



“十二五”江苏省高等学校重点教材



医学检验技术实验系列教程

丛书主编 邵启祥 许文荣

丛书主审 郑铁生 柴顺根 周天戟

Medical Laboratory Experiments Series of Tutorials

临床输血学检验技术 实验指导

主 编 孙晓春 丛 辉

副主编 陈卫民 徐长根



“十二五”江苏省高等学校重点教材(编号:2013-2-053)

医学检验技术实验系列教程

临床输血学检验技术 实验指导

丛书主编 邵启祥 许文荣

丛书副主编 鞠少卿 朱雪明 马 萍

丛书主审 郑铁生 柴顺根 周天戟

本书编委会

主 编 孙晓春 丛 辉

副主编 陈卫民 徐长根

编 者 (按姓氏笔画排序)

丁 爽(徐州医学院)

王忠慧(南通大学医学院)

王 婷(江苏大学医学院)

丛 辉(南通大学医学院)

吕志军(张家港市红十字血站)

孙晓春(江苏大学医学院)

朱阳泉(镇江市中心血站)

陈卫民(徐州医学院)

徐长根(镇江市中心血站)

 江苏大学出版社
JIANGSU UNIVERSITY PRESS

镇 江

图书在版编目(CIP)数据

临床输血学检验技术实验指导 / 孙晓春, 丛辉主编

— 镇江: 江苏大学出版社, 2015.5

ISBN 978-7-81130-959-1

I. ①临… II. ①孙… ②丛… 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 112241 号

临床输血学检验技术实验指导

Linchuang Shuxuexue Jianyan Jishu Shiyan Zhidao

主 编/孙晓春 丛 辉

责任编辑/常 钰

出版发行/江苏大学出版社

地 址/江苏省镇江市梦溪园巷 30 号(邮编: 212003)

电 话/0511-84446464(传真)

网 址/http://press.ujs.edu.cn

排 版/镇江华翔票证印务有限公司

印 刷/句容市排印厂

经 销/江苏省新华书店

开 本/787 mm×1 092 mm 1/16

印 张/6

字 数/145 千字

版 次/2015 年 5 月第 1 版 2015 年 5 月第 1 次印刷

书 号/ISBN 978-7-81130-959-1

定 价/15.00 元

如有印装质量问题请与本社营销部联系(电话:0511-84440882)

序 言

医学检验技术专业的培养目标是培养牢固掌握基础医学和医学检验基本理论知识、基本技能和技术,熟悉临床医学知识,适应社会主义市场经济和社会发展要求的,具有一定创业意识和创新能力的医学检验及医学研究的复合人才。2012年教育部调整了普通高等学校本科专业的设置,将五年制授医学学位的医学检验专业更改成四年制授理学学位的医学检验技术专业,更加突出了对检验技术相关知识的要求。临床检验诊断学是临床医学的重要组成部分,近年来随着生命科学和相关科学的不断发展,临床检验诊断学和相关技术也得到了飞速发展,因此对医学检验教育也提出了更高的要求。实验教学是医学检验技术专业教学的重要组成部分。

江苏大学是国内最早开设医学检验本科专业的五所高校之一,在40余年的医学检验教学工作中,针对医学检验人才培养过程中存在的问题,学校一代代医学检验人倾注了毕生的精力,积累了丰富的教学经验,形成了以优质师资队伍、精品课程和特色教材为一体化的多维教学体系;构建了以新生研讨—本、硕、博联动—教学法改革—国际化培养为基础,推动全局、想象、求异和批判的多元思维模式体系;以实验教学示范中心、重点实验室和优势学科一体化建设促进教学资源的共享,提升学生实践创新能力,先后荣获多项江苏省教学成果奖。在医学检验技术实验教学改革中,构建了通用技术、课程内验证性实验、课程内综合性实验和专业设计性与创新性实验四位一体的模块化体系。在此基础上,为了使我们的教学成果能更好地服务和辐射省内医学检验技术教学,我们申请并获批了“2013年度江苏省高等学校重点教材建设项目”,并联合了我省南通大学、苏州大学、徐州医学院和扬州大学等高校,编写了“医学检验技术实验系列教程”。本教程共分13个分册,覆盖了医学检验技术所有专业课程的实验教学内容。从体例方面充分体现了我们的实验教学改革成果,设置了医学检验通用技术分册和专业课分册。在各个专业课程的实验课程中包含了验证性实验和综合性、设计性实验,最后还设置了医学检验技术专业综合性实验分册和临床案例实验诊断分析分册。通过这个系列教程的教学,学生能在早期较为系统地掌握医学检验专业通用技术,并能将这些技术应用于课程内实验教学。在全面掌握了各个专业课程的技术以后,我们希望经过专业综合性实验训练和临床诊断案例分析,使学生对临床疾病的复杂性有较为全面的整体性认识,以提高临床适应能力,为随后开展临床实践奠定良好的基础。

本教程是教学改革的一次初步尝试,在体例、内容安排上不一定能完全适应现代医学检验教学改革和人才培养的需求,还需要不断完善。希望各位专家、教师、检验界同行和同学在使用本教程过程中多提宝贵意见,以便我们进一步提高教程的质量,为广大师生提供优质的实验教学用书,共享我们教学改革的成果。

在此特别感谢 BD 公司对本系列教程出版的大力支持。

邵启祥 许文荣

2014 年 6 月于江苏大学医学院

前 言

根据《教育部关于印发〈普通高等学校本科专业目录(2012年)〉〈普通高等学校本科专业设置管理规定〉等文件的通知》(教高〔2012〕9号)精神,自2013年起全国医学检验专业的本科教学学制由“五年制”的医学检验专业改为“四年制”的医学检验技术,专业属性由“医科”门类改为“理科”门类。这一变革对医学检验本科教育的影响深远,并对医学检验技术专业的相关教学体系和内容提出了新的要求。

临床输血学检验技术是医学检验技术专业的主干专业课之一,而实验教学是其重要的组成部分。近年来,随着生命科学和其他相关科学的革命性发展,输血学相关理论与技术呈现同步快速发展态势。为适应教学体系的变革和输血学相关技术的进步,我们此次以江苏大学、南通大学、徐州医学院和镇江市中心血站为主体,合作编写了主要针对“四年制”医学检验技术专业的《临床输血学检验技术实验指导》。考虑到国内各高校医学检验技术专业的教学条件,同时,要体现实验教程的实用性和指导性,在参照国内已出版的《临床输血检验》和其他相关教材或实验规程的基础上,结合编者实践和教学的经验与体会,编写成本书。本教材既保留了经典的实验内容,也增加了很多新技术和新方法,以适应当前临床实际工作的需要。

本教材主要供高等院校医学检验技术专业作为实验教材使用,亦可供临床医学专业本科生和研究生作为必修课或选修课教材,还可作为临床检验工作者、参加继续教育和职称考试人员的参考用书。由于编写时间较紧和作者专业能力水平所限,本教材在语言组织和专业知识见解上可能存在不足。希望同仁和同学们在使用过程中,对不足之处给予批评指正,并提出宝贵建议。最后,对参与编写的各位同仁表示诚挚的谢意,感谢大家在百忙之中抽出时间合作完成本书。

孙晓春

2015年5月于江苏大学医学院

目 录

实验一 ABO 血型鉴定	1
实验二 ABO 亚型鉴定	5
实验三 RhD 血型鉴定	8
实验四 Rh 表型分型	10
实验五 唾液中 ABH 血型物质鉴定	12
实验六 不完全抗体的筛选与鉴定	15
实验七 抗体效价测定	21
实验八 交叉配血实验	25
实验九 吸收实验	33
实验十 放散实验	36
实验十一 抗球蛋白实验	42
实验十二 新生儿血清游离抗体测定	47
实验十三 新生儿红细胞抗体释放实验	50
实验十四 白细胞血清学分型方法	52
实验十五 白细胞细胞学分型方法	57
实验十六 简易致敏红细胞血小板血清学实验	60
实验十七 血小板相容性交叉配血实验	63
实验十八 悬浮红细胞的制备	65
实验十九 洗涤红细胞的制备	67
实验二十 冰冻解冻去甘油红细胞的制备	69
实验二十一 手工分离浓缩血小板的制备	71
实验二十二 冷沉淀的制备	74
附录一 血站实验室质量管理规范	77
附录二 献血者健康检查要求	83

实验一 ABO 血型鉴定

ABO 血型鉴定包括正定型和反定型。正定型是指用已知特异性抗体鉴定红细胞膜表面上的抗原;反定型是指用已知血型红细胞鉴定血清中的抗体。正、反定型结果应相互验证,结果一致才能报告 ABO 血型结果。

【原理】

1. 正定型:标准抗血清和被检红细胞在盐水介质中反应,标准抗血清中含有已知 IgM 类特异性抗体,如被检红细胞膜上含有相对应特异性抗原,则能出现红细胞凝集现象,从而判断和鉴定被检者的血型。

2. 反定型:用已知的标准 A 型、B 型、O 型红细胞与被检血清反应,若被检血清与已知型别标准红细胞发生凝集,证明被检血清中存在着与该红细胞抗原相对应的抗体。反之,若被检血清与已知型别标准红细胞不发生凝集,证明被检血清中不存在与该红细胞抗原相对应的血型抗体。如红细胞上有 A(B) 抗原,血清中就没有抗 A(抗 B);如红细胞上没有 A(B) 抗原,血清中就存在抗 A(抗 B),据此反证被检者红细胞上抗原的型别。

【实验材料】

1. 主要器材:小试管,载玻片,微孔板,标记笔,微量移液器,吸头,离心机和显微镜等。
2. 主要试剂:生理盐水,抗 A、抗 B 试剂(单克隆抗体),2% ~ 5% 的 A 型(Ac)、B 型(Bc)和 O 型(Oc)红细胞悬液。
3. 标本:EDTA-K₂ 抗凝全血。

【操作方法】

(一) 试管法

1. 正定型

(1) 标本制备:① 分离血浆:取标本,编号,1000 × g 离心 5min,取上层血浆于试管中,标记。② 洗涤红细胞:加入约 1 ~ 2 倍体积生理盐水于上述红细胞管中,混匀,洗涤,同上离心,弃去上清液。重复操作 2 ~ 3 次,末次洗涤后的上清液应清亮并完全弃去。③ 制备 2% ~ 5% 红细胞悬液:取小号试管 1 支,按表 1-1 加入洗涤后的压积红细胞和生理盐水,混匀,标记。

表 1-1 红细胞悬液的配制

红细胞浓度(%)	压积红细胞(μL)	生理盐水(mL)
1	50	5.0
2	50	2.5
5	50	1.0
10	50	0.5

(2) 标记:取小试管 2 支,编号,标记“抗 A”和“抗 B”。

(3) 加抗体:分别用微量移液器在各管中加 $50\mu\text{L}$ 相应抗 A、抗 B。

(4) 加待检红细胞悬液:用微量移液器在各管中分别加 $50\mu\text{L}$ 待检 2%~5% 红细胞悬液,轻轻混匀。

(5) 离心: $1000 \times g$ 离心 15s。

(6) 观察结果:先观察上清液有无溶血,再用中指轻轻弹摇试管,边弹边观察红细胞浮起程度、有无凝集现象及凝集程度。如肉眼观察可疑凝集,取反应物于玻片上,用低倍镜观察,记录观察结果。红细胞凝集强度判断标准见表 1-2。

表 1-2 试管法红细胞凝集程度的判断标准

凝集强度	判断标准
4+	红细胞凝集成结实大凝块,背景清晰透明,无游离红细胞
3+	红细胞凝集成数个凝块,背景尚清晰,极少游离红细胞
2+	红细胞凝块分散成许多中、小凝块,背景稍混浊,周围可见到游离红细胞
1+	肉眼可见大颗粒,背景混浊,镜下较多凝集,有较多游离红细胞
\pm	肉眼观察几乎无凝块或有无数微小凝块,背景混浊,镜下可见大多数视野中有 6~8 个红细胞凝集在一起,有很多游离红细胞
MF	镜下可见少数红细胞凝集,绝大多数红细胞仍呈分散分布,凝集和散在红细胞混合
阴性	轻摇试管,红细胞呈均匀悬液,镜下未见红细胞凝集,红细胞均匀分布

注:玻片法、微孔板法凝集强度结果判断标准相同;MF 为混合外观凝集。

2. 反定型:取 3 支小试管,分别在管上标记“Ac”、“Bc”和“Oc”,于各管中分别加 $50\mu\text{L}$ 受检者血浆(血清),再分别加入 $50\mu\text{L}$ 和标记相对应的标准红细胞,轻轻混匀。按照正定型法离心,观察结果。

3. 判断结果:结合正、反定型结果,受检者红细胞 ABO 血型判定标准见表 1-3。

表 1-3 血型结果判定标准

正定型 (标准血清 + 受检者红细胞)		受检者血型	反定型 (标准红细胞 + 受检者血清)		
抗 A	抗 B		B 型红细胞	O 型红细胞	A 型红细胞
+	-	A	-	+	-
-	+	B	+	-	-
-	-	O	+	+	-
+	+	AB	-	-	-

注: + 为凝集或溶血, - 为不凝集。

4. 报告结果:红细胞 ABO 血型鉴定:_____型(盐水介质试管法)

(二) 玻片法(正定型)

1. 制备 10% 红细胞悬液:同试管法。
2. 标记:取清洁玻片 1 块(或白瓷板 1 块),用蜡笔划成两个方格,标明“抗 A”“抗 B”。
3. 加抗体:分别用微量移液器滴加抗 A、抗 B 各 50 μ L 于相应的方格内。
4. 加红细胞悬液:用微量移液器各加受检者 10% 红细胞悬液 50 μ L 于方格内。
5. 观察结果:室温下,将玻片(或白瓷板)不断轻轻摇动,使血清与细胞充分混匀,放置 1~5min,观察有无凝集(或溶血)反应,结果可疑时用低倍镜观察结果,或用试管法重做实验。

6. 判断结果:按表 1-3 判断血型结果。

7. 报告结果:红细胞 ABO 血型鉴定:_____型(盐水介质玻片法)

【注意事项】

1. 玻片法不适用于检验血清或血浆中 ABO 抗体,不适用于反定型。试管法鉴定 ABO 血型时必须做正、反定型,两者结果一致才能报告结果。反定型的意义:① 能够复检正定型血型结果的准确性;② 发现正定型难以发现的弱抗原亚型,如 AB₂型,因 B 抗原较弱在正定型中它常常被误定为 A 型;③ 能够纠正某些患者因疾病原因造成的红细胞抗原减弱所致血型错误;④ 能够排除获得性抗原和冷凝集现象对红细胞定型的干扰;⑤ 发现一些亚型中的不完全抗体。

2. 试剂从冰箱取出后应平衡至室温再使用,用完后应立即放回 2~8 $^{\circ}$ C 环境保存,防止污染,并在有效期内使用,如试剂出现变质或变色、红细胞出现凝集或溶血,就不能再继续使用。标准红细胞配制时用 3 个健康人同型新鲜红细胞混合,用生理盐水洗涤,除去血清中的抗体及可溶性抗原,然后配成 2%~5% 的红细胞悬液。

3. 血液标本无溶血,最好用 EDTA 盐或枸橼酸钠抗凝,螯合 Ca²⁺ 以减少溶血。标本置 4 $^{\circ}$ C 保存 7 天,以备复查。

4. 一般应先加抗体(血浆或血清),后加红细胞悬液,以便核实是否漏加抗体。注意红细胞悬液与抗体比例,滴管口径及加样(试剂)的倾斜度最好一致。

5. 离心能促进抗原和抗体的接触和结合,提高反应敏感性和缩短反应时间,但离心时间和速度应严格遵从操作规程,以防出现假阳性或假阴性结果。

6. IgM 抗 A 和抗 B 与相应红细胞反应的最适温度为 4°C ,但为了防止冷凝集的干扰,一般在室温($20\sim 24^{\circ}\text{C}$)下进行实验, 37°C 可使反应减弱。反定型的凝集常常较弱,在凝集结果不明显时,室温放置 $5\sim 15\text{min}$ 可增强凝集反应。 4°C 放置 $15\sim 30\text{min}$ 或酶处理红细胞均可增强反应。

7. 观察结果时,从离心套拿出试管时动作要轻,在观察结果前勿摇动试管,首先观察上清液有无溶血,如发生溶血提示为强阳性反应,但也不排除其他原因引起溶血,应认真分析原因。反应弱凝集结果很难观察时要用显微镜检查。

8. 原则上所有血液样本及与血液有接触的材料都视同传染性物质,操作时应按《实验室生物安全通用要求》(GB19489—2008)处理。

【临床意义】

1. 用于输血前的检查。输血前必须准确鉴定供血者与受血者的血型,选择同型血,经交叉配血相符后才能输血。

2. 用于器官移植前的检查。ABO 血型抗原广泛分布于人体内除神经细胞外的各种组织细胞、体液、分泌液中,是一种移植抗原。在器官移植时,应力求受体和供体的 ABO 血型一致。

3. 用于新生儿溶血病的检查。母子 ABO 血型不合可引起新生儿溶血病(HDN),主要通过血型血清学检查来诊断。

4. 用于亲子鉴定、法医学鉴定及某些疾病相关调查等。

【思考题】

1. 血型鉴定时,为什么要做反定型?

2. 血型鉴定时正、反定型不一致的可能原因有哪些?如何解决?



实验二 ABO 亚型鉴定

ABO 血型正、反定型时不符合 ABO 血型特点,出现不应有的凝集或凝集强度减弱现象,要考虑 ABO 血型亚型不合。

ABO 亚型正定型:用抗 A、抗 B、抗 AB、抗 H、抗 A₁ 血清鉴定红细胞上的抗原。ABO 亚型反定型:在 ABO 反定型基础上增加 A₂ 型红细胞,必要时同时开展吸收放散实验和唾液血型物质的检测等。

常见亚型的主要特征及区别:① ABO 亚型大多 H 抗原增强,H 抗原强弱的次序为 O > A₂ > B > A₂B > A₁ > A₁B;② A₃、A_m 抗原与抗 A 及抗 AB 的反应强度基本相似,A_x 与抗 AB 的反应强度明显高于抗 A;③ A₂、A₃、A_x 常会出现不规则抗 A(抗 A₁),A_m 则没有抗 A₁;④ A₃、A_m 分泌型的唾液内可检出 A 及 H 物质,分泌型 A_x 只可检出 H 物质;⑤ A₃ 有混合视野。

一、A₁ 和 A₂ 亚型鉴定

【原理】

根据 ABO 血型的血清学特点,A 型和 AB 型可分为 A₁、A₂、A₁B、A₂B 亚型。抗 A(B 型)血清中含有抗 A 和抗 A₁(IgM)两种抗体;抗 A 可以凝集所有 A 型和 AB 型红细胞,而抗 A₁ 只能与一部分 A 型和 AB 型红细胞反应。因此,凡与抗 A₁ 反应的红细胞被鉴定为 A₁ 型或 A₁B 型;不与抗 A₁ 反应而与抗 A 反应的红细胞被鉴定为 A₂ 型或 A₂B 型。

ABO 血型系统还有一些与抗 A、抗 B 和(或)抗 AB 凝集反应很弱或不反应的亚型红细胞,只能通过吸收、放散实验和唾液中血型物质进行进一步鉴别。

【实验材料】

1. 主要器材:小试管,试管架,标记笔,一次性吸管,微量移液器,离心机,载玻片和显微镜等。
2. 主要试剂:抗 A₁ 血清,2% ~ 5% 受检者红细胞,已知 A₁ 型和 A₂ 型 2% ~ 5% 红细胞悬液。
3. 标本:抗凝全血。

【操作方法】

1. 配制红细胞生理盐水悬液:同盐水介质法血型鉴定。

2. 标记、加抗体:取3支小号试管,分别标记“待测”、“A₁”和“A₂”,各管中分别加入抗A₁血清50μL。

3. 加红细胞悬液、离心:在上述各试管中分别加受检者红细胞悬液、A₁和A₂标准红细胞悬液各50μL,混匀,1000×g离心15s。

4. 观察及判断结果:如A₁对照红细胞凝集而A₂对照红细胞不凝,则受检者红细胞凝集者为A₁,不凝者为A₂。

二、其他 ABO 亚型鉴定

【操作方法】

1. 正定型:待检红细胞与抗A、抗A₁、抗B、抗H及抗AB进行反应,观察凝集反应强度。

2. 反定型:待检血清与2%~5%的A₁型、A₂型、B型及O型标准红细胞反应,观察凝集反应强度。

3. 吸收与放散实验:待检血清与2%~5%的A₁型、A₂型、B型及O型标准红细胞反应,进行吸收与放散实验,观察凝集反应强度。

4. 凝集抑制实验:检测分泌型个体唾液中的A、B和H物质的存在与缺失。

5. 判断及报告结果:根据表2-1综合分析做出判断。

表 2-1 ABO 亚型的血清学反应鉴定表

红细胞表型	红细胞与已知抗血清反应					血清与标准红细胞反应				唾液分泌型
	抗A	抗B	抗AB	抗H	抗A ₁	A ₁	A ₂	B	O	
A ₁	4+	-	4+	1+	4+	-	-	4+	-	A、H
A _{int}	4+	-	4+	3+	2+	-	-	4+	-	A、H
A ₂	4+	-	4+	3+	-	-/2+	-	4+	-	A、H
A ₃	2+/MF	-	2+/MF	3+	-	-/2+	-	4+	-	A、H
A _m	-/w+	-	-/w+	4+	-	-	-	4+	-	A、H
A _x	-/w+	-	+/2+	4+	-	-/2+	-/+	4+	-	H
A _{el}	-	-	-	4+	-	-/2+	-	4+	-	H
A _h	w+	-	w+	-	-	+	+	4+	3+	O
A _h 孟买	w+	-	w+	-	-	-	-	4+	-	A、H
B	-	4+	4+	2+	-	4+	3+	-	-	B、H
B ₃	-	2+/MF	2+/MF	4+	-	4+	3+	-	-	B、H
B _m	-	-/w+	-/w+	4+	-	4+	3+	-	-	B、H
B _x	-	-/w+	w+/2+	4+	-	4+	3+	w+	-	H

续表

红细胞 表型	红细胞与已知抗血清反应				血清与标准红细胞反应				唾液 分泌型	
	抗 A	抗 B	抗 AB	抗 H	抗 A ₁	A ₁	A ₂	B		O
B _h	-	w+	w+	-	-	4+	3+	+	3+/4+	无
B _m ^h 或 B _h 孟买	-	w+	w+	-	-	4+	3+	-	-	B、H
B(A)	+ / 2+	4+	4+	- / +	-	4+	3+	-	-	B、H
A ₂ B	4+	4+	4+	-	-	- / 2+	-	-	-	H/A/B
A ₃ B	MF	4+	4+	-	-	- / +	-	-	-	H/A/B
O	-	-	-	4+	-	4+	4+	4+	-	H
O _h	-	-	-	-	-	4+	4+	4+	4+	-

注: + ~ 4+ 为凝集强度递增; w+ 为弱凝集; MF 为混合凝集外观; - 为无凝集。

【注意事项】

1. 新生儿红细胞血型抗原较弱, 不宜做亚型定型。
2. 严格按操作规程或试剂盒说明书操作。
3. 如 A₁ 和 A₂ 对照红细胞都凝集, 表示抗 A₁ 血清有问题; 如 A₁ 和 A₂ 对照红细胞都不凝集, 需延长观察时间, 如果仍未凝集, 亦说明抗 A₁ 血清有问题。

【临床意义】

1. 亚型鉴定的意义在于为受血者选择合适的血液, 如患者血液中没有抗 A₁ 等意外抗体, 通常不必进行亚型鉴定。
2. 分析正、反定型实验不符的结果, 防止误定血型, 引起临床溶血性输血反应。抗 A₁ 可干扰血型鉴定或者交叉配血实验, 导致正、反定型不符或配血不合。

【思考题】

1. 待检红细胞与抗 A 出现凝集, 与抗 A₁ 无凝集, 考虑有哪些可能性?
2. 在临床输血工作中是否有必要常规检测 A₂ 亚型? 为什么?

实验三 RhD 血型鉴定

RhD 抗原鉴定根据所用抗体的类型分别选择不同方法,如为 IgM 抗 D 抗体,可用盐水介质法、中性凝胶微柱法;如为 IgG 抗 D 抗体,可用酶介质法、抗人球蛋白介质法、聚凝胺介质法和抗人 IgG 抗体特异凝胶微柱法等。

【原理】 盐水介质法

单克隆 IgM 抗 D 试剂与红细胞上 D 抗原反应,在盐水介质中产生肉眼可见的凝集反应。

【实验材料】

1. 主要器材:小试管,试管架,标记笔,一次性吸管,微量移液器,离心机,载玻片和显微镜等。
2. 主要试剂:生理盐水,单克隆 IgM 抗 D 试剂,RhD 阳性和阴性红细胞。
3. 标本:抗凝血或不抗凝红细胞,配成 2%~5% 待检红细胞悬液。

【操作方法】

1. 标记:取 3 支小试管,分别标记“待检”、“阳性对照”和“阴性对照”。
2. 加试剂:各管加入 50 μ L 单克隆 IgM 抗 D 试剂。
3. 加红细胞悬液:在各管中分别对应加入 50 μ L 待检红细胞悬液、5% RhD 阳性和阴性红细胞悬液,混匀。
4. 离心:以 1000 \times g 离心 15s(或按照试剂说明书要求进行)。
5. 观察结果:轻摇试管,肉眼或镜检观察红细胞有无凝集。
6. 判断结果:阳性管凝集,阴性管不凝集。待测管凝集为阳性,不凝集为阴性。

【注意事项】

1. 可以采用玻片法鉴定,红细胞浓度一般为 30%~50%,反应 2min 后观察结果。
2. Rh 定型主要鉴定 D 抗原,定型时应按抗 D 血清试剂的使用说明进行,并注意必须有严格的对照实验,包括阴性对照、阳性对照和试剂对照实验。
3. Rh 血型系统的抗体多由后天免疫刺激(输血或妊娠)产生,不需做反定型实验,也不能通过反定型验证 Rh 血型。



4. 待检红细胞与抗 D 试剂在盐水介质中(如玻片法、试管法)不凝集,应进行 Rh 阴性确认实验,一般使用 3 种以上 IgG 抗 D 试剂进行间接抗球蛋白实验。如 3 种 IgG 抗 D 试剂抗球蛋白实验的结果均为阴性,即可判定为 Rh 阴性,如果抗球蛋白实验有一种或一种以上的 IgG 抗 D 试剂的结果为阳性,即可判定为 Rh 阳性,则该个体为弱 D 表型。

5. 部分弱 D 型个体经输注 RhD 阳性红细胞后可能产生抗 D 抗体。所以受血者若为弱 D 型,应做 Rh 阴性处理,输注 Rh 阴性血液。供血者为弱 D 型者,其血液应视为 Rh 阳性血液。

【临床意义】

1. Rh 血型鉴定及交叉配血。输血前进行 Rh 血型鉴定是保证输血安全的重要措施。一般人正常血清中不存在 Rh 抗体,但鉴于临床情况的复杂性,因此提倡每次输血前均须进行 ABO 和 Rh 血型鉴定。

2. 新生儿溶血病诊断。如果母体血液中含有针对胎儿红细胞的 IgG 类 Rh 抗体,由于 IgG 类 Rh 抗体可以通过胎盘破坏胎儿红细胞,引起新生儿溶血病,因此,检测母体 Rh(D) 抗体,可以尽早发现和避免新生儿溶血病。

【思考题】

1. Rh 血型鉴定还有哪些方法? 各有何优缺点?
2. Rh 阴性个体受到 D 抗原刺激后是否都会产生抗 D?

实验四 Rh 表型分型

Rh 血型是除了 ABO 血型以外,最复杂、最重要的血型系统,其抗原大约有 50 多种。除了最重要的 D 抗原外,其他主要抗原还包括 C、c、E 和 e。其中,D 抗原免疫性最强,在常规检查中,只检查 Rh(D) 阳性和阴性。但是 Rh 系统其他抗原不合,也会引起临床相关输血反应和新生儿溶血病等。因此,这些抗原的重要性不容忽视,临床一般采用盐水介质法将 5 种 Rh 抗血清与患者红细胞做凝集实验,以判断 Rh 血型表型。确切的表型分析能够保证输血治疗的安全,有效预防输血反应的发生。

【原理】

用抗 D、抗 E、抗 C、抗 e 和抗 c 抗体鉴定待测红细胞表面的相应抗原。

【实验材料】

1. 主要器材:试管,试管架,标记笔,一次性吸管,微量移液器,离心机和显微镜等。
2. 主要试剂:生理盐水,抗 D、抗 C、抗 E、抗 c 和抗 e 单克隆或多克隆抗体。
3. 标本:抗凝血或不抗凝红细胞,配成 2% ~ 5% 待检红细胞生理盐水悬液。

【操作方法】

1. 加试剂:取 5 支小试管,做好标记,各管依次分别加入抗 D、抗 C、抗 E、抗 c 和抗 e 试剂各 50 μ L。
2. 加红细胞悬液:于上述试管中加入 2% ~ 5% 待检红细胞生理盐水悬液各 50 μ L。
3. 离心:混匀后,1000 \times g 离心 15s。
4. 观察结果:轻摇试管,肉眼或镜检观察红细胞有无凝集。
5. 判断结果:待测管凝集为阳性,不凝集为阴性。Rh 表型结果判断见表 4-1。

表 4-1 Rh 表型结果判断

抗 D	抗 C	抗血清			表型
		抗 E	抗 c	抗 e	
+	+	-	+	+	CcDee
+	+	-	-	+	CCDee
+	+	+	+	+	CcDEe