

现代临床检验技术

主编 殷立奎 刘建华 刘彩欣



现代临床检验技术

主 编 殷立奎 刘建华 刘彩欣
副主编 王 璐 苏广龙 张晓进

 江西科学技术出版社

江西·南昌

图书在版编目(CIP)数据

现代临床检验技术 / 殷立奎, 刘建华, 刘彩欣主编. — 南昌 : 江西科学技术出版社, 2018. 8

ISBN 978 - 7 - 5390 - 6507 - 6

I. ①现… II. ①殷… ②刘… ③刘… III. ①临床医学 - 医学检验 IV. ①R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 194777 号

国际互联网(Internet)地址:

http://www.jxkjcs.com

选题序号: **ZK2018372**

图书代码: **B18149 - 101**

现代临床检验技术

殷立奎 刘建华 刘彩欣 主编

出版 江西科学技术出版社
发行
社址 南昌市蓼洲街2号附1号
邮编: 330009 电话: (0791) 86623491 86639342(传真)
印刷 江西新华印刷集团有限公司
经销 全国各地新华书店
开本 787mm × 1092mm 1/16
字数 274 千字
印张 11.25
版次 2018 年 8 月第 1 版 2018 年 8 月第 1 次印刷
书号 ISBN 978 - 7 - 5390 - 6507 - 6
定价 88.00 元

赣版权登字 - 03 - 2018 - 314

版权所有, 侵权必究

(赣科版图书凡属印装错误, 可向承印厂调换)

前 言

医学检验是运用现代物理化学方法、手段进行医学诊断的一门学科,主要研究如何通过实验室技术、医疗仪器设备为临床诊断、治疗提供依据。伴随着现代科学技术的发展迅速,一大批新技术、新设备、新方法逐渐被引入到临床实验室,增加了更多更准确的检验项目及方法,将其应用于临床当中,并将现有方法进行完善提高,促进了临床实验室诊断的准确性和高质量,同时也实现了临床检验工作的标准化、规范化、准确化程度。

作为检验科的医务人员,在掌握基础医学、临床医学、医学检验、实验诊断等方面的基本理论知识和实验操作能力的基础之上,还需不断学习,吸取最先进的技术与理念,并合理地运用于临床。为了更好地了解医学检验技术的发展,并且更好地将其应用于临床,提高临床诊断率,本编委会组织了在临床检验医学方面具有丰富经验的医务人员认真编写了此书。

本书共分为三章,包括:临床输血检验技术、血液学检验、体液、内分泌及排泄物检验。

为了进一步提高临床检验人员的水平,本编委会人员在多年临床检验的经验基础上,参考诸多书籍资料,认真编写了此书,望谨以此书为广大临床检验人员提供微薄帮助。

本书在编写过程中,借鉴了诸多医学检验相关临床书籍与资料文献,在此表示衷心的感谢。由于本编委会人员均身负繁重的临床检验工作,故编写时间仓促,难免有错误及不足之处,恳请广大读者见谅,并给予批评指正,以更好地总结经验,以起到共同进步、提高临床医学检验与诊断水平的目的。

《现代临床检验技术》编委会

2018年8月

目录

CONTENTS

第一章 临床输血检验技术	1
第一节 红细胞血型检测	1
第二节 白细胞抗原系统检测	21
第三节 血小板血型检测技术	34
第四节 血液及血液成分的制备和保存	40
第二章 血液学检验	62
第一节 血液一般检验	62
第二节 网织红细胞计数	78
第三节 红细胞沉降率测定	80
第四节 骨髓细胞形态学检验	81
第五节 血栓与止血一般检验	99
第六节 铁代谢异常性贫血的检验	109
第七节 巨幼细胞性贫血的检验	117
第八节 造血功能障碍性贫血的检验	122
第九节 白细胞异常性疾病的检验	123
第三章 体液、内分泌及排泄物检验	135
第一节 唾液检验	135

现代临床检验技术

第二节	胃液检验	136
第三节	浆膜腔液检验	139
第四节	生殖系统液体检验	147
第五节	脑脊液检验	167
参考文献		172

第一章 临床输血检验技术

第一节 红细胞血型检测

输血治疗是临床上非常重要的一项治疗手段,特别是对大量出血和严重贫血患者,输血是一种不可替代的治疗方法。输血同其他临床治疗一样,除了需要达到预期的治疗效果外,必须确保输血安全。血液输注应遵循同型或配合性原则,不配合性血液输注可导致急性溶血性输血反应,严重时危及患者生命。

一、输血前免疫血液学检查

(一)标本采集与要求

用于输血前检查的血液标本通常使用静脉血,必须有受血者或献血者信息的唯一性标识,标记不清的血液标本不能用于试验。进行血型鉴定和交叉配血试验时最好采用乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)抗凝血,血液离心后成无溶血及明显乳糜。用于交叉配血的受血者标本应为 72h 内的血标本,以反映其当前的免疫状态。

(二)ABO 血型 and RhD 血型鉴定

人类血型系统纷繁复杂,血型不合所导致的同种免疫反应,轻则使输血无效,重则导致患者死亡。ABO 血型系统是第一个被发现的血型系统,其抗原性最强,Rh 血型系统 D 抗原性次之。当受血者接受了所缺少的 A/B 抗原后,几乎均产生特异性同种免疫反应;大约 2/3 的 D 抗原阴性者,接受了 D 抗原阳性血液后产生抗-D。因此受血者除了做 ABO 血型鉴定外,还应该做 RhD 血型鉴定,以选择合适血型的供血者血液。

1. ABO 血型鉴定及影响因素

(1)原理:根据红细胞上有无 A 抗原和(或)B 抗原,血清中存在针对缺失抗原的天然抗体,将血型分为 A、B、O 及 AB 型 4 种。A 型人红细胞上具有 A 抗原,血清中含有抗-B;B 型人红细胞上具有 B 抗原,血清中含有抗-A;O 型人红细胞上无 A、B 抗原,血清中同时含有抗-A、抗-B 和抗-A,B;AB 型人红细胞上同时存在 A、B 抗原,血清中不含抗-A 和抗-B。

ABO 血型鉴定主要是利用抗原与抗体特异性结合的凝集反应来完成,包括正定型和反定型。用抗-A、抗-B 血型定型试剂与被检细胞反应,检测红细胞表面是否存在 A 抗原和(或)B 抗原,称之为正定型;用标准 A₁ 细胞及 B 细胞与被检血清反应,检测血清中是否存在



抗-A/抗-B(凝集素),称之为反定型。在检测受血者或献血者的 ABO 血型时,常规试验操作是同时进行红细胞表面抗原和血清(浆)中抗体测定。只有正反定型相符,ABO 血型鉴定的结果才可靠。

(2)抗-A、抗-B 和抗-A,B 血型定型试剂标准:应符合下述条件:①特异性:只与相应红细胞抗原发生凝集反应,无非特异性凝集。②效价:抗-A 和抗-B 血清效价均在 128 以上。③亲和力:抗-A 标准血清与 A₁、A₂ 及 A₂B 红细胞发生反应开始出现凝集的时间分别是 15s、30s 和 45s,抗-B 标准血清与 B 型红细胞开始出现凝集的时间为 15s,凝集强度为 3min 时凝块不小于 1mm²。④冷凝集效价在 4 以下。⑤无菌。⑥灭活补体。

(3)ABO 血型鉴定方法:ABO 血型系统抗体多为 IgM 类,室温下在盐水介质中即可出现明显的凝集反应,临床检测中常用的方法主要有玻片法、试管法、微柱凝胶法及基因检测技术等。玻片法操作简单,但无离心的促凝过程,易造成弱凝集的漏检。试管法通过离心可增强凝集反应的效果,不易漏检弱凝集。微柱凝胶法是红细胞抗原与相应抗体在凝胶介质中发生凝集反应的免疫学方法,离心后可直接用肉眼观察结果或使用专用血型仪自动分析结果。该方法操作标准化,定量加样,结果清晰、准确、易于判断,是目前临床经常使用的方法之一。利用分子生物学技术检测 ABO 血型基因是血型研究中常用的方法之一,但对人员、设备及操作的要求较高,目前不作为临床常规检测方法。

ABO 血型鉴定时,正反定型结果应一致,不一致时需以辅助实验确定 ABO 血型。出生 6 个月之内的婴儿由于血液中无 ABO 抗体或抗体很弱,一般只进行正定型。新生儿血清中可能存在来自母体的抗体,应注意鉴别。

(4)ABO 正反定型的临床应用及意义:血型鉴定是实施输血治疗的首要步骤,交叉配血前必须检测受血者和供血者的血型。ABO 正反定型还应用于组织器官移植和新生儿溶血病的相关血型血清学检测。

ABO 血型鉴定时需要进行反定型,其意义在于:能够复检正定型结果的准确性,纠正漏检、误报;可以发现亚型,能够排除获得性抗原(如类 B 抗原)和冷凝集现象对红细胞正定型的干扰;可以发现一些 ABO 亚型中的意外抗体。

(5)ABO 正反定型不符的处理原则:ABO 血型鉴定出现正反定型不符时,应首先重复试验,排除人为差错。如果重复试验仍然正反定型不符,则继续下列操作:重新采集血液标本,避免标本采集错误或污染引起的差错;询问受检者的诊断、既往病史、输血史、骨髓移植史及用药史等;应用新开启的生理盐水洗涤标本红细胞或试剂红细胞后进行试验;应用抗-A、B、抗-A₁或抗-H 标准血清检测红细胞;根据筛选红细胞检测结果,确定是否有同种抗体或冷自身抗体干扰。

(6)ABO 亚型鉴定:ABO 亚型也称变异型,该类型红细胞上 A 或 B 抗原呈弱抗原性,正反定型不符合 ABO 血型系统特点。常见的 A 亚型有 A₂、A₃、A_x、A_m、A_{end}、A_y、A_{el}等,B 亚型有 B₃、B_x、B_m、B_{el}等,AB 亚型有 A₂B、A₃B、A_xB、AB₃、cisAB 等。ABO 亚型的鉴定常用的试剂有抗-A、抗-A₁、抗-B、抗-H、抗-A,B 血清,A₁、A₂、B 型和 O 型红细胞。其特点为:

①ABO 亚型大多 H 抗原的抗原性增强,H 抗原强弱的次序为:O>A₂>B>A₂B>A₁>A₁B。

② A_3 、 A_m 抗原与抗-A及抗-A,B的反应强度基本相似, A_x 抗原与抗-A,B的反应强度明显高于抗-A。

③ A_2 、 A_3 、 A_x 人体内偶可出现不规则抗-A(抗- A_1), A_m 则没有抗- A_1 。

④ A_3 、 A_m 分泌型人的唾液内可检出A及H物质,分泌型 A_x 人体内只可检出H物质。

⑤ A_3 型鉴定时在肉眼和光镜下观察可见混合视野凝集。

2. RhD血型鉴定及影响因素

(1)原理:Rh血型系统是人类最为复杂的一个红细胞血型系统,在临床输血实践中其重要意义仅次于ABO血型系统。目前已发现的Rh血型系统抗原约有50余种,涉及临床的主要有C、c、D、E、e五个抗原,其中D抗原的免疫原性最强,是引起临床输血不良反应的主要因素。因此,在临床输血中,常规需要做D抗原鉴定,当受检者红细胞上存在D抗原时,与抗-D血清产生特异性的抗原抗体反应,出现红细胞凝集为RhD阳性,不凝集者为RhD阴性。

(2)RhD血型鉴定方法

①RhD血型鉴定方法:临床常用的方法有玻片法、试管法、微量板法、微柱凝胶法等。目前大多数医院都使用微柱凝胶法,该方法简便快捷、准确度高。

②RhD阴性确认试验:在进行RhD血型鉴定时,IgM抗-D检测为阴性时需进一步确认,即采用IgG抗-D试剂进行间接抗人球蛋白试验。如果抗人球蛋白结果为阴性,即可判断该个体为RhD阴性;如果抗人球蛋白结果为阳性,那么该个体为弱D表型。

(3)RhD血型鉴定的临床应用及意义

①RhD血型与临床输血的关系:正常人体内一般不存在Rh血型系统天然抗体,第一次输血时往往不会发现Rh血型不合。RhD阴性受血者输注了RhD阳性血液后,可产生免疫性的抗-D,当患者再次输注RhD阳性血液时,会发生溶血性输血反应,严重者可危及生命。

②与妊娠及新生儿溶血病的关系:RhD阴性妇女如孕育RhD阳性的胎儿,胎儿红细胞可通过胎盘进入母体,刺激母体产生抗-D。再次妊娠时该抗体可通过胎盘进入胎儿血液循环,破坏胎儿RhD阳性红细胞,造成新生儿溶血。

③弱D人群供血和受血的原则:作为供血者按照RhD阳性对待,其血液只能给RhD阳性受血者;作为受血者按照RhD阴性对待,只能接受RhD阴性血液。

(三)抗体筛查和鉴定

受血者有输血史、妊娠史或短期内需要大量输血时应按相关规定进行意外抗体的筛查和鉴定,以便及时发现有临床意义的意外抗体,从而避免输血反应的发生。

1. 概念 红细胞血型抗体分为规则抗体和不规则抗体。不规则抗体也称为意外抗体;规则抗体指ABO血型抗体,其产生符合Landsteiner法则,即红细胞表面有A或B抗原,血清中就会存在相应的抗-B或抗-A;意外抗体是指不符合ABO血型系统Landsteiner法则的血型抗体,即抗-A、抗-B之外的血型抗体,但部分ABO亚型出现的抗- A_1 等抗体,也称为意外抗体。它包括同种抗体和自身抗体,同种抗体是可与具有相应抗原的同种异基因红细胞发生凝集反应;自身抗体是指受血者免疫系统针对自身红细胞抗原产生的抗体,这类抗体不仅与自身红细胞凝集,也与多数异体红细胞发生凝集反应。

2. 意外抗体筛查方法 输血前对受血者血清/血浆进行抗体筛查,以发现具有临床意义



的意外抗体。意外抗体可以是 IgM 类,也可以是 IgG 类。IgG 类抗体主要是经输血或妊娠等免疫刺激产生,在盐水介质中不能凝集而只能致敏表达相应抗原的红细胞,必须通过特殊介质才能使致敏红细胞出现凝集反应。因此意外抗体检测的方法必须包括盐水介质法和特殊介质检测法:如白蛋白介质法、低离子强度介质法、酶技术、抗人球蛋白试验、聚凝胺促凝技术和微柱凝胶试验等。除盐水介质法以外,其他方法可按抗体的血清学特性和实验的具体条件选择其中一种。

(1)盐水介质法:主要用于 IgM 类抗体筛查,该方法操作简单、成本低廉,但其灵敏度低,不易检测到弱凝集。

(2)聚凝胺法:是一种非特异性促凝手段,在使用时应注意以下几点:

①聚凝胺试验阳性时,应设抗人球蛋白试验对照。

②多特异型抗球蛋白抗原阳性会引起聚凝胺试验假阳性。

③聚凝胺会增强温自身抗体反应,可用盐水试验或间接抗人球蛋白试验做对照。

(3)抗人球蛋白试验:此法通过抗人球蛋白的桥联作用,能够使抗体致敏的红细胞发生凝集反应。抗人球蛋白试剂含有抗-IgG 和抗-C3d。一些意外抗体,如 Kidd 系统血型特异性抗体能够激活补体,抗-C3d 能与之结合。由于传统的抗人球蛋白试验操作繁琐、耗时长,且所需器材试剂复杂,很难在常规工作中普及。

(4)酶介质法:蛋白水解酶能使红细胞表面某些隐蔽抗原暴露,增强其对某些抗体的检出率。但不足是对一些抗原起破坏作用,如 M、N、S、Fy^a、Fy^b 等,影响对这些抗体的检出。此法目前在临床已不常使用。

(5)微柱凝胶法:该方法是凝胶层析分子排阻技术和免疫学抗原抗体特异性反应技术相结合的产物,通过调节凝胶的浓度来控制凝胶间隙的大小,其间隙只允许游离红细胞通过,从而使游离红细胞与凝集红细胞分离。该方法具有敏感性高、特异性强、结果准确、易于观察和影响因素少等特点,是目前临床最常用的抗体筛查方法之一。

(6)意外抗体筛查注意事项

①抗体筛查结果全部阳性时,应进行“自身对照”,排除自身抗体干扰。

②抗体筛查可以在交叉配血试验之前或与交叉配血试验同时进行,以便尽早发现具有临床意义的抗体,避免输血反应的发生。

③抗体筛查试验结果阴性并不意味着血液中无意外抗体。某些抗体有剂量效应,因实验条件和所用谱细胞不足而造成漏检。

3. 抗体鉴定 抗体筛查试验结果阳性,应做抗体鉴定试验,以确定其特异性。

(1)自身细胞检查:观察受血者血清与受血者自身细胞的反应情况,确定血清内是否有自身抗体或自身抗体和同种抗体两者同时存在。

(2)谱细胞:抗体鉴定中使用的谱细胞在试验中占有十分重要的位置。谱细胞是通过严格筛选确定,已知血型表现型的 8~12 人份 O 型红细胞,对这些细胞的要求比抗体筛选细胞更严格。谱细胞的功能必须具备能够检出常见抗体(如抗-D、抗-Jk^a、抗-E 等)及某些罕见抗体,所以不仅要求涵盖常见且具有临床意义的抗原,还要保证这些抗原在一组谱细胞的分布特点,以便在检测相应抗体时会出现不同的反应格局。另外,为了能从统计学上保证对

抗体特异性的确认,每一种血型抗原最好在谱细胞上保持一定的阴性和阳性比例,使血清学检查的结果表现出客观规律性,而不是偶然的结果。一般用 Fisher 的正确估计概率的方法来计算各种阴性和阳性结合的可能性,1/20 的 P(可能性)值被认为是统计学上有效的、可以接受的值。

与谱细胞反应有明确结果,并且从反应格局可确定为单一抗体或无法确定为单一抗体时,可用排除法限定抗体特异性范围,并用吸收放散方法分离各种特异性抗体。当使用吸收放散法不能将抗体分离时,可考虑是联合抗体或类特异性抗体。

4. 抗体筛查和鉴定的影响因素

(1)抗体筛查和鉴定细胞的质量:用于抗体筛查的试剂红细胞称筛查细胞。筛查细胞大多不包括低频率抗原,不能检出低频率抗原抗体。用于抗体鉴定的试剂红细胞称谱细胞,能鉴定大多数单一抗体和多种混合抗体,能区分复合抗体和混合抗体。细胞储存时,某些抗原变性,不能保证所有抗原阳性的细胞都与含有相应抗体的被检血清反应。由于人种的差异,对输血产生影响的意外抗体也有所不同,临床上很难找到完全覆盖所有抗原的筛查/鉴定细胞。因此在选择意外抗体筛查/鉴定细胞时,应符合本地区意外抗体分布的特点。

(2)实验方法:凝集试验的反应条件、检测凝集的方法、增强剂(低离子介质、白蛋白、聚乙二醇)的使用,都会影响到凝集反应的强度。

IgM 抗体在 4℃时凝集强度明显大于室温,37℃会有减弱。抗人球蛋白试验的敏感性大于聚凝胺试验,酶技术对 Rh, Kidd 血型系统的检出效果最好,但对某些抗原的破坏性比较大,如 M、N、S、Fy^a、Fy^b等,要考虑到可能造成的漏检。

(3)抗体的特异性

①抗体筛查试验为阴性,并不意味着被检血清中一定没有意外抗体,要结合临床资料进行分析,防止低亲和力和低效价抗体的漏检。如怀疑为弱抗体引起的溶血性输血反应或新生儿溶血病时,需增加血清与红细胞的比例重复进行试验。

②筛查细胞漏检 ABO 亚型抗体(如抗-A₁),若被检血清中存在抗-A₁,可以通过正反定型不符提示。

③有些抗体(如抗-Le^a、抗-Jk^a)在盐水介质中可溶解抗原不配合的红细胞,出现溶血现象。

④应在标本采集 48h 内完成试验,放置时间过久,可能造成抗体减弱导致漏检。对补体依赖性抗体的检测不适于用血浆标本。

(四)交叉配血试验

1. 原理 除非极为紧急的情况,输血前患者(受血者)必须与献血者(供血者)进行交叉配血,即血液配合性试验。其目的主要是检查受血者血清中是否有破坏供血者红细胞的抗体,保证受血者与供血者的血液间无可检出的不相配合的抗原、抗体成分。

完整的交叉配血试验包括:(1)复查受血者 ABO、RhD 血型。(2)查阅受血者既往血型记录,如与复查结果不符,立即分析原因。(3)复查献血者血型。(4)作交叉配血试验。

2. 方法

(1)主侧交叉配血:受血者血清(浆)与供者红细胞反应,检测受血者体内是否存在针对供



者红细胞的抗体。

(2)次侧交叉配血:受血者红细胞与供者血清(浆)反应,检测供者血液中是否存在针对受血者红细胞的抗体。

(3)自身对照:受血者红细胞与自身血清(浆)反应,以排除自身抗体、直接抗人球蛋白试验阳性及红细胞缗钱状假凝集等干扰试验结果的因素。

用于交叉配血的受血者血液标本应该是抽取后不超过 3d 的血标本,且试验前最好用生理盐水洗涤红细胞,以去除血清(浆)中的影响因素。此外,交叉配血反应体系均应在 37℃ 孵育,以去除冷凝集素的影响。除了使用盐水介质法外,还应使用能检出意外抗体的方法,例如:抗人球蛋白试验、酶技术、聚凝胺法、低离子强度介质或其他合适的方法。

3. 结果判读

(1)抗体筛查阴性,交叉配血相容:即试验结果均为阴性,可以发放血液。

(2)抗体筛查阴性,主侧交叉配血不相容:多考虑受血者或供血者的血型定型不正确,应复检血型,必要时需做 ABO 亚型鉴定;受血者血清中含有同种抗体,但筛选红细胞上无此抗原存在。

(3)抗体筛查阳性,交叉配血不相容

①自身对照阴性:受血者体内含有同种抗体,可进一步做抗体鉴定,同时对供血者血液做抗原鉴定,选择相应抗原阴性的血液重做交叉配血试验;如果抗体特异性无法确定,应选择交叉配血试验阴性的血液发出。

②自身对照阳性:受血者血清中可能含有自身抗体或同时存在意外抗体。

4. 影响因素

(1)缗钱状形成:被检血清在室温和 37℃,使红细胞出现了缗钱状假凝集,造成配血结果误判。常见于巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、霍奇金病及其他表现为血沉加速的疾病。

(2)出现抗体筛查试验阴性和交叉配血结果阳性的现象,提示受血者血清中可能存在未检明的抗体。

(3)直接抗人球蛋白试验阳性,显示受血者或供血者血清中存在自身抗体。

(4)在被检血清中如含有溶血性抗体,则具有相应抗原的红细胞被溶解而不是凝集,此种情况下交叉配血结果应为阳性。如果血清中存在补体而导致溶血反应,血清应灭活后再做试验。

(5)红细胞不正确的洗涤和悬浮,使抗人球蛋白试验出现假阴性。

输血前检查试验是一项具有高度科学性和责任性的工作,输血科人员需要熟练掌握并灵活应用血型血清学试验的原理和技术,对于试验结果能够全面、细致地观察和分析,准确出具报告,才能使输血前检查工作成为受血者安全输血治疗的保障。

二、盐水介质试验技术

(一)原理

在盐水介质中,IgM 类天然抗体分子链较长可直接与含有相应抗原的红细胞结合,并呈现肉眼可见的凝集,但 IgG 类抗体则不具备这一特点。所以盐水介质试验仅能检出 IgM 类

抗体,而无法检出 IgG 类抗体。

盐水介质试验常用于血型鉴定、血清中 IgM 类抗体的筛查和鉴定、盐水介质交叉配血等。该方法操作简洁快速,可在很短时间内对供、受者间血液是否相容得出初步结论,可为紧急抢救患者及时提供血液。

(二)方法

根据试验载体不同,主要有 3 种方法:即平板法、试管法、微孔板法。

1. 平板法 多应用于常规 ABO 血型和 RhD 抗原定型。此方法易于掌握,操作简便、快速,但工作环境和工作人员易被污染。如果未采用一次性耗材,清洗不彻底,会出现假阳性或假阴性结果。

2. 试管法 为定性方法,也可用于半定量试验,如测定抗体效价。试管法是输血前检查最常用的方法。可以根据试验设计加入不同的试剂量或被检标本量;也可根据温度设置,将试管放在不同的温度环境中进行抗原抗体反应;也可将试验过程中的标本进行洗涤操作等。其特点是操作简便、快速,方法易于掌握,结果准确、可靠。

3. 微孔板法 为定性方法。加样与观察结果参考试管法。

(三)结果判读

1. 阳性结果 红细胞出现凝集反应或溶血是阳性结果。

2. 阴性结果 红细胞呈游离的混悬状态是阴性结果。

3. 溶血 为阳性结果,与血液凝集具有同样重要的临床意义。有些血型抗体与红细胞表面相应抗原反应后,能够激活补体,引起红细胞溶解。具有这种性质的抗体称为溶血素。当补体不存在时,这些抗体往往凝集或致敏具有特异性抗原的红细胞。血型抗体中具有溶血作用的有抗-A、抗-B、抗-A,B、抗-1、抗-i 等。

4. 凝集强度判定 见表 1-1。

表 1-1 凝集反应判定标准

反应强度	现象
++++	一个大凝集块,背景清晰,无游离红细胞
+++	数个较大凝集块,背景清晰,几乎无游离红细胞
++	凝集块较小,背景稍浑浊,游离红细胞较少
+	细小凝集块,背景浑浊,游离红细胞较多
±(weak+)	肉眼观察呈“粗颗粒”样,镜下可见细小凝集团
-	肉眼及光镜下红细胞呈游离状态,无凝集

(四)注意事项

1. 观察结果后应立即做好试验记录。

2. 如果做 ABO 血型鉴定,试验温度不要高于室温;如做交叉配血试验时,应注意室温控制在(22±2)℃以上,防止冷抗体引起凝集反应。

3. 要在光线良好的背景下观察凝集反应。

4. 因溶血和血液凝集都是阳性结果,所以观察结果首先看有无溶血,再看红细胞是否凝



集。进行交叉配血实验时试管中发生溶血现象是配血不合,表明有抗原抗体反应,同时还可能有补体参与,必须高度重视。

5. 严格按照试剂说明书进行试验操作。

三、酶介质试验技术

(一)原理

红细胞膜表面的唾液酸带负电荷,使红细胞相互排斥,保持悬浮状态。某些蛋白水解酶可作用于红细胞表面的多糖链上,切断带有负电荷羧基基团的唾液酸,从而减少红细胞表面负电荷,缩短红细胞之间的距离,增强 IgG 抗体与红细胞表面抗原的凝集反应;酶还可以部分地改变红细胞表面结构,暴露出某些隐蔽抗原,使 IgG 类不完全抗体可以与酶处理的红细胞在盐水介质中发生凝集反应。

酶介质(enzyme medium)试验常用的酶有:木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、链酶蛋白酶等,临床工作以木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶使用最多。酶介质试验对 Rh、Kidd 血型系统的检出效果最好,但对 M、N、S、Fy^a、Fy^b等抗原的破坏较为显著。

(二)方法

酶处理试验技术分为一步法和二步法。

在血清和红细胞反应体系中直接加入酶液促进血清中抗体与相应红细胞反应,引起特异性凝集,称之为一步法。该方法操作简便,但敏感性较差。

先用酶液消化红细胞后,洗涤去除酶液,增强红细胞抗原性,使不完全抗体与之发生反应,出现特异性凝集,称之为二步法。该方法操作步骤多,较为复杂,但敏感性强。

(三)结果判读

1. 阳性对照管凝集,阴性对照管不凝集,被检管出现凝集为阳性,不出现凝集判定为阴性。

2. 阳性对照管不凝集或(和)阴性对照管出现凝集,试验失败。分析原因,重新试验。

(四)注意事项

1. 每批酶试剂的条件要标化,否则会影响检测结果。

2. 酶试剂易失效,每批试剂要分装冻存,融化后一次使用。

3. 酶试剂的量应按照实验要求加入。量过少可能导致假阴性,量过多会导致红细胞自发凝集而产生假阳性。

4. 在酶的消化作用下,红细胞表面唾液酸发生变化,负电荷减少,使红细胞间的距离缩短,加强了某些血型系统的凝集强度;对一些抗原系统破坏较轻,不会影响凝集强度;对某些抗原的破坏性较大,如 M、N、S、Fy^a、Fy^b等,不宜使用酶法检测。

四、聚凝胺介质试验技术

(一)原理

聚凝胺(polybrene)是一种高价阳离子季铵盐多聚物,在溶液中有多个阳离子基团,溶解后能产生很多正电荷,可以中和红细胞表面的负电荷,使红细胞之间距离减少,能引起正常红

细胞可逆性的非特异性聚集。在加入柠檬酸重悬液后,仅由聚凝胺引起的非特异性聚集会因电荷中和而消失。当红细胞上结合 IgM 或 IgG 类血型抗体时,在上述条件下,与红细胞紧密结合,出现特异性的凝集,此时加入柠檬酸重悬液则产生的凝集不会散开,呈现出肉眼可见的凝集现象。

聚凝胺法灵敏度高,可检出 IgM 和 IgG 类抗体,而且可以加快凝集反应的速度,操作时间较短,现已广泛应用于血型鉴定、抗体筛查和交叉配血试验。

(二)方法

聚凝胺介质试验是临床输血科最常应用的方法。主要试剂有低离子介质、聚凝胺溶液及柠檬酸重悬液等。聚凝胺法抗体筛查是在加入待检血清/血浆和抗体筛查试剂红细胞后,再加入低离子介质,待室温混匀 1 min 后加入聚凝胺溶液,离心后细胞会在试管底部形成凝块,然后加入柠檬酸重悬液恢复红细胞表面电荷,若为非特异性聚集,红细胞凝块在 1 min 内散开,试验结果为阴性;反之,如依然为不同强度的凝块,试验结果判为阳性。

(三)结果判读

1. 阳性对照管凝集不消失,阴性对照管凝集消失,被检管出现凝集不消失判定为阳性,凝集消失则为阴性。
2. 阳性对照管凝集消失和(或)阴性对照管凝集不消失,试验失败。分析原因,重新试验。

(四)注意事项

1. 不能使用含柠檬酸钠和肝素的抗凝血液标本,因其对聚凝胺有拮抗作用,可能会产生假阴性。
2. 严格按照比例加样,观察非特异性凝集,60s 内观察结果。
3. 聚凝胺对冷凝集有加强作用,有冷凝集的配血不宜选择此法。
4. 聚凝胺只能使正常红细胞发生凝集,对缺乏唾液酸的细胞(如 T 及 Tn 细胞)无作用。
5. 应用聚凝胺法交叉配血出现不相合时,要用抗人球蛋白试验重复。结果不一致时,以抗人球蛋白试验结果为准。
6. 本方法对 Kell 系统检测不理想。

五、抗人球蛋白试验技术

抗人球蛋白试验是由 Coombs 等于 1945 年发明的经典的血清学方法,又称为 Coombs 试验,主要用于检测 IgG、IgA 等抗体参与的抗原抗体反应,也可测定补体组分 C3、C4 片段参与的免疫反应,包括直接抗人球蛋白试验(direct antiglobulin test, DAT)和间接抗人球蛋白试验(indirect antiglobulin test, IAT)。DAT 用于检测在患者体内致敏红细胞的不完全抗体和(或)补体。IAT 用于检测血清中的不完全抗体,即在体外致敏人红细胞,再与抗人球蛋白试剂反应。

(一)原理

抗人球蛋白试验主要用于检测血清中的不完全抗体和(或)补体。大部分 IgG 抗体与具有相应抗原的红细胞在盐水介质中能够特异性结合,但不发生肉眼可见的凝集反应,该类抗体称为不完全抗体。不完全抗体主要是 IgG 类, IgG 为 7S 的单体结构,分子量小,在盐水介



质中只能致敏红细胞,不能出现可见的凝集反应;加入抗人球蛋白试剂后,后者的 Fab 片段与包被在红细胞上 IgG 的 Fc 片段结合,从而通过抗人球蛋白分子的搭桥作用而产生红细胞凝集,未被抗体致敏的红细胞不会发生凝集,因此采用此种方法能够检测出血清中是否存在不完全抗体。

有些不完全抗体只有在补体同时存在时,才能出现抗人球蛋白试验阳性反应,例如一些 Duffy 抗体不需要补体存在就能出现凝集反应,而另一些 Duffy 抗体只有在补体存在时才能出现凝集反应。

(二)临床应用

DAT 在临床上主要用于胎母血型不合新生儿溶血病的诊断、免疫溶血性输血反应的调查、自身免疫性溶血性贫血(autoimmune hemolytic anemia, AIHA)的诊断及药物诱发型溶血病的诊断。

IAT 主要应用于血型鉴定、交叉配血、器官移植、妊娠所致免疫性血型抗体以及自身免疫性血型抗体的检出和鉴定。

(三)抗人球蛋白试剂

抗人球蛋白试剂主要有多特异性和单特异性的区分,多特异性抗人球蛋白试剂主要含有抗-IgG 和抗-C3d,也可能含有抗-C3b、抗-C4b 和抗-C4d,以及抗-IgA 和抗-IgM 分子重链的成分。单特异性抗人球蛋白试剂主要含有某一种抗人球蛋白成分,例如抗-IgG、抗-IgA、抗-IgM、抗-C3d 等试剂。进行试验时应仔细阅读试剂使用说明书。

(四)直接抗人球蛋白试验

患者体内若有与自身红细胞抗原不相合的不完全抗体存在,可使红细胞处于致敏状态,通过加入抗人球蛋白试剂,与红细胞上吸附的不完全抗体结合,在致敏红细胞之间搭桥,出现肉眼可见的凝集。

1. 结果判读

(1)阳性对照管凝集,阴性对照管不凝集。被检管凝集,判定为阳性。

(2)阳性对照管凝集,阴性对照管不凝集。被检管不凝集,需要做阴性确认后判定结果(无凝集的被检管中加入 IgG 抗-D 致敏红细胞后离心,出现凝集,判定阴性结果正确;否则可能是红细胞洗涤不充分而呈假阴性,必须重新试验)。

(3)阳性对照管不凝集和(或)阴性对照管凝集,结果不可信不能发出报告,分析原因后重新试验。

2. 注意事项

(1)抗人球蛋白血清应按说明书使用最适稀释度,避免出现前带现象而误判为阴性。

(2)结果判读时应转动拖拉,细胞扣摇散后,如肉眼未见凝集,应将反应物涂于玻片上,再在显微镜下观察确认阴性。

(3)如需进一步分析体内致敏红细胞的免疫球蛋白类型,可分别以抗-IgG、抗-C3d 单价抗人球蛋白血清进行试验。

(4)被检标本需用 EDTA 抗凝,避免出现假阳性;标本不宜久置,防止红细胞上已致敏的抗体游离到血浆中,造成假阴性或阳性程度降低。

(5)红细胞上抗体吸附太少可使直接抗人球蛋白试验呈现假阴性,如自身免疫性溶血性贫血和 ABO 新生儿溶血的标本。

(6)DAT 前红细胞需进行充分洗涤,以去除游离的球蛋白和补体,防止其中和抗人球蛋白试剂导致假阴性。洗涤后应立即检测。应使用室温生理盐水进行洗涤。如果采用更高温度的盐水如 37℃进行洗涤,可能使致敏在红细胞上的低亲和力 IgG 被洗脱下来。

3. 意义 DAT 阳性可以是在体外形成的,也可以是在体内形成的,以体内形成为主。DAT 阳性的红细胞在体外偶尔会发生溶血,在体内则多半会受到免疫系统攻击而被破坏。其具体意义需要结合临床病情加以判断。

(1)单抗—C3d 阳性的意义:补体可在体内或体外致敏红细胞,可以是伴随抗—IgG 阳性一起出现,也可以单独出现。以下分析常见的几种情况下抗—IgG 阳性的意义。

①IgM 抗体在体内激活补体:患血液冷凝集素疾病的患者,冷反应自身抗体在 32℃时也能够与红细胞抗原反应,因此红细胞可被自身冷抗体致敏,然后补体吸附到红细胞上,是否溶血决定于患者的免疫状态。未溶血的红细胞返回体内 37℃环境,冷抗体被释放到血液中,呈游离状态。但补体成分仍然牢固地吸附在红细胞上,存在于红细胞上的补体成分主要为 C3d 和 C4d。

②IgM 抗体在体外激活补体:在体外检测红细胞时,单纯的抗—IgG 阳性常由具有冷抗体性质的 IgM 抗体造成的。1 个 IgM 抗体分子可使成百的补体结合在红细胞上,当 IgM 性质的冷抗体在体外较冷的环境下与红细胞结合,并激活补体,在较高的温度或反复洗涤中 IgM 抗体会从红细胞上脱落,但补体仍保留在红细胞上。

③温抗体型自身免疫性溶血性贫血:DAT 阳性大约 10%~20%是由 C3 单独引起的。此时在常规检测方法中检测不出 IgG、IgA 及 IgM 抗体,虽然部分标本红细胞有 IgG 包被,但数量有可能低于抗—IgG 试剂能够检出的最小量。

④血浆内形成的免疫复合物能够很弱并非特异性地结合到红细胞上,引起补体包被。在免疫复合物解离后,只留下激活的补体继续附着于红细胞膜上,此时只有 C3d 能被特异性地检出。

(2)单抗—IgG 阳性的意义:单抗—IgG 阳性,说明红细胞表面致敏了 IgG 免疫球蛋白。确认致敏在红细胞上的 IgG 抗体的特性,常用的方法是选择合适造放散方法,将 IgG 抗体从红细胞上放散下来,然后进行抗体鉴定。以下是按照放散液中 IgG 抗体特性的不同,分别说明 IgG 阳性的意义。

①自身抗体:如果从患者红细胞上放散下来的抗体与谱红细胞出现阳性反应,同时患者不是新生儿,在 4 个月内也无输血史,则该抗体可以确认为自身抗体,患者很可能患有自身免疫性疾病。该自身抗体与一组谱红细胞反应,会出现较为一致的凝集强度,此种情况下一般难以确认抗体特异性。

②类同种特异性自身抗体:偶尔某些自身抗体在与谱红细胞反应时,与某些细胞反应较强,与另外一些细胞反应较弱。对照谱红细胞抗原列表(细胞谱)分析,可见该抗体似乎包含了某种类似同种抗体的特异性。用吸收放散试验可以证明,该抗体不是自身抗体和同种抗体的混合物,它仍然是一种自身抗体,只是该自身抗体具有某些特异性,类似同种抗体的特点。