待检”。

(2)在每支试管里各加1滴适当稀释的血型试剂(抗血清)稀释液。

(3)在“分泌型”、“非分泌型”和“待检”管中各加1滴经适当处理的相应唾液标本,在“盐水”管中加1滴盐水。

(4)混匀,室温孵育10分钟。

(5)每管中加1滴洗涤过的5%指示红细胞盐水悬液。相应的ABO型细胞对应HAB分泌型,Le(a+)细胞对应Lewis分泌型。

(6)混匀,室温孵育30~60分钟。

(7)1000×g离心15秒,肉眼观察凝集反应和效价变化情况。

【实验结果】

见表1-6和表1-7。

表1-6 唾液凝集抑制试验(应用抗-H)结果分析

被检唾液	分泌型唾液	非分泌型唾液	盐水对照	结果
++	-	++	++	H非分泌型
-	-	++	++	H分泌型

+ :凝集; - :不凝集

表 1-7 唾液凝集抑制试验(应用抗- Le^a)结果分析

被检唾液	Le 阳性唾液	Le 阴性唾液	盐水对照	结果
++	-	++	++	Lewis 阴性
-	-	++	++	Lewis 阳性

+ :凝集; - :不凝集

1. 指示细胞与抗体发生凝集反应说明唾液中不含相应血型物质。
2. 指示细胞与抗体不发生凝集反应说明唾液中含有相应血型物质。
3. 若盐水对照管的抗体未与指示细胞凝集,则唾液试验结果无效。这常常是由于试剂的稀释倍数太大引起的,需要重新找出最适稀释度并按上述步骤重新试验。

【临床意义】

1. A 型分泌型人唾液中含有 A 型物质,B 型分泌型人唾液中含有 B 型物质,O 型分泌型人唾液中含有 H 型物质,AB 型分泌型人唾液中含有 A 及 B 型物质。H 型物质在 A、B、O 及 AB 四型分泌型人唾液中均存在,但以 O 型人含量最多。

2. 当患者因输血导致 ABO 血型鉴定困难时,对于分泌型患者,可进行血型物质检测辅助确定 ABO 血型。

【方法学评价】

1. 有的唾液标本中血型物质浓度太高,可能会有假阴性结果,需要在试验前先将唾液进行稀释。

2. 这种筛选过程还可用于对唾液中血型物质进行半定量检测。用盐水将待检唾液连续稀释后进行检测,能够抑制抗体活力的唾液稀释度越高,唾液中的血型物质含量就越多。

【注意事项】

1. 使用已知分泌型和非分泌型者的唾液作为对照。对于 HAB 检测,要使用鉴定为 Se 和 $sese$ 的人唾液。对于 Lewis 检测,使用红细胞为 $Le(a+b-)$ 或 $Le(a-b+)$ 的人唾液作为阳性对照,用 $Le(a-b-)$ 的人唾液作阴性对照。已知唾液分泌型人的唾液经处理后可冻存,以便日后使用。

2. 为了检出或测量唾液中除 H 物质外的 A 或 B 物质,可以用稀释过的抗-A 或抗-B 试剂进行同样操作。抗-A 或抗-B 稀释抗血清可以分别用 A 或 B 细胞滴定抗血清的方法决定。

3. 一个表现为 HAB 分泌型的 Lewis 阳性个体可以用确定唾液中 Le^a 的方法确定 Le^b ,如唾液 Le^b 阳性,即为 Lewis 阳性,同时又为 HAB 分泌型人,其唾液中应有 Le^a 和 Le^b 血型物质。表现 $Le(a+)$ 、基因型 se/se 、不分泌 HAB 物质的人,其唾液中只有 Le^a 血型物质。

【思考题】

1. 红细胞上的 Lewis 抗原是从哪里来的?
2. 如果某个体有 Le 基因, Se 基因,其唾液中会有哪些血型物质?

(赵国华)

实验八 ABO 基因分型

【实验原理】

ABO 血型系统是目前临床输血最重要的血型系统之一,常规采用血清学方法进行检测