

ABO和Rh血型鉴定

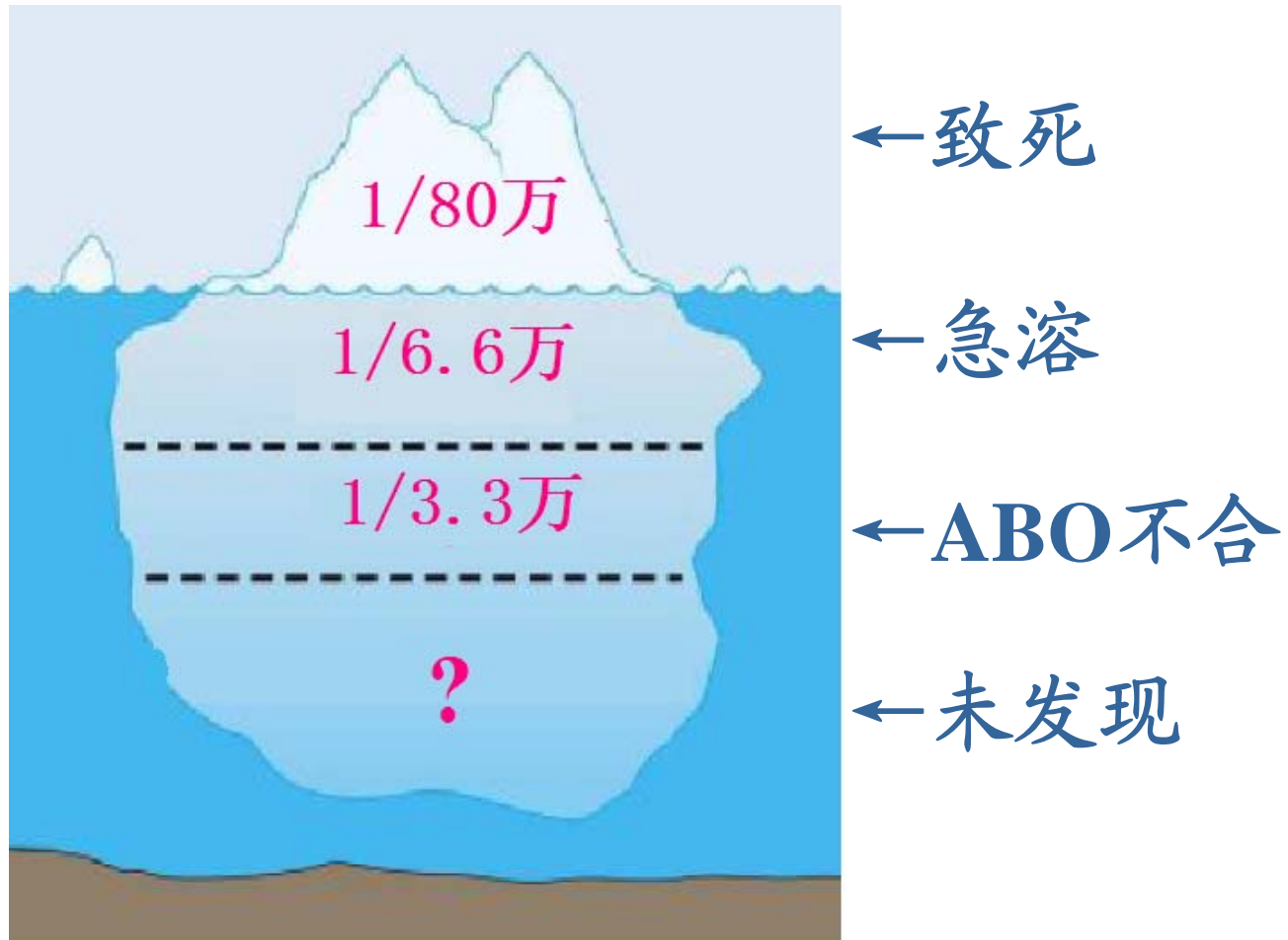
陕西省血液中心

徐华

ABO血型鉴定的实验方法

- ABO血型鉴定主要是利用抗原与抗体之间特异性结合的凝集反应来完成的，包括正定型（forward typing）与反定型（reverse typing）；
- 纸片（凹板）法、试管法、凝胶柱法、流式细胞术...
- 虽然ABO鉴定的技术成熟度高，但仍有差错导致严重后果。

SHOT的冰山模型



- 广东江门市中心血站：血型定型错误率**80/万U**。
——临床输血与检验, 2005, 2: 119.
- 湖南张家界市中心血站：血型定型错误率**115/万U**。
——临床输血与检验, 2008, 4: 348-349.
- 湖北襄樊市中心血站：1995 ~ 2006年因ABO血型不合导致严重输血不良反应**7例(29.4/100万U)**。
——中国输血杂志, 2008, 04: 289.

导致ABO鉴定差错的原因

- 人为错误;
- 疑难血型。

ABO疑难血型

- 正反定型不符;
- 抗原/抗体弱凝集（不能肯定有无）；**注意：**反定型的凝集减弱，提示漏检弱抗原的可能。

ABO疑难血型的鉴定策略

分析其导致异常结果的各种原因，在策略上，采用**排除法**，即排除一切不可能，剩下的就是可能的。

首先应排除人员、实验的原因：

- 标本；
- 试剂；
- 漏检；
- **笔误。**

- 首先重复试验，必要的情况下重新采集新鲜标本；
- 待检血清纤维蛋白要完全析出，耐心等待；
- 洗涤红细胞；
- 复审和核对。

正定型实验的难点

- 正定型实验主要难点：红细胞表面A/B抗原的改变（减弱）；
- 健康个体中的ABO亚型：红细胞表面携带抗原数量较少；
- 疾病导致ABO抗原减弱：对于临床标本，了解患者的临床诊断和疾病进程是很有必要的，可能情况下了解家系。

ABO亚型

- 1911年Von Dungern和Hirschfeld首次提出亚型的概念，将A型分为A1和A2两个亚型；
- ABO亚型抗原的结构、性质及数量与正常ABO血型抗原均存在一定差异，差异的产生与基因突变有关；
- 目前至少已发现60余种A亚型和30余种B亚型。

俄国版“开膛手”



- 安德列·罗曼诺维奇·奇卡缇洛：疯狂作案12年之久，尽管最终被裁判要对约53起谋杀案负责，但许多学者认为奇卡缇洛大概共犯下了70宗命案。
- 奇卡缇洛本身血液的特性是造成他屡次脱离侦查人员怀疑的重要原因----他的血型是**AB**，但**B抗原有时很不明显甚至检测不出来**。案件调查人员曾多次将他的血样与被害人身上调取的精液或血迹样本进行比对，但是结果往往发现二者并不是同一血型，这在客观上给案件的侦破带来了巨大的障碍。

A/B亚型

- 基因突变是糖基转移酶在功能、活性上发生改变，A/B抗原合成减少，结构缺失（A2）；
- 单克隆抗体会漏检？
- 多克隆株混合抗体？
- A弱、B弱？基因分型确定。



A?B

A: MH04/3D3

B: NB10.5A5/NB1.19

基因型: Ael04/B101

单克隆抗体的缺陷

- 单克隆抗体的特性是对制备免疫克隆的抗原表位具有很好的识别功能，另一方面可以被视为一种“**单纯**”的抗体，对于缺乏相关表位的一些变异型则缺乏检出能力。

单克隆抗-A/B 的检出能力评估

标本 \ 试剂	产品 1		产品 2		产品 3		产品 4	
	抗-A	抗-B	抗-A	抗-B	抗-A	抗-B	抗-A	抗-B
09****9X	4+	4+	+	4+	4+	4+	4+	4+
12****1x	2+	4+	-	4+	1+ ^S	4+	2+ ^W	4+
04****3	4+	4+	1+	4+	4+	4+	4+	4+
11****0X	4+	1+	2+	-	4+	-	4+	2+
样本 1	1+ ^W	-	±	-	1+ ^W	-	1+	-
样本 2	-	+	-	+	-	+	-	2+

- 案例1: 产品1-正定A?B, 反定B型 (2+ ~ 3+)
产品2-正定B, 反定B型 (A细胞2+)
吸收放散结果-A_弱B, 有抗-A1抗体
- 案例2: 产品1-正定AB?, 反定A型(+)
产品2-正定B, 反定B型
吸收放散结果-AB_弱, 有抗-B抗体

人源抗体的使用

- 人源抗体是混合型的抗体，其覆盖的抗原结构很多；
- 结合一些敏感的血清学技术可以用于鉴定出弱表达的A/B抗原；
- O型人的抗-A+B抗体，可以检出很多弱表达的A/B抗原，通过采用抗-A+B，可以鉴定或排除样本为“O”型或“非O”型；
- 人源抗体的使用前需要做好质量控制。

怎么做？

- 在进行正定型试验时，若试验结果在显微镜下凝集不明显，应将检测试管置于室温、 37°C 或 4°C 中放置30min，再用显微镜检查核实；
- 进一步确认：**吸收放散试验**、糖基转移酶试验、流式细胞术及基因检测等方法。

亚型需要明确吗？

- 血清学实验结果源于主观上的判断，对临床医生来讲，过细的亚型区分往往会引起更多的混乱；
- 从临床实际应用的角度出发，对ABO弱表现型的血清学检测结果以描述性的报告更为合适，如“A_弱”，“B_弱”，“A_弱B”等。易于临床医生掌握与理解，也更易于输血科工作人员与临床医生的沟通。

反定型实验的策略讨论

- 一定要做反定型!
- 在进行反定型检测时，必须设置O型红细胞对照组，O型红细胞所起的作用是提示血清中是否存在抗-H、不规则抗体、冷凝集素、高球蛋白血症等干扰红细胞凝集的物质；
- 反定型结果不正确，无外乎两种情况：出现了“多出来的凝集”以及“少了应有的凝集”。

反定型出现的问题

多出来的凝集：

- 冷抗体；
- 高免疫球蛋白血症；
- IgM型不规则抗体。

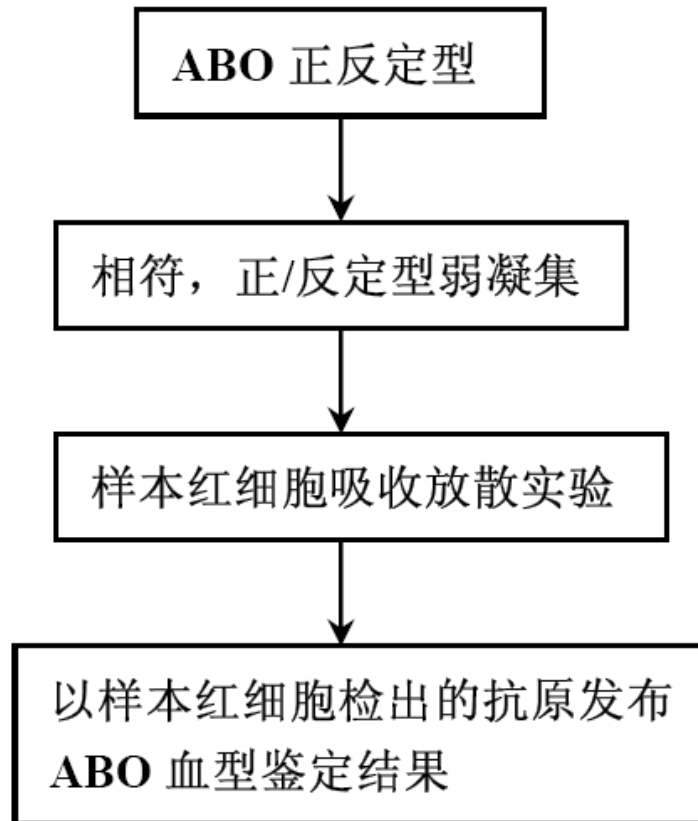
IgM型 不规则抗体

- ABO亚型产生的不规则抗体：与A、B试剂红细胞凝集程度弱，且不与O型试剂红细胞发生凝集反应；
- 反定型呈弱凝集，正反定型结果相符：需特别注意是否存在由ABO亚型不规则抗体引起的凝集而导致的血型误判；AB亚型？
- ABO亚型不规则抗体导致的反定型异常往往伴随着正定型红细胞的抗原减弱或缺失，即使正反定型相符，如果有弱凝集现象，则都应采用吸收放散等灵敏度较高的试验方法作进一步确认，并以正定型的结果为准。

- ABO血型以外的IgM不规则抗体：与O型试剂红细胞发生凝集反应；
- 抗体筛查：抗-M、抗-E.....
- 需要用相应抗原阴性的A/B/O细胞来做反定型实验。

ABO疑难血型检测策略

ABO正反定型相符，但存在弱凝集



案例1

	正定型		反定型		
	抗-A	抗-B	Ac	Bc	Oc
	0	0	4+	1+	0
4°C 10min	0	0	4+	2+	0

吸收放散实验	Ac	Bc	Oc
抗-A→放散液	0	0	0
抗-B→放散液	0	2+	0

结论

B弱，血清中有IgM抗-B

案例2

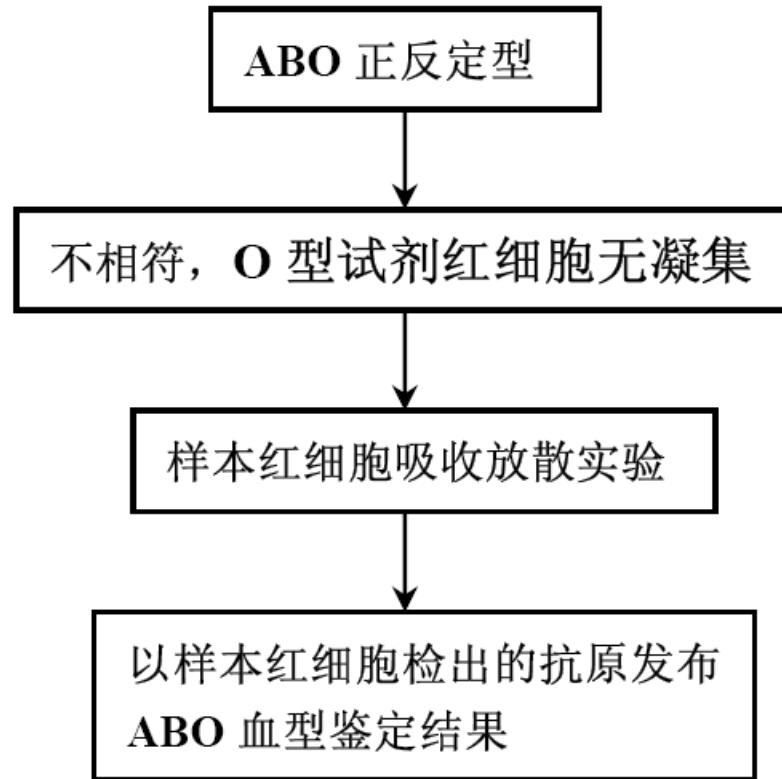
	正定型		反定型		
	抗-A	抗-B	Ac	Bc	Oc
4°C 10min	0	0	4+	1+	0
	0	0	4+	1+S	0

吸收放散实验	Ac	Bc	Oc
抗-A→放散液	0	0	0
抗-B→放散液	0	0	0

结论

O型, IgM抗-B弱

ABO正反定型不符，O型试剂红细胞无凝集



案例3

	正定型		反定型		
	抗-A	抗-B	Ac	Bc	Oc
	0	0	1+w	0	0
4°C 10min	0	0	1+	0	0

吸收放散实验	Ac	Bc	Oc
抗-A→放散液	0	0	0
抗-B→放散液	0	2+	0

结论

B弱，血清中IgM抗-A弱

案例4

	正定型		反定型		
	抗-A	抗-B	Ac	Bc	Oc
	1+s	4+	4+	0	0
4°C 10min	1+s	4+	4+	0	0

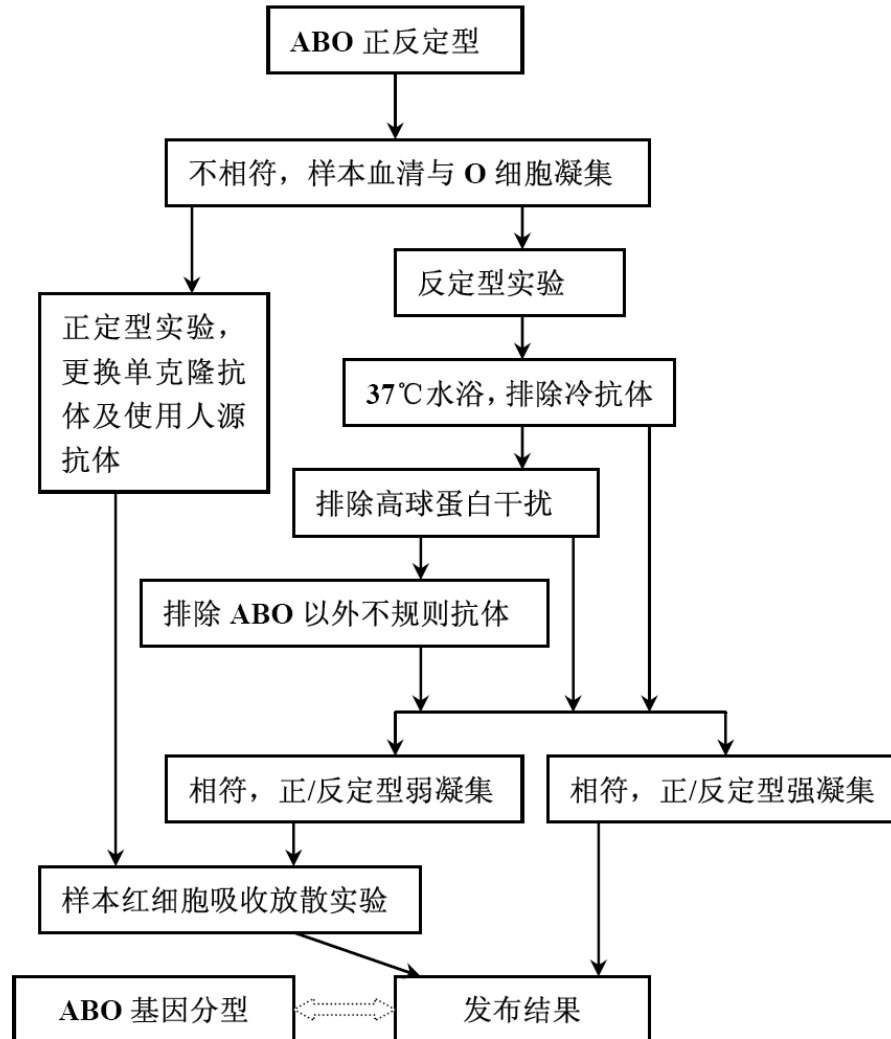
吸收放散实验	Ac	Bc	Oc
抗-A→放散液	4+	0	0
抗-B→放散液	0	4+	0

自身对照	直抗	抗-A1	A2C
0	0	0	0

结论

A弱B，血清中有IgM抗-A1

ABO正反定型不符，O型试剂红细胞出现凝集



案例5

	正定型		反定型			自身对照	盐水对照
	抗-A	抗-B	Ac	Bc	Oc		
	1+w	1+w	4+	4+	1+w	1+w	1+w
56°C 盐水洗红细胞	0	0				±	0
37°C 水浴10 min			4+	4+	0	0	

结论 O型，冷抗体引起正反定型不符

案例6

正定型		反定型			自身对照	盐水对照
抗-A	抗-B	Ac	Bc	Oc		
4+	0	±	4+	±	±	0
		±	4+	±	±	0
		0	4+	0	0	

37°C 水浴10 min
弃上清，加盐水

结论 A型，高球蛋白血症引起正反定型不符

案例7

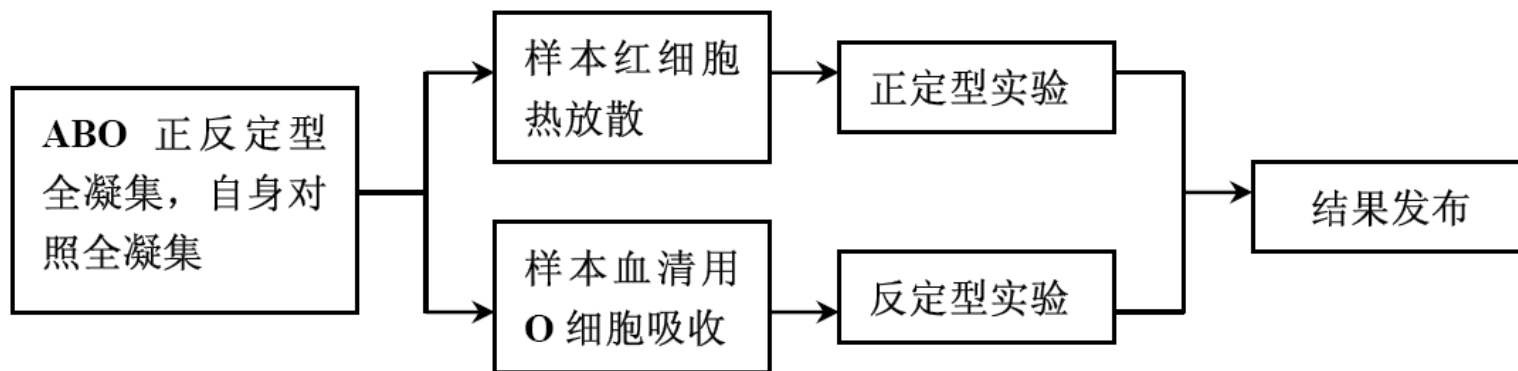
正定型		反定型			自身对照	盐水对照
抗-A	抗-B	Ac	Bc	Oc		
0	4+	4+	4+	3+	0	0
		3+	2+	2+		
		3+	2+	2+		
抗-M	抗-N	谱细胞		M+	M-	M-
0	4+			4+	0	0

37°C 水浴10 min
弃上清，加盐水

结论

B型，抗-M引起正反定型不符

ABO正反定型全部凝集



- O型细胞作为对照有助于发现问题和纠错;
- 吸收放散实验的应用可以大大减少错检/漏检。

ABO亚型的输血

- 只要供者红细胞抗原种类等于或少于患者自身的红细胞抗原种类就是安全的输血。
- 对于ABO亚型的供血者，其红细胞可用于同型的患者而不必考虑亚型问题。
- ABO亚型的受血者，必要时输注O型洗涤红细胞。
- 发布报告和输血不是一码事---相合性输血原则。

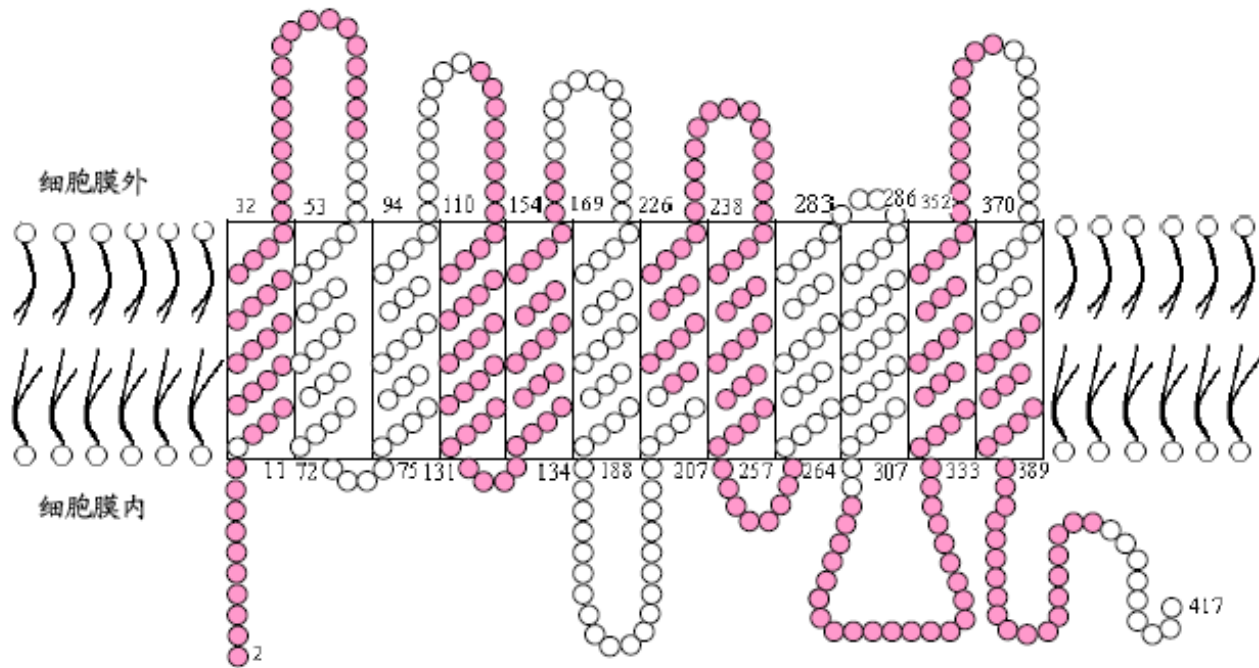
Rh血型的发现

- 1939年，Levine和Stetson观察到一位O型分娩死胎后大量失血的产妇，胎儿死于严重的新生儿溶血病，产妇输入O型血液后发生了严重的溶血性输血反应。
- Landsteiner和Wiener用恒河猴（macacus Rhesus）红细胞免疫天竺鼠和家兔，得到的免疫血清可凝集85%白种人的红细胞。以恒河猴（rhesus）的前两字母（Rh）对该血型抗原进行命名，有这种抗原的个体即为Rh阳性，否则为Rh阴性。实际上恒河猴抗血清所检出的抗原是LW抗原（为纪念Landsteiner和Wiener而命名），对RH血型发现的提示作用。

- 1943年，RA Fisher提出Rh血型基因由3对（Cc、Dd和Ee）连锁基因组成，3对基因排列顺序为DCE（Fisher和Race，1946），随后的实验证实d抗原并不存在，因而推断d基因是一个无效基因。1990年，RH基因的cDNA被成功克隆后，对Rh血型系统基因结构才有了更准确深入的认识。目前认为，Rh血型系统基因由RHD和RHCE基因组成。
- 主要的Rh抗原：D/C/c/E/e。

- Rh蛋白由*RHD*基因编码合成，RhD蛋白与RhCE蛋白结构相似，均由417个氨基酸组成。RhD蛋白与RhCE蛋白只有32~35个氨基酸的差异；
- Rh蛋白贯穿红细胞膜12次，在红细胞膜外形成6个短环状结构的胞外区，环状结构的长度差异较大，分别由3~41个氨基酸组成，Rh抗原决定簇就位于这6个环状结构上。

- Rh蛋白的抗原性取决于空间结构



- **Rh**抗体为什么制备困难？
- **Rh**蛋白的抗原性与其空间结构密切相关，空间结构一旦发生改变，则可导致抗原性的改变或消失。
- 讨论：
- **Rh**阴性人能输**Rh**阳性血浆吗？

几种主要的血型系统在人体中分布

ISBT No.	血型系统	抗原标识	其它血细胞的分布	组织器官分布
001	ABO	ABO	白细胞, T 淋巴细胞, 血浆蛋白, 血小板, 分泌性蛋白	通常表达于上皮细胞和内皮细胞表面, 有时在肿瘤细胞表面有异常表达
002	MNS	MNS	无	无
003	P	P1		内皮细胞, 成纤维细胞, 消化道和泌尿生殖道的平滑肌细胞, 胎盘的间质细胞, 肿瘤细胞
004	Rhesus	RH	无	无
005	Lutheran	LU	白细胞, T 淋巴细胞	血管上皮组织和内皮组织基底层
006	Kell	KEL		睾丸, 脑, 心脏, 骨骼肌
008	Duffy	FY		毛细血管的内皮细胞, 肾收集管的上皮细胞, 肺泡, 小脑的蒲肯野氏细胞
009	Kidd	JK	中性粒细胞	肾髓质
010	Diego	DI		骨组织, 内耳

- **Rh**抗原只表达于红细胞表面，专属抗原！
其它器官表面只表达相关蛋白。
- 讨论：**Rh**阴性的个体可以输用来自**Rh**阳性供者的血小板吗？

RhD变异型

- RhD变异型的特点:
- 与一些抗-D发生凝集（弱），与另一些抗-D不发生凝集；
- 与多种都发生抗-D弱或者很弱的凝集；
- 需用间接抗球蛋白试验确认。

抗-D 单抗	抗原表位	弱 D15 型				对照组			
		①	②	③	④	D+	D-	DVIc	DEL
LHM76/58	8(22)	+	+	0	0	+	0	0	+
LHM76/59	36	+	+	+	+	+	0	+	+
LHM174/102	1(2)	0	0	0	0	+	0	0	+
LHM50/2B	6/7(15/16)	+	+	+	+	+	0	0	+
LHM169/81	1	+	+	±	±	+	0	0	+
ESD1	4(1)	+	+	+	+	+	0	0	+
LHM76/55	3(1)	+	+	0	+	+	0	+	+
LHM77/64	9(1)	0	0	0	0	+	0	+	+
LHM70/45	1(2)	0	0	0	0	+	0	0	+
LHM59/19	8(1)	0	0	0	0	+	0	0	+
LHM169/80	6(3)	+	+	+	+	+	0	0	+
人源抗-D	多抗	+	+	+	+	+	0	+	+



Anti-D

Clones: TH-28/MS-28
OSCOT® Monoclonal
IgM/IgG

MILLIPORE
Livingston, Scotland, UK
Fleming Road, Livingston, UK

ANTI-D (RH1) TOTAL

IVD

CLONE/CLON/KLON/CLONA:
P3x61 + P3x21223B10 + P3x290 + P3x291
DIAGAST
FRANCE

DU型（RhD弱变异型）的输血

- DU型的血液只能当作Rh阳性血来用，采供血机构必须做RhD的血清学确认；
- DU型的受血者必须按照Rh阴性受血者来对待，临床医院不必做RhD确认。

Rh阴性的输血

- Rh阴性输Rh阴性血液。
- 紧急情况下，非ABO同型的Rh阴性血液（洗涤红细胞），如O型Rh阴性洗涤红细胞。
- 紧急情况下，输Rh阳性血？怎么运作？抗体？
- 英国NBS《O型D阴性红细胞大规模应急准则》：
- O型D阴性患者使用O型D阳性血液：O型D阴性患者使用O型D阳性血液：当O型D阴性血液无法得到或极度短缺，在输血前检测无抗D抗体后，可将O型D阳性红细胞给O型D阴性无生育可能妇女和未免疫男性。

Rh阴性输血的注意事项

- 输血指证、提前预约;
- 审核制度;
- 告知义务;
- 特殊情况输血，多方参与，广泛告知!
- 患者急需输入大量血液才能挽救生命的情况下，权衡利弊，给RH阴性患者输入配合型RhD阳性血，而不应盲目等待，错失抢救患者最佳时机。

- **RhD**抗原性最强，其次为**RhE**、**RhC**、**Rhc**、**Rhe**抗原。
- 抗-**D**抗体是最典型的红细胞血型的免疫性抗体，大多数的**Rh**抗体是由人体免疫系统暴露于外来红细胞（经输血或怀孕）所致。
- 在临床病例中，除抗-**D**抗体外，抗-**c**和抗-**E**抗体也较为常见多数抗-**C**血清是抗-**C**和抗-**Ce**的混合物。这些抗体的混合特性也反映出免疫应答的复杂性和“相对精确性”。
- 注意：**IgM**型**Rh**抗体。

RhCE的输血意义

- Rh阴性抗原表现型以dccee (54.98%) 和dCcee (30.81%) 为主。
- Rh阳性以DCCee (约50~60%) 和DCcEe (约25~30%) 居多，DccEE约为10%。
- Rh抗体导致的新生儿溶血病中，在Rh阴性母亲中，主要是抗-D抗体，在Rh阳性的母亲中，主要由抗-E抗体造成，而且多有输血史(80%)，其它Rh抗体也有发现。

如前所述，有自身抗体的受血者需考虑**RhCE**抗原，讨论：

- 女性输血，尤其是未生育女性，是否考虑**RhCE**抗原？
- **Rh**抗原与回忆反应：有输血史的患者输入的红细胞生存时间短？标准？

实验室的质控

- 必要性：实验的有效性——对患者对自己负责； 法律依据——证据；
- 涉及的实验：血型鉴定； 抗体鉴定； 疑难配血；
- 针对的试剂：血型抗体； 抗筛细胞； 配血试剂；
- 外部的室间质评； 室内质控——适可而止。

室内质控

- 抗体：给红细胞分类的试剂，有国家批准文号，不做特异性；
- 内容要反映出使用的抗体符合规定，并保持良好的质量状态；批间和当日；
- 登记：生产厂家；批号；有效期；外观；亲和性及效价等。

- 抗筛细胞：自制，各种主要抗原都具备并且强度相近，SOP明确，制备记录完整，使用的是MAP液保存.....
- 抗体鉴定谱细胞：生产厂家；批号；有效期；外观。

- 配血试剂的质控：生产厂家；批号；有效期；外观；
- 阳性对照：抗-D（IgG）+Rh阳性红细胞；反应要强阳性；
- 同步进行，证明实验的过程和结果没有问题。
- 支持因素：冰箱温度记录，室内温湿度等。

- 实践是学习的最好方法!

The background of the image is a solid, vibrant red color. Scattered across this background are several 3D-rendered red blood cells. These cells are depicted as biconcave discs, with a darker red center and a lighter red, almost glowing, outer rim. They are oriented in various directions, some showing their flat surfaces and others showing their curved edges. The lighting creates a sense of depth and highlights the texture of the cells.

谢谢!