·临床研究·

微孔板法自动检测技术筛查 Rh 血型

李　慧(天津市血液中心　300110)

【摘要】 目的　建立微孔板法快速筛查献血者 Rh 阴性血型的方法。**方法**　(1)用 AT-PLUS2 全自动加样系统,在 96 孔微孔板上按编制好的程序进行加样;(2)通过离心、孵育、悬浮、静止等过程,完成微孔板凝集试验,利用自动扫描技术判读结果,凝集孔 *A* 值超过阳性下限判定为 Rh 血型 D 抗原阳性,非凝集孔 *A* 值未超过阴性上限判定为 Rh 血型 D 抗原阴性;(3)通过优化选择最适抗-D 血清浓度、受检红细胞浓度及孵育、悬浮、判读等最佳条件。**结果**　抗-D 血清 1∶4 稀释为最适工作浓度;受检红细胞最适浓度为 4%;孵育条件为 8 min,400 r/min,3 accel;悬浮最适条件:2 min,1 000 r/min,2accel;阳性下限 *A* 值为 0.75,阴性上限 *A* 值为 0.35。**结论**　实现了大批量筛选 Rh 血型的自动化及标准化。

【关键词】 微孔板;　凝集试验;　Rh 血型

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.14.036　**文献标志码:**A　**文章编号:**1672-9455(2014)14-1971-02

Rh 血型是最复杂的遗传多态性血型系统之一,临床常见的 Rh 抗原有 5 种,其中 D 抗原抗原性最强,并以 D 抗原存在表示为 Rh 阴性[1-2]。D 抗原在临床上可引起新生儿溶血、溶血性输血反应等[3]。汉族人群中 Rh 阴性者只有 0.2%～0.5%,属稀有血型[4-5],因此建立对献血员 Rh 阴性血的常规筛查方法显得非常必要。传统的 Rh 血型筛查采用玻片、试管等实验载体,利用酶、盐水、抗人球蛋白作为媒介进行。这些方法由于手工操作,人为判断误差大,操作周期长,效率低,难以实现批量化标本的标准化处理[6]。本文将样品全自动处理系统与微孔板凝集法有机结合起来,用于 Rh 血型 D 抗原的筛查之中,取得良好的结果。并建立了标准操作程序,从而实现了大批量筛选 Rh 血型的自动化、标准化。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂　AT-PLUS2 全自动加样系统(HAMILTON 公司,瑞士),HTⅡ自动扫描酶标仪和 T.S 温控孵育振荡仪(Anthos 公司,奥地利),ModelTJ-6 平板式离心机(Beckman 公司,美国),96 孔 U 型板(上海血液中心参比实验室),(IgM+IgG)单克隆混合抗-D 血清(Dominon 生物有限公司,加拿大),奥斯雷勃实验判读软件(奥斯邦公司)。

1.2　微孔板凝集法自动筛查 Rh 血型试验原理　其原理是将自动加样系统与微量凝集试验结合起来,利用自动扫描技术判读结果,96 孔微板经过扫描每孔都获得一个 *A* 值,凝集孔的 *A* 值超过 cut off 值判定为 Rh 血型 D 抗原阳性,非凝集孔的 *A* 值未超过 cut off 值判定为 Rh 血型 D 抗原阴性。

1.3　试验方法

1.3.1　抗-D 血清最适工作浓度选择　在其他试验条件未经选定之前,首先要确定抗-D 血清的最适工作浓度,将抗-D 血清倍比稀释为不同浓度,分别为原液、1∶2、1∶4、1∶8、1∶16、1∶32,选择具有 D 抗原性较弱的标本与不同浓度的抗-D 血清进行凝集反应试验,以出现弱凝集效果的最低稀释度作为工作浓度。

1.3.2　受检红细胞悬液最适浓度确定　取上述弱 D 抗原的标本压积红细胞配制成 2%、3%、4%、5% 4 种浓度与抗-D 血清进行平行试验,以凝集效果最好的浓度为受检红细胞悬液最适浓度。

1.3.3　孵育、悬浮条件选择　由于孵育和悬浮过程均在温控振荡器上进行,温控振荡器设置参数有 3 个,即时间、振幅、振频。采用 L9(33)3 种因素 3 种水平正交试验确定孵育、悬浮条件中参数的最佳组合,见表 1。

表 1　孵育、悬浮条件的因素水平

因素	振幅(level)	振频(r/min)	时间(min)
1	1	200	2
2	2	400	4
3	3	600	6

1.3.4　离心条件　依照试剂说明书设定:400 g,30 s。

1.3.5　静置条件　1～2 min。

1.3.6　判读结果　以奥斯雷勃实验判读软件,驱动 HTⅢ 酶标仪在 620 nm 波长下扫描微板,并以透光度(*A*)传输数值,*A* 值越高凝集越强。

2　结　　果

2.1　抗-D 血清工作浓度确定结果　见图 1。把抗-D 血清原液稀释成 1∶2、1∶4、1∶8、1∶16、1∶32 分别进行检测,图 1 显示抗-D 血清浓度影响检测的 *A* 值,可以看出随着抗-D 血清浓度增加 *A* 值增加。当抗-D 血清浓度为 1∶4、1∶2 时,与原液凝集效果基本相同。而低于 1∶4 时得到的 *A* 值均比原液低,1∶4 为最低稀释浓度,因此选择 1∶4 作为抗-D 血清工作浓度。

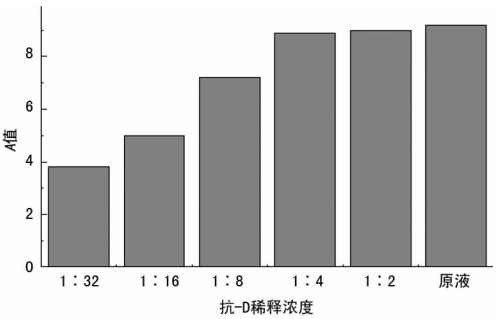

图 1　抗-D 稀释浓度

2.2　受检红细胞的最适浓度的确定结果　浓度 2%其 *A* 值为

0.899，浓度 3%其 A 值为 4.235，浓度 4%其 A 值为 9.796，浓度 5%其 A 值为 1.678。由以上结果可以看出，随受检红细胞浓度的升高，A 值先是升高，随后 A 值又下降。表明受检红细胞浓度为 4%时，A 值最高，凝集效果最佳，因此选择 4%为受检红细胞的最适浓度。

2.3 孵育、悬浮条件的确定　温控振荡器内设参数，经过 L9(3^3)正交表设计的 18 个实验数据积累，分别将各因素各水平 A 值合计，对比选择最佳水平，综合得出孵育最适条件：8 min，400 r/min，3 accel；悬浮最适条件：2 min，1 000 r/min，2 accel。

2.4 扫描点数和临界值确定　扫描点数是影响判读准确性的关键，阴性 A 值与阳性 A 值之差越大判读结果越好，分别将凝集＋＋＋＋的阳性结果和不凝集的阴性结果进行不同扫描点数扫描所得结果显示，扫描点数为 15 时，阴、阳 A 值之差最大，因此最佳扫描点数选择 15 点。根据对 2 000 份阳性标本的 A 值分析，A 值大于 0.75，因此阳性下限界定为 0.75；另对 20 份阴性标本 A 值分析，A 值小于 0.35，因此阴性上限界定为 0.35，可疑区间为 0.351～0.749。

2.5 微板法与试管法比较　上述条件确定后，对 22 220 份样本进行了 Rh 血型 D 阴性细胞的筛选工作，获得 77 份阴性样本，经过试管法确证后均为阴性，微板法与试管法相符率达到 100%。但发现 1 例采用新微板检测为阳性的标本，经试管法验证为阴性；再次使用经冲洗晾干的旧微板检验时，其结果为阴性。分析可能是由于使用的新微板对红细胞和蛋白产生了非特异凝集结果，提示应使用经过预处理的微板。

2.6 新微孔板的预处理　实验中发现有假阳性结果，这种现象是由于新微孔板所带静电对红细胞产生了非特异性吸附，因此对新微孔板预处理可减少细胞吸附，以保证特异性凝集反应，新微孔板预处理过程如下。(1)每孔滴加 20%～30%的小牛血清(BSA)；(2)使用微板振荡器轻轻混匀以保证每孔被彻底覆盖；(3)室温 15～20 min；(4)弃去 BSA；(5)自来水冲洗 5 min；(6)蒸馏水冲洗 2 遍；(7)晾干备用。

3　讨　论

微孔板凝集很好地将自动加样自动判读结合起来，克服了传统手工操作所带来的加样不均一，判读结果存在人为误差，操作周期过长等缺陷。(IgM ＋ IgG)完全抗体性质的抗-D 血清问世，不仅缩短了操作周期，而且使抗原抗体的凝集结果得以在盐水介质中进行，运用微板技术，可实现 Rh 血型 D 阴性筛查试验过程标准化判读结果自动化，以及结果传输网络化。抗-D 血清浓度的优化，既节省试剂用量，又保证了凝集效果，降低了试验成本。微板法自动筛查 Rh 血型技术关键在于使用高效敏感的自动化设备，采用(IgG＋IgM)完全抗体性质的抗-D 血清试剂来保证弱 D 抗原有效检出[7-8]。本试验所用抗-D 血清，其成分含有单克隆 IgG 和单克隆 IgM 对正常 D 抗原、弱 D 抗原(不包括不完全 D 抗原)，采用本试验优化的抗-D 血清浓度和红细胞浓度均可产生较好的凝集反应。这是由凝集反应的特点所决定的，当抗原抗体相遇时如果是颗粒抗原，则出现凝集。红细胞为颗粒抗原，如果红细胞表面存在 D 抗原，会与抗-D 血清中的 IgM 抗体立即发生特异性结合，这时不论彼此量多少，并且该反应需要的时间很短，但此时没有完全凝集。出现凝集是红细胞表面的 D 抗原与 IgM 进一步交联形成大的网络状凝集物，这一过程需要一定的时间和温度调节才能完成。更重要的是需要抗体和抗原的分子比例，本试验采用的 1∶4 抗-D 血清浓度和 4%的受检红细胞浓度，满足了这一比例要求。由图 1 可以看出，当抗-D 血清浓度低于 1∶4 时，A 值较低，易表现为假阴性；对于红细胞浓度，当受检红细胞浓度在 2%时，A 值仅为 0.899，5%时 A 值为 1.678，4%时 A 值最高达到 9.796。充分显示了抗原抗体比例的重要性。

弱 D 抗原的筛查同样是 Rh 血型检测的重要内容。尽管弱 D 的抗原性较弱，但当将弱 D 抗原血输给 Rh 阴性受血者时，仍有产生抗-D 的可能性，产生严重的溶血性输血反应或发生新生儿溶血病。因此应将 D 型供血者做 Rh 阳性处理，传统的弱 D 抗原检测一般采用抗人球蛋白试验、木瓜酶、吸收放散试验、流式细胞术检测，使用较多比较可靠的是吸收放散试验[9-10]，这是由于 IgG 抗体为不完全抗体，无法架接 2 个临近的红细胞，只能与一个红细胞抗原结合。尤其当红细胞的弱 D 抗原，它不能与所有抗-D 血清起反应，部分凝集不明显，易引起判读失误，因此不适于在大规模筛查中应用。新型的单克隆抗体识别的抗原表位单一、纯度高、特异性强，由于其结构均一，与抗原易结合凝集明显，易于实现判读自动化。文献[11]对比了 3 种 IgG、IgM 混合抗-D 血清和人源性抗-D 血清，检测弱 D 抗原的效果，发现混合抗-D 血清可与 D 抗原发生肉眼可见的凝集反应，并且反应迅速，操作简单，可替代人源性抗-D 血清。

Rh 血型筛选与 ABO 血型检测同是盐水介质中的微孔凝集反应，盐水介质可以使红细胞致敏，致敏的红细胞更易与抗体发生反应。

在抗原-抗体结合的二级阶段，抗原抗体结合形成网络结构，由于这一阶段的速度明显下降，需要一定的温度和时间条件。本试验中采用 37 ℃孵育，该温度是大部分抗原抗体反应的理想温度，温度较低会出现冷凝集影响判读结果，温度越高分子热运动速度加快，增加了抗原-抗体接触的概率，提高了反应速度，但温度过高则会使抗原或抗体变性失活，影响试验结果。

振荡和悬浮条件同样影响抗体抗原的结合，适当的振荡和悬浮参数有利于抗体抗原的均匀分布，促进抗原抗体结合，本试验采用的参数是通过正交试验总结出来的，适合于大批量筛查应用。

值得注意的是采用微板法筛查 Rh 血型，虽然其灵敏性、准确性高于传统手工方法，但有假凝集现象，其原因是新微孔板带有静电，对红细胞和蛋白质产生了非特异性吸附，使抗原-抗体不能均匀分布，影响了判读结果。因此对于新微孔板应进行前期的预处理。

实验参数经过优化确定及新微孔板预处理程序确定后本试验室制订了 Rh 血型抗原筛选的标准操作规程，既保证了 Rh 阴性结果初筛的准确性，又杜绝了假阴性的错报，减少了 Rh 阴性血液资源浪费。本试验确定的参数已经过大量试验所证实，采用本试验内容已筛查出大量的 Rh 阴性血，有效缓解了 Rh 血型的短缺。

参考文献

[1] 周毓菁，王雪明，袁异玮，等. RhD 阴性初筛样本的血清学和基因分型结果[J]. 临床检验杂志，2012，30(3)：224-226.

[2] 康琼英，闫国超. 68 例初筛 RhD 阴性患(下转第 1975 页)

截骨术属于一种无需延长前柱的纠正手术，主要用于出现有显著矢状位和冠状位失衡的患者，能够有效避免血管与伸展而引起的相关并发症。同时，这种手术闭合骨面接触比较大，能够有效承受一定压力，稳定性更高。但是这种手术很容易造成硬膜外静脉丛与松质骨面大量出血，在实施过程中应引起足够重视。多节段截骨术主要用于多腰椎后方多个对称关节面进行截骨治疗，并且压缩后柱而制造前凸，该手术不需要破坏椎间盘的结构和前纵韧带。这种手术创伤比较小，并且术中出血量也比较少，重点在于其纠正的度数也比较容易满足患者的临床需要。临床资料显示，临床对于老年脊柱后凸畸形实施多节段截骨术的临床治疗效果达到 80.0％以上，并且术后疼痛也比较小。临床对于该手术治疗的分析，3 种手术临床治疗效果差异无统计学意义。因此，在实施治疗过程中，应有效掌握各种手术适应证，从而提高临床治疗效果[11]。

综上所述，临床中老年脊柱矢状位失衡临床表现多样，影响因素也比较多。临床中可以采取 X 线片与 MRI 进行诊断，且充分考虑其临床表现，从而提高诊断效果。对于老年脊柱矢状位失衡临床中首选保守治疗，对于治疗无效者可采取手术治疗，并且充分了解各种手术适应证，从而提高临床治疗效果。

参考文献

[1] 邱勇. 重视脊柱骨盆矢状面平衡在退变性脊柱畸形治疗中的作用[J]. 中华医学杂志，2013，93(15)：1121-1122.

[2] 朱锋，邱勇，乔军，等. 不对称截骨对退变性腰椎侧后凸畸形躯干失衡的矫形疗效分析[J]. 中国骨与关节杂志，2013，12(10)：551-555.

[3] 王志斌，马迅. 一期后路全椎截骨矫形治疗脊柱侧后凸畸形[J]. 中国实用医刊，2013，40(3)：31-34.

[4] 杨强，李建民，杨志平，等. 全脊椎整块切除术治疗胸腰椎肿瘤及稳定性重建结果[J]. 中华肿瘤杂志，2013，35(3)：225-230.

[5] 刘敏，桂斌捷. 腰椎滑脱患者脊柱矢状面及骨盆排列变化[J]. 安徽医药，2013，17(5)：778-780.

[6] 桑宏勋，雷伟. 成人退行性脊柱侧凸患者矢状位失衡与影响畸形发展的因素[J]. 中国脊柱脊髓杂志，2012，22(3)：200.

[7] 赵耀，李淳德，孙浩林. 脊柱矢状位平衡的影像学参数及分型的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志，2012，22(7)：651-655.

[8] 孙武，仉建国，邱贵兴，等. 前后路与后路半椎体切除术矫治先天性脊柱侧后凸的疗效分析[J]. 中华医学杂志，2012，92(11)：756-759.

[9] Min K，Hahn F，Leonardi M. Lumbar spinal osteotomy for kyphosis in ankylosing spondylitis：the significance of the whole body kyphosis angle[J]. J Spinal Disord Tech，2007，20(2)：149-153.

[10] 曾岩，陈仲强，郭昭庆，等. 强直性脊柱炎后凸畸形的后路截骨矫形术及疗效分析[J]. 中华外科杂志，2010，48(16)：1234-1237.

[11] 李淳德，赵耀，孙浩林. 老年脊柱矢状位失衡的诊断及治疗[J]. 中国脊柱脊髓杂志，2012，22(2)：188-192.

(收稿日期：2013-11-25　修回日期：2014-02-14)

(上接第 1972 页)

者血清学阴性确认及抗体检测的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志，2013，23(6)：1615-1616.

[3] 孙光伟，王厚照. Rh 血型系列抗原检测在输血中的应用[J]. 检验医学与临床，2010，7(19)：2123-2124.

[4] 王明慧. Rh(D)血型筛查实验方法对比分析[J]. 河北医药，2010，32(22)：3233-3234.

[5] 熊立凡. 临床检验基础[M]. 3 版. 北京：人民卫生出版社，2003：73.

[6] 马晓军，李海军，李凌波. Hemotype 全自动血型分析系统在血型鉴定中的应用研究[J]. 四川医学，2012，33(3)：536-538.

[7] 李慧，惠永庆，刘世荣. 微板法血型自动检测技术的应用[J]. 中国输血杂志，1999，12(4)：247-249.

[8] Jones J，Scott ML，Voak D. Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure：criteria for selection of momoclonal anti-D regents for routine typing of patients and donors[J]. Transfus Med，1995，5(3)：171-184.

[9] 吴筱莹，徐红先，熊文，等. 流式细胞术检测弱表达 D 抗原的探讨[J]. 中国实验血液学杂志，2013，21(2)：474-477.

[10] 朱奕，薛俭成. Rh 弱 D 抗原检测的意义[J]. 国际检验医学杂志，2007，28(2)：166-167.

[11] 朱碎永，朱燕英，林甲进. 单克隆 IgM、IgG 混合抗 D 血清在 Del 鉴定中的应用[J]. 临床检验杂志，2007，25(3)：240.

(收稿日期：2013-12-20　修回日期：2014-02-05)

刊误更正

本刊 2014 年 6 月 28 日出版的第 11 卷 12 期 1741 页，由黑龙江佳木斯大学附属第一医院检验科张晓丽、张吉生、王勇、辛华、王凤荣、卞德强、杨军撰写的论文，“医学检验硕士研究生培养模式探讨”一文，由于排印错误将通讯作者和基金项目未作标注。现补充标注如下。1. 基金项目：黑龙江省学位与研究生教育教学改革研究项目(JGXM-HLJ-2012115)，佳木斯大学教学科学研究专项课题(JKA2012-076)。2. 通讯作者，杨军，E-mail：jmszxl@163.com。

特此更正，并谨向作者致歉！

《检验医学与临床》编辑部