

《临床输血与输血技术新进展》

讲 习 班 讲 义

长 沙 血 液 中 心

二〇〇二年三月

前 言

随着现代相关学科的飞速进展，输血从临床的一种治疗手段已逐步发展成为一门独立的学科。近年来我国输血事业不断发展，日新月异。作为一个临床血液工作者，只有通过继续教育，不断地更新知识，才能适应当前临床及科研工作的需要。为了发展我省的输血事业，让我省血站及输血科人员了解当前输血医学的新进展及新动态，我们特编写了这本讲义，对临床输血问题进行讨论，对一些输血新技术、新进展进行介绍。

输血学的学问浩如烟海，本讲义所涉及的问题实属有限，挂一漏万，错误难免，以此抛砖引玉，为我省输血工作的发展尽微薄之力。

编 者

2002 年 3 月

目 录

1、分子生物学技术在血站的应用前景	1
长沙血液中心输血研究室 王赤林	
2、加强血液质量控制保障输血安全	5
长沙血液中心质控科	
3、免疫血液学检测技术与临床应用	9
长沙血液中心输血研究室 李双	
4、安全输血	18
长沙血液中心 黄河	
5、输血不良反应	23
长沙血液中心 李建华	
6、输血传播疾病的预防	32
长沙血液中心 周永生	
7、血细胞分离机的种类和应用	36
长沙血液中心 徐朝霞	
8、血小板的临床应用	42
长沙血液中心 李咏梅	
9、血液保存技术研究进展	47
长沙血液中心输血研究室 王赤林	
10、实验室常用血型血清学试验概况	54
中南大学湘雅医院 石自明	
11、造血干细胞的临床应用	60
长沙血液中心 李建华	

分子生物学技术在血站的应用前景

长沙血液中心输血研究室 王赤林

1953 年 Watson 和 Crick 提出了脱氧核糖核酸 (DNA) 的双螺旋结构模型, 并阐明了 DNA 是遗传信息的携带者, 从而开辟了现代分子生物学的新纪元。近年来, 分子生物学发展迅速, 已渗透到生命科学的各个领域。应用分子生物学技术, 人们对血液的各种成分, 包括红细胞、白细胞、血小板和血浆等开展了大量分子水平的研究, 从而对各种血液成分的结构、功能以及遗传多态性等有了更深入的了解; 应用分子生物学技术, 人们对各种与输血相关的致病因子进行分子水平的研究, 建立更精确的检测手段。在刚刚来临的 21 世纪, 分子生物学将会主导着输血医学的发展, 输血检测技术将由细胞水平向分子水平迈进, 由蛋白质水平向 DNA 水平迈进, 输血会更有效、更安全。

1、分子生物学技术在血型分型中的应用

二十世纪九十年代起, 随着血型基因相继被克隆, 基因结构被阐明, 并在体外得到表达, 现在不仅有可能从分子水平解释人类血型的生物学功能, 而且建立了一套以 DNA 为基础的血型基因分型技术。

1.1 血型基因分型中常用的几种分子生物学技术

1.1.1 PCR-限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 由于限制性内切酶对 DNA 序列具有特异性的识别位点, 通过计算机分析, 选择能够识别 PCR 扩增片段多态性的限制性内切酶, 用其消化 PCR 产物, 便可产生不同长度的碱基片段, 通过凝胶电泳分离 DNA 片段, 然后通过 Southern 印记技术转移到硝酸纤维素或尼龙薄膜上, 通过与特异性的探针杂交来鉴定血型的基因型。此法耗时, 已逐渐被其它方法取代。

1.1.2 PCR-序列特异性寡核苷酸探针 (Sequence specific oligonucleotide probes, SSOP) 根据目的基因的突变或多态性设计、合成与等位基因互补的寡核苷酸探针, 以同位素或异羟基洋地黄毒甙元、辣根过氧化物酶等非同位素标记, 与 PCR 产物即目的 DNA 杂交。如果目的 DNA 与已知核苷酸序列并标记同位素或非同位素的探针互补, 则二者结合, 通过放射显影或酶底物显色, 分析血型的基因型。此法可用于大批量标本检测, 适合建库。如用反向杂交, 实验操作更简易, 适合于少量标本检测。

1.1.3 PCR-序列特异性引物 (Sequence specific primers, SSP) 如果目的基因 DNA 序列清楚, 便可设计出一系列具有等位基因序列特异性的引物, 直接扩增具有各种序列差异的等位基因特异性片段, 然后通过凝胶电泳检测 PCR 产物, 根据是否得到 PCR 产物以及产物片段的大小来判断血型的基因型。此法简便快速, 较适合临床应用。

1.1.4 PCR-单链构象多态性 (Single strand conformation polymorphism, SSCP) 根据不同构象的等长 DNA 单链在中性聚丙烯酰胺凝胶中的电泳速度变化来检测基因变异, 将被检标本的 PCR-SSCP 图谱与一组已知 DNA 序列的等位基因标准品 SSCP 图谱比较,

便可判定其基因型。此法主要用于比较两个体的基因差异，由于解释结果有困难，故未被广泛应用。

1.1.5 DNA 序列测定 使用检测 DNA 碱基排列顺序来鉴定血型的基因型可以提供更精确的信息，并有可能发现新的等位基因，但操作烦琐，费用也高。

1.2 分子生物学技术在红细胞血型分型中的应用

1.2.1 疑难血型鉴定 由于某些疾病引起的血型抗原表达异常，亚型、不规则抗体等多种原因引起的正反定型不符，常采用家系调查、吸收放散等血清学技术解决，但这些方法缺乏力度且较费时，如使用分子生物学方法作基因分型可快速解决此难题。

1.2.2 自身免疫性溶血性疾病 (AIHI) 患者的血型鉴定 AIHA 患者血中有自身抗体或针对自身抗原的致敏淋巴细胞，由于其红细胞上吸附或被抗体致敏，给血型血清学鉴定带来困难，最有效的解决方法就是作基因定型。

1.2.3 亚型鉴定 主要是针对 ABO 亚型。目前国外报道血型亚型必须提供基因水平的研究结果，否则不予承认。

1.2.4 新生儿溶血病产前诊断 检测胎儿红细胞 ABO、Rh 血型是产前 HDN 检查的重要项目，用 PCR-SSP 技术检测羊水中胎儿 Rh 血型基因国内已有报道，目前国外已将用母亲外周血作为检材间接检测胎儿 Rh 血型基因，由于 PCR-SSP 技术的检测极限已达到 ng 水平，少量混入母亲血中的胎儿细胞的遗传信息就可检出。

1.2.5 法医学鉴定 对抗原已被破坏的陈旧样品，对微量的血痕、组织碎片、毛发等检材均可检测其血型基因型，因检测的血型是基因型，较检测表型的个体鉴别能力更高，结果准确。

1.2.6 顺式 AB 分析 现 cis-AB 型的分子基础已经搞清，可以直接进行基因型鉴定，省去了家系调查。

1.2.7 干细胞存活鉴定 在红细胞血型不合的干细胞移植病例，观察血型是否转变是移植物是否存活的重要指标之一，因血型基因定型可直接观察病人血型基因的嵌合、转变状态。

1.2.8 分泌型鉴定 用基因定型方法可直接检测分泌基因 Se 和非分泌基因 se，较用吸收放散试验鉴定唾液中的 ABH 物质判断分泌型与非分泌型，方法更简单可靠。

1.3 分子生物学技术在血小板血型分型中的应用

长期以来，血小板抗原分型一直采用血清学方法，但应用一直受到抗血清来源和病人血小板数量的限制。近年来，随着分子生物学技术的不断发展和人类血小板抗原基因结构研究的突破性进展，使血小板基因分型成为现实，其优势为：不再需要患者的血小板作分型测定，因此血小板极度减少症的血样也可鉴定其血小板基因型；省去了对稀有的血清学试剂的要求。

目前使用基因分型技术可对人类血小板抗原 (HPA) 5 个抗原系统进行鉴定。通过对 HPA 的基因分型，对孕妇作产前预测，从而对新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜作

出正确的评估；可以对临床免疫性血小板疾病进行诊断。对病人和单采者作 HPA 分型，使血小板配合型输血成为可能，从而提高血小板输注的安全性及有效性。

1.4 分子生物学技术在 HLA 分型中的应用

血清学方法是 HLA 分型的经典技术，它需要有活力的 T 和 B 淋巴细胞，由于 HLA 抗血清本身的交叉反应、弱反应以及额外反应等特性，造成 HLA 血清学分型错误率高；此外由于淋巴细胞保存相对比较困难，高质量的单价 HLA 分型血清来源困难，而以 DNA 为基础的 HLA 基因分型方法需要的血样少，制备的 DNA 可长期保存且分型精确可靠，所以已逐渐取代血清学方法。HLA 基因分型技术可用于亲子鉴定、法医个体识别、组织配型、骨髓库及脐血库的 HLA 定型等。

2、分子生物学技术在输血相关传染病原检测中的应用

输血相关传染病毒一直是威胁受血者安全的主要问题，其中 HIV、HCV、HBV 这三种病毒，由于感染率高且危害严重，被世界各国列为献血者及临床使用的血液（包括血液成分及血液制品）的必检项目。自采用高敏感性的病毒标志物（抗-HIV、抗-HCV、HBsAg）检测技术以来，输血传播病毒性疾病的危险性已大大降低，危险性分析结合对感染早期的认识表明，所发生的 HIV、HCV 和 HBV 感染，主要与输入了在“窗口期”采集的血液相关。因此，对输血传播的病毒的检测技术的发展，以缩短“窗口期”为主要目标。

研究表明，病毒感染后，受血者血浆中最先出现的是病毒核酸。对于 HIV，在可检测到 HIV 抗原前约 6 天，可检测到 HIV 抗体前约 10-12 天，就可检测到 HIV RNA；在 HCV 抗体出现前约 40 天，可以检测到 HCV RNA；在 HBsAg 出现前约 25 天，可以检测到 HBV DNA。由此可见，核酸检测技术（nucleic acid testing, NAT）对于进一步减少因输入处于“窗口期”的献血者血液而感染 HIV、HCV、HBV 的危险，保障输血安全有着重要的意义。

为节约检测经费与时间，以 NAT 作为献血者 HIV、HCV、HBV 的筛选试验，通常采用小混合法，即小量血浆样品混合法。HCV 的 NAT 敏感性最好，混合样品的试验结果和单人分试验结果几乎相同。但检测 HIV RNA 和 HBV DNA 的敏感性，由于混合样品法的稀释作用而有影响。上述三种病毒 NAT 的特异性都非常高，在美国早期研究阶段即达到 99.8%。以 NAT 代替目前的血清学试验，成为献血者筛选的主要技术，在不远的将来将成为现实。

2.1 几种常用的病毒核酸检测技术

2.1.1 逆转录 PCR (RT-PCR) PCR 技术不仅可以用作扩增 DNA 模板，也可用来扩增被反转录成 cDNA 形式的特定的 RNA 序列。以 mRNA 为模板逆转录成互补 DNA (cDNA) 的第一条链，然后以这一 cDNA 第一条链为模板进行扩增，特称为 RT-PCR。RT-PCR 是一种检测 RNA 分子的良好方法，HIV RNA、HCV RNA 检测通常采用此法扩增病毒核酸。

2.1.2 荧光 PCR 荧光 PCR 是指 PCR 产物与扩增反应混合物在不经物理分离的情况下，利用荧光测量对 PCR 产物直接进行检测，此法可对核酸进行实时、定量检测，且

因进行闭管检测而有效消除了核酸污染,此法系全自动检测,需使用 PE-7700 或 PE-5700 荧光 PCR 仪。

2.1.3 PCR-ELISA 将酶标记探针包被在微孔板上,以 PCR 产物与探针杂交,通过酶底物显色来检测病毒核酸的方法,此法为定性检测,且为非闭管操作。

2.1.4 多重 PCR 多重 PCR 是在反应体系中加入多对引物,扩增同一模板中的几个不同区域的片段。在病毒核酸检测中,可在同一反应体系中加入多对各种病毒特异性引物进行扩增,阳性标本再进一步进行特异性核酸扩增以确定病毒类型。此法可降低工作量及检测成本。目前已见用此法同时进行 HIV、HCV、HBV 核酸检测的报道。

2.1.5 套式 PCR (nested PCR) 所谓套式 PCR 就是先用一对引物扩增一段目的基因,再用另一对不同的引物在第一次扩增产物的片段内进行部分基因片段的第二次扩增,因为由第一对引物扩增中形成的任何非特异性产物几乎不可能成为第二对引物的模板,从而保证了 PCR 产物的特异性。

2.1.6 核酸序列依赖扩增系统 (NASBA) /转录介导扩增 (TMA) NASBA 和 TMA 是相似的技术,主要用于 RNA 的扩增、检测。反应采用逆相转录的连续循环,只需在一种温度下就可完成,能直接扩增单链 RNA 上的特异的序列。扩增产物 RNA 可用琼脂糖凝胶电泳分析或探针杂交分析。该技术可用于定量检测 HIV RNA、HCV RNA。

2.2 NAT 在 HIV 检测中的应用

NAT 用于 HIV 检测可作 HIV RNA 及 HIV 前病毒 DNA 检测,HIV RNA 可从患者血浆或血清中直接提取,HIV 前病毒 DNA 则需从受感染的淋巴细胞中提取,提取的 HIV 前病毒 DNA 可直接用 PCR 扩增,而 HIV RNA 则需采用 RT-PCR 技术在反转录酶的作用下先反转录成互补的 cDNA,再进行 PCR 扩增,然后进行 PCR 产物分析。为提高检测的特异性,还可采用套式 PCR 技术。

2.3 NAT 在 HCV 检测中的应用

HCV RNA 检测可分为定性、定量检测。HCV 感染时血中病毒含量极低,可采用逆转录套式 PCR 进行定性检测,也可采用荧光 PCR 作定量检测。可用于 HCV RNA 检测的 NAT 方法较多,目前 WHO 合作研究小组正在建立 HCV RNA 国际化定量标准,可用于各种不同检测 HCV RNA 方法的标准化及进行评价。

2.4 NAT 在 HBV 检测中的应用

HBV 是 DNA 病毒,可从血清或血浆中提取 HBV DNA 作为模板,经 PCR 扩增后进行检测。由于 HBV 存在多种亚型和变异株,作 HBV DNA 检测其敏感性和特异性都存在问题,这也许是至今将 NAT 用于献血者 HBV 检测较用于 HCV、HIV 检测要少的原因之一。正在改进的措施包括寻求新的血浆样品处理方法使 HBV DNA 彻底释放出来,设计更好的引物使之能覆盖 HBV 多种亚型和变异株的全基因组以提高检测的敏感性,采用套式 PCR 技术以提高检测的特异性。

加强血液质量控制保障输血安全

长沙血液中心质控科

血液是生命的源泉，生命的保证，每个需要输血的伤病人员都希望能有安全有效的输血保障，在救治疾病的同时，如果再给病人染上一个目前不可治的病，那是让任何人都不能接受的。

如何才能避免此事的发生，唯一的办法，就是加强血液质量管理，严把血液质量关，确保输血安全，怎样做到输血安全，就本人的工作实践，认为应该做到以下几点：

一、加强全体工作人员的质量教育，是保证血液质量的基础。

为提高血液质量，强化质量管理，增加全体血液工作人员的质量意识，做好政治思想工作，抓好质量教育是血站工作的重要一环，实践证明，职工的事业心、责任感与血液质量的保障息息相关。因此，要想提高血液质量必须从思想教育入手，充分发挥思想政治工作的导向功能。把政治教育、职业道德教育和质量意识教育有机结合起来。采取各种方法和途径。坚持经常化制度化质量教育，使全体工作人员不断提高思想认识，真正树立“以质量求生存，以质量求信誉，以质量求效益，以质量求发展的意识和强烈的敬业爱岗精神，树立病人第一，质量第一的思想”，充分认识质量在血站建设中的重要性，没有质量，血站就无法生存，要使大家认识到输血事业关系到人民群众的生命安危，保证血液质量是党和人民交给我们的一项政治任务。在做好思想工作的同时，加强人才培养，提高人员的素质是血站质量建设的根本任务，根据各级各类人员的工作特点，按照部颁标准，制定实施细则让工作人员认真执行。

二、健全血液质量管理组织，是提高血液质量的保证

长沙血液中心

1、设立有血液质量管理委员会，由中心主任直接领导，由业务、质控科组织实施，其他各科室主任负责监督，科室质控员检查各个环节质量，专人定期收集各用血单位的意见，针对有关血液质量问题，提出改进措施。

2、设立有专职的质控科

质控科有专职人员三人，有承担其质控任务相适应的必要的先进的仪器设备，对血液及其他各种血液成份的制备过程及终末产品。进行质量监督，检查、发现问题提出改进意见并汇报中心主任及质量管理委员会。

三、加强血液质量检测是保证血液质量的核心。

保证血液质量的核心工作是对血液质量的检测，所以抓好检测工作便成了血站工作的重中之重。

1、严格试剂质量关

检测结果的准确与否与试剂质量至关重要，因此，必须按照规定采购由卫生部批准的定点厂家生产的有批准文号和“批批检”手续的试剂，并在有效期内使用。试测进

站后用国家临检中心提供的标准血清再次进行检定，合格后方可使用，否则坚决退货，绝不允许有丝毫的勉强，对试剂的出入库和使用情况要有严格的登记制度，以备后查。

2、认真做好检测工作（包括初检、复检）

必须按照部颁标准对血液各项进行检测，检测时工作人员精力高度集中，严格执行操作规程，复检时对少数结果可疑标本要进行三或四次检测，力争做到结果准确无误。

3、要有精密仪器保障

没有适应工作需要的精密仪器同样不能保证血液的质量，所以仪器设备的投入也是重点。

四、实行无偿献血制度是保证血液质量的关键

无偿献血工作开展得怎样，不仅代表一个地区的文明程度，更重要的是它还是能否减少或杜绝经血液传播疾病的关键工作，以前的个体卖血者均从经济利益出发，多次频繁重复献血，使血液质量得不到保证，而现在国家实行无偿献血，按照规定半年可献一次，血液质量大大改观。

血液质量控制的具体做法

一般的工作采用“三检三控”制的方式

1、自检自控、它是在工作过程中操作者按规范作业，一旦发生差错，就立即采取纠正措施，使工作符合质量规定要求。

工作者进入自我控制状态的标志是：

- A、能清楚地了解本职所做的工作；
- B、能清楚地了解本人所做的工作；
- C、能对工作差错采取有效的纠正措施；

2、互检互控，它是同一工作项目，同一工作过程，或上下工序的工作人员相互检查按规范作业的情况，发现质量差错检查者立即通知作业者纠正，使工作始终符合规范的要求，工作人员是否进入互控状态可以这样来衡量。

- A、是否明确控制对象；
- B、是否清楚控制时间、地点、内容和目标；
- C、是否正确运用控制方法和处理差错方法；

一般互控均需在完成本岗位工作的前提下进行，或由科主任或质检员或同时操作人员人员进行。

3、专检专控

是管理人员或专职检查人员运用各种管理手段，采取必要的措施，督导作业者按规范操作，发现差错立即予以纠正，使工作始终处于受控状态。

（一）采血的质量控制

A、硫酸铜的质控，韦氏比重计要求精确到 0.0005，血清距硫酸铜液面 1cm，100ml 硫酸铜不能多于 80 人份的检测。

献血员血色素现在采用目测比色板法。

B、采血质控

1、采血环境干净、整洁、宽敞、亮堂。

2、空气细菌检查 < 30 个菌落/9cm 直径平皿/5 分钟，无霉菌生长。

3、采血人员手指细菌检查，无致病菌生长；采血人员采血时不带戒指、手表、不留长指甲，不涂指甲油。

4、献血员手臂消毒，消毒范围 10×10cm；采血时一针见血，血流通畅，200ml/3 分钟，充分混匀，采血稀释混匀频率 20 次/分，采血量允许误差±10%。

(二) 全血及成份血的检测

标准：卫生部颁标准

(三) 原辅材料的检测

1、试剂

2、一次性使用塑料采血袋，盐水袋质量检查

A、外观、标签、保养液量

B、无菌试验，(改良马丁、硫乙醇酸盐培养基)

C、热源试验(鲎法)

(四)、仪器的检测

A、成份分离的检测，定期测试温度，时间、转速；

B、储血冰箱的检测、温度失控、报警装置、电源故障报警。

C、高压蒸汽灭菌质检

化学指示胶带，用于物品包装表面和包装中心监测；

生指标剂法(一季一次)利用对热耐受力较强的嗜热脂肪杆菌芽胞的死亡情况来判断是否成功。

D、净化台/室的检测

标 准			百级	万级	十万级
尘埃颗粒数(0.5u 直径)			≤3.5/L	≤350/L	≤3500/L
菌落数			≤1	≤3	≤10
噪音(分贝)			≤60	≤60	≤60
分数(米/秒)	垂直	0.3			
	水平	0.4			

总的说来，血液质量关系到人民群众的身体健康，保障血液质量是血站生存的基础。现在全国许多血站已通过 ISO9002 质量体系认证，现在已发展到 QMP 认证，我站在质量管理方面虽然做了一些工作，但还很不够。我们血站也在朝这个方向努力，并希望在近两年通过 QMP 认证，要做到这些，还需要经过艰苦的努力。只有做好这些，我们才能把输血事业办好。

免疫血液学检测技术与临床应用

长沙血液中心输血研究室 李 双

从 1900 年发现 ABO 血型至今，血液免疫学已得到了全面的发展，除红细胞血型各系统外，血小板系统、白细胞组织相容性抗原（HLA）系统的研究也日益深入，这些研究进展使各种相关免疫技术和方法进一步发展并应用于输血实践，显著减少输血反应，提高输血疗效，保证输血安全。

常用的免疫血液学试验：ABO 正反定型及亚型鉴定、Rh 血型鉴定及 Rh 阴性确认实验、抗球蛋白试验、抗体的筛选和鉴定、交叉配血试验。

一、不规则抗体新检测方法

（一）低离子聚凝胺技术

1、原理

Polybrene 技术首先利用低离子介质（LIM），降低介质的离子强度，减少了红细胞周围的阳离子云，从而促进带正电荷的 IgG 与带负电荷的红细胞发生反应，以促进红细胞和血清（血浆）中的抗体结合。

其后，加入聚凝胺（Polybrene）试剂。聚凝胺是一种高价阳离子季胺盐多聚物，溶解后能产生很多正电荷，可以中和红细胞膜表面的唾液酸带有的负电荷，使红细胞的 zeta 电位降低，红细胞之间距离减少，使红细胞发生凝聚。

最后，加入重新悬浮液（Resuspending）。重悬液（枸橼酸钠）有中和 Polybrene 的作用，使正常红细胞可逆性和非特异性凝集散开。如果是抗体致敏的红细胞被聚凝胺凝集，则凝集不可逆，为阳性结果。

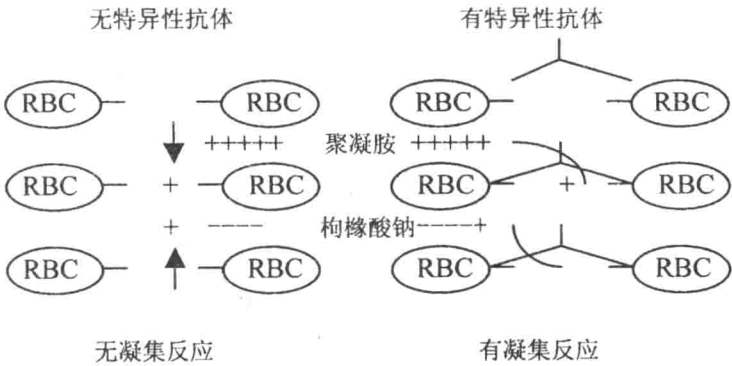


图 1 聚凝胺凝集红细胞原理

2、聚凝胺方法的特点

优点：快速、灵敏。Polybrene 方法对 Kell 系统抗体的敏感度低于抗人球蛋白方法，而在黄种人中 Kell 系统抗体非常罕见，因此该方法在我国推广应用能收到良好的效果。

缺点：易受冷抗体或某些异常蛋白的影响、结果受操作的影响较大。

3、临床应用

可用于交叉配血、血型鉴定、抗体筛选、鉴定及新生儿溶血病血型血清学试验。

(二) 微柱凝胶试验

1、原理

微柱凝胶试验是红细胞膜抗原与相应抗体在凝胶介质中发生的凝集反应。在微柱凝胶介质中，红细胞抗原与相应抗体结合，经低速离心，凝集的红细胞悬浮在凝胶中，而未和抗体结合的红细胞则沉于凝胶底部（管底尖部）。

2、凝胶柱的结构

反应室：可供加入抗体（试剂或血清）和红细胞，进行孵育反应。

试剂或盐水层（粘液）：当红细胞在离心作用下穿越该层时，红细胞与反应室中的血清分离并与该层液体中的试剂反应。在亲和柱（以结合蛋白 G 或蛋白 A 的载体为填充物）中有一层粘液，其作用与上述“试剂或盐水层”相同。

凝胶：分子筛作用。

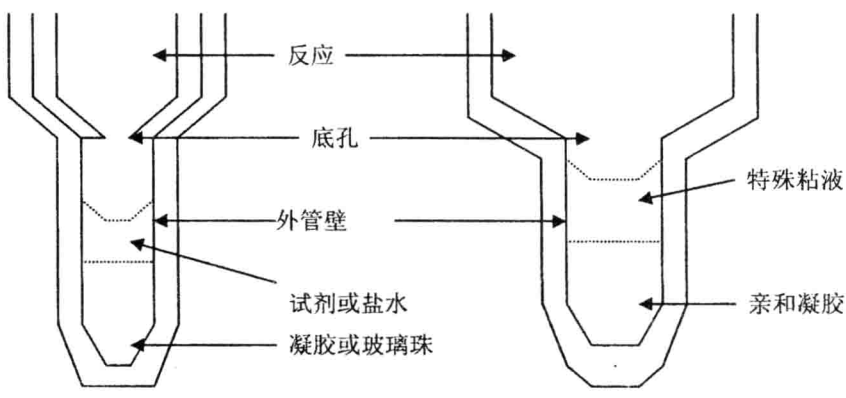


图 2 凝胶柱的结构

3、 现以凝胶微柱抗球蛋白试验介绍此项技术具体应用：

在凝胶试验中，血清与红细胞首先在反应室中反应，不接触柱中的抗球蛋白试剂，离心时，反应室中的红细胞和血清混合物穿过反应室底孔，与微柱中液体（含抗球蛋白试剂）汇合。由于该液体的比重被调节至红细胞与血清的比重之间，血清的比重低，因此不能在离心力的作用下继续向柱底运动。红细胞的比重略重，因此能继续向下脱离血清和液体层（试剂层），直达凝胶底部。在这一过程中，被 IgG 致敏的红细胞将与液体层中的抗球蛋白试剂反应，形成凝集，因凝胶分子筛作用而无法穿过凝胶层达到柱底，红细胞滞留在凝胶层的顶部即为阳性反应；未被 IgG 抗体致敏的红细胞将不会形成凝集。在离心力的作用下会直达柱底形成阴性反应。血清因停留在液体层的上部，因此不会中和液体层中的抗球蛋白试剂。柱的形状一般都很细或扁平状，柱内液体不易受离心力的旋转作用混合。

4、凝胶试验特性

(1) 操作技术要求较低，敏感和重复性好。其中能被人为改变的因素较少。

- (2) 不用洗涤红细胞就能进行抗球蛋白试验。
- (3) 反应体系微量，可减少血清、试剂、红细胞的用量。
- (4) 结果可保存。
- (5) 缺点：价格昂贵。

5、临床应用

可用于不完全抗体的血型抗体筛选鉴定及交叉配血、血型抗原检测。

二、添加剂和增效剂

(一) 低离子强度溶液 (LISS-low ionic strength saline) 或低离子强度介质 (LIM- low ionic strength medium)

1、 LISS (低离子强度溶液) 的原理

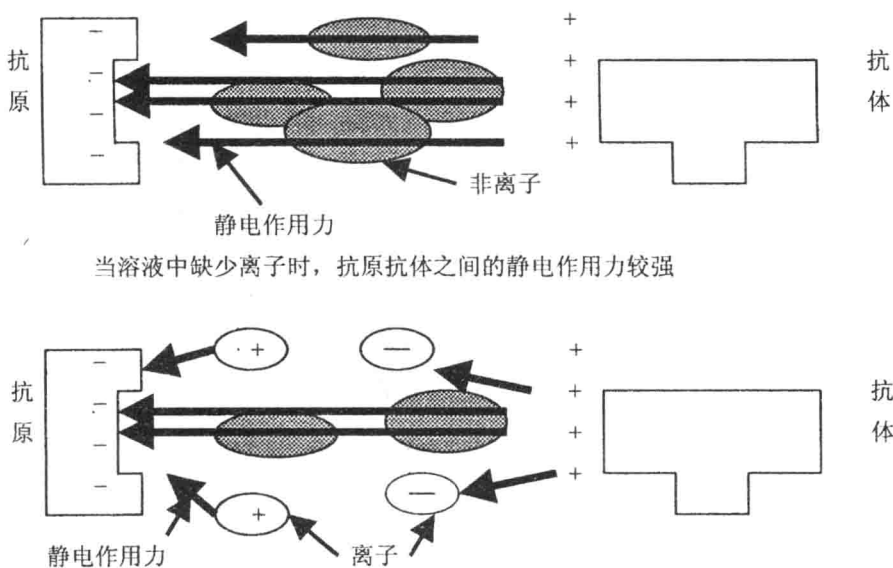


图3 低离子强度溶液的原理

2、特点：

- (1) 降低离子强度可显著加快抗原抗体结合。
- (2) 应用面广，可用于几乎所有不规则抗体检测方法。

3、应用限制：

- (1) 必须根据血清与血球混合液的多少，按比例加入才能获得预期的效果。
- (2) 当 LISS 或 LIM 与血球血清混合后最终离子强度低于 0.03MNaCl 的水平，则会造成球蛋白非特异性的致敏，甚至造成红细胞自身凝集。
- (3) 红细胞一般不宜在低离子强度溶液中保存。

4、LISS (LIM) 的成分

LISS (LIM) 为等渗溶液，渗透压主要由非电解质或弱电解质物质提供 (糖类、氨基酸类、大分子类)，螯合剂 (如 EDTA 等)，少量电解质 (如：NaCL、磷酸盐缓冲等)，

防腐剂（如：NaN₃, 硫柳汞，抗生素等）。

5、使用方法

(1) 作为添加剂。

(2) 作为红细胞悬液。

(二) Coomb's 试验增效剂

PEG（聚乙二醇）

(1) 原理：PEG 是一种水溶性的中性多聚体，可结合水分子，排除红细胞和抗体周围的水份，相对增加抗体的浓度，从而增强抗体检测的敏感性。

(2) 试剂成分：20%PEG（3500）的 LISS 溶液。

(3) 特点：PEG 是间接抗球蛋白方法（IAT）的增效剂，敏感性大幅度提高，特异性好。

(4) 应用限制：在高蛋白血样中使用会出现蛋白质沉淀。加 PEG37℃孵育后立即离心可能有假阳性出现，只能结合抗球蛋白方法使用。

(5) 使用方法：

2 滴血清+1 滴红细胞盐水悬液+4 滴 PEG,

37℃孵育 15 分钟，盐水洗涤三次，加抗球蛋白试剂。

三、吸收放散试验

抗体与相应抗原在适合条件下发生凝集或致敏，如改变某些物理条件时，抗体又可以从结合的红细胞上解脱下来，这种试验方法叫做吸收放散试验。

(一) 应用范围

- 1、除去血清中不需要的抗体；
- 2、分离鉴定混合抗体；
- 3、浓缩低效价抗体；
- 4、鉴定存在于红细胞上的弱抗原；
- 5、核实抗体特异性；
- 6、鉴定引起新生儿溶血病和免疫性输血反应的抗体；
- 7、研究免疫性溶血性贫血的抗体

(二) 吸收试验方法：4℃吸收、37℃吸收

(三) 放散试验方法：热放散法、乙醚放散法、磷酸氯喹法

红细胞放散试验根据目的的不同可分为两类：为得到放散液的放散和为得到去除表面抗体的红细胞的放散。传统的放散试验有乙醚放散、热放散等，前者可得到含有血型抗体的放散液，后者可得到完整的红细胞，但只限于红细胞表面抗体致敏量较少的情况。

四、抑制血凝试验

(一) 基本原理

某些血型抗原以可溶解（或非溶解性物质的形式）存在于血清、血浆、唾液等体液

(或发、骨、皮等组织)中,例如:ABH、Lewis、I 物质等。这些血型物质可以中和相应的抗体。用红细胞检测抗体被吸收的情况可以显示相应血型物质的存在。

(二)抑制血凝试验中抑制物的处理:可用煮沸 10 分钟的方法除去体液或组织中的蛋白酶,血型物质不会被破坏。

(三)抑制血凝试验中抗体的标化:抗体需通过倍比稀释,找出可凝集红细胞至 3+ 的稀释度,并按该稀释度进行稀释。这一稀释度即可保证明确显示抗体是否被中和(而 4+ 的凝集可以对应于不同效价的抗体,因此不能显示抗体量的变化),又能最大限度地显示从完全中和至完全不能中和的过程。

(四)利用毛发等组织做抑制中和试验:由于毛发以及许多其它组织上含有血型物质,因此可利用它们做抑制中和试验以鉴定 ABO、MN 血型,此方法常见于司法鉴定及考古鉴定。人体体液中的血型物质仅见于分泌型个体,而人体的血管内皮细胞、消化道组织切片均含有 ABH 物质,与分泌状态无关。在许多组织中有残存红细胞同样可以利用吸收放散方法测定血型。

血小板血型及其检测方法

一、血小板上的同种异体抗原

血小板表面具有复杂的血型抗原,这些抗原是由遗传决定的,通常同种异体抗原分为两类:

(一)血小板和其它细胞共有的抗原

1、ABO 系统血型抗原

目前已经证明,血小板表面存在 ABO, Lewis, I, i, P 抗原,但是通过双相放射性免疫测定证明血小板上缺失 Rh, Duffy, Kell, Kidd, Lutheran 系统的抗原。

2、HLA 系统血型抗原

已经证明,血小板上存在 HLA-A、HLA-B 座位上的抗原,是否存在 HLA-C 座位的抗原,尚有争议。血小板上未发现有 HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ 等座位的抗原,人们通常认为,血小板上的 HLA 抗原有一部份是血小板固有的,而其余部份均是血浆中可溶性的 HLA 抗原吸附到血小板上的。

(二)血小板特异性抗原

血小板特异性抗原是通过相应抗体的检出而发现的,具有独特的型特异性,并构成血小板膜结构中的一部份。血小板特异性同种抗原的国际命名为了避免新旧血小板抗原名称混淆,1990 年国际血液学标准化委员会、国际输血协会(ICSH/ISBT)血小板血清学研讨会讨论了血小板抗原系统国际命名方法,在系统前冠以 HPA,即人类血小板抗原的英文缩写。至今被国际输血协会组织确认的血小板特异性抗原已有 5 个血型系统 10 个抗原,正式命名为 HPA1~HPA5,见表 1

表 1 血小板特异性抗原

糖蛋白			抗原频率				
抗原系统	(GP) 定位	以往命名	抗原	以往抗原名	DNA 多态性	白人	日本人
HPA-1	GPIIIa	Zw, PI	HPA-1a	Zw ^a , PLA ¹	T ₁₉₆ C	97.7	99.9
			HPA-1b	Zw ^b , PLA ²		26.5	3.7
HPA-2	GP I b	Ko, SiB	HPA-2a	Ko ^b	C ₅₂₄ T	99.3	n. t.
			HPA-2b	Ko ^a , Sib ^a		14.6	25.4
HPA-3	GP II b	Bak, Lek	HPA-3a	Bak ^a , Lek ^a	T ₂₆₂₂ G	87.7	25.4
			HPA-3b	Bak ^b		64.1	78.9
HPA-4	GPIIIa	Pen, Yuk	HPA-4a	Pen ^a , Yuk ^b	G ₅₂₆ A	99.9	99.9
			HPA-4b	Pen ^b , Yuk ^a		0.2	1.7
HPA-5	GP I a	Br, He	HPA-5a	Br ^b , Zav ^b	G ₁₆₄₈ A	99.2	n. t.
		Zav	HPA-5b	Br ^a , Zav ^a , He ^a		20.6	n. t.

二、血小板血型的临床意义

(一) 血小板输血治疗无效和输血后紫癜

1. 血小板输注无效性 (Platelet transfusion refractoriness, PTR)

1. 1 同种异体免疫因素 由于反复输注血小板，患者血清中可产生血小板的同种抗体，产生抗体的频率主要取决于输注的次数。大约有 1/3 的患者是由免疫因素引起的，主要是 HLA 的免疫作用。

1. 2 非免疫因素 患者有发热、败血症、脾肿大、弥漫性血管内凝血等情况时，也可导致发生血小板输注后计数不增高的无效状态。

2. 输血后紫癜 (Posttransfusion purpura, PTP)

绝大多数的患者是女性，有输血或妊娠史。欧美国家血小板输注无效大多数是由于 HPA-1a 抗体引起。我国与日本人相似，HPA-1a 抗原频率 > 99.99%，至今尚未发现 HPA-1a 抗原阴性者，因此 HPA-1a 抗原对黄种人临床意义不大。据报导日本人中 HPA-2b 抗原频率约为 26%，是引起血小板输注无效发生的主要原因之一。为了预防和减少输血小板治疗无效和输血后紫癜的发生，应积极提倡用血小板配型，为患者选择合适的血小板供体。

(二) 新生儿同种免疫性血小板减少症 (NAITP)

新生儿同种免疫性血小板减少症 (NAITP) 是由于胎儿和母亲的血小板血型不合，使母亲产生同种抗体。这种同种抗体能通过胎盘进入胎儿体内，与血小板反应而导致胎儿和新生儿的血小板减少症。

新生儿免疫性血小板减少症，大多由于血小板特异性抗原 HPA-1a (PLA¹) 引起，这在白种人群中是非常突出的。由于 HPA-1a 在中国人群中属高频率，尚未发现 HPA-1a 阴性，因此推断 NAITP 在中国人群中的发病抗原可能与白种人不同。日本人报道 NAITP 主要由 HPA-3a、HPA-4a 等抗原造成，而不是 HPA-1a 抗原。新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜，主要通过血小板抗原的鉴定和血小板抗体的检查来进行实验室诊断，由于该病的死亡率极高，因此及时诊断和治疗很重要。