

3 种用于确认 RhD 阴性血型方法的应用价值比较

Comparison of application value of three methods for confirmation of RhD negative blood type

金方思¹ 陈静思¹ 裘晓乐¹ 郑婷婷¹ 朱碎永¹

[关键词] RhD 阴性;弱 D 型;抗人球蛋白法;低离子抗人球蛋白法

Key words RhD blood type; weak D; anti-human globulin test; low ion anti-human globulin test

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.02.015

[中图分类号] R446.6 [文献标志码] B

近年来, RhD 变异体的免疫问题越来越引起国人的关注^[1-2], 但目前国内一些医疗单位未对 RhD 初筛阴性患者常规开展 RhD 阴性血型确认工作, 而将 RhD 变异体鉴定为 RhD 阴性。究其原因传统 RhD 阴性血型确认方法使用人源性 IgG 抗 D 血清做间接抗人球蛋白法^[4], 然而目前实验室普遍使用单克隆 IgM 或 IgM/IgG 抗 D 血清, 同时间接抗人球蛋白试验操作繁琐、耗时, 需熟悉免疫血液学的专业人员进行, 从而妨碍了 RhD 阴性血型确认工作的开展。本文使用人源性 IgG 抗 D 间接抗人球蛋白法、单克隆抗 D 吸收试验、单克隆 IgM/IgG 抗 D 低离子抗人球蛋白法对 RhD 初筛阴性标本进行检测, 并比较这 3 种方法用于 RhD 阴性血型确认中的应用价值, 现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源

2017 年 12 月—2019 年 12 月我院 RhD 初筛阴性, 近期末输血患者 101 例, 其中男 38 例, 女 63 例, 平均年龄(26.70±11.25)岁。

1.2 试剂和仪器

单克隆 IgM/IgG 混合抗 D(英国 Millipore 公司), 单克隆 IgM 抗 D(上海血液生物医药有限责任公司), 人源性 IgG 抗 D(珠海贝索生物技术有限公司), O 型 RhD 阳性和阴性红细胞悬液(本室自制, 分别取 3 人份 O 型 RhD 阳性和 O 型 RhD 阴性献血者红细胞洗涤 4 次而成), 广谱抗球蛋白(上海血液生物医药有限责任公司), 低离子抗人球蛋白卡(美国伯乐公司), SSW 型电热恒温水槽(上海博迅实业有限公司), DiMed 37℃ 孵育器和 DiMed 卡式离心机(美国伯乐公司), LC-10C 型低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司), 医用冷藏箱(青岛海尔特种电器有限公司), Olympus 普通光学显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.3 方法

1.3.1 RhD 初筛阴性复核试验 采用常规盐水试管法, 定型试剂分别采用 3 个批号单克隆 IgM

和 3 个批号单克隆 IgM/IgG 抗 D 血清, 操作严格按照各自试剂盒说明书。

1.3.2 45℃ 热放散法 按《全国临床检验操作规程》操作^[3]。

1.3.3 传统 RhD 阴性血型确认法 用人源性 IgG 抗 D 间接抗人球蛋白法, 具体操作按《全国临床检验操作规程》操作^[3]。

1.3.4 吸收试验 RhD 阴性血型确认法 待检标本分别与 3 个批号 IgM 抗 D 血清和 3 个批号 IgM/IgG 抗 D 血清 1 : 1 混合, 分别置 4℃ 冰箱、室温和 37℃ 孵育 1 h 做吸收试验。

1.3.5 单克隆低离子抗人球蛋白 RhD 阴性血型确认法 ①待检样本: 标记低离子抗人球蛋白卡自身对照、试剂 1、试剂 2、试剂 3, 分别加入 1% 患者红细胞悬液 50 μL, 依次加入 9 g/L NaCl 溶液、3 种不同厂家或不同批号的单克隆抗 D 血清各 25 μL; ②阳性对照: 于低离子抗人球蛋白卡中加入 1% O 型 RhD 红细胞悬液 50 μL, 然后加入单克隆抗 D 血清 25 μL; ③阴性对照: 于低离子抗人球蛋白卡中加入 1% O 型 RhD 阴性红细胞悬液 50 μL, 然后加入单克隆抗 D 血清 25 μL。于 37℃ 孵育器中温育 15 min, 将卡转入专用离心机 1024 r/min 离心 10 min, 肉眼观察凝集情况。

1.3.6 RhD 血型判定标准 ①盐水试管法阳性判断为 RhD 阳性。②盐水试管法阴性做间接抗人球蛋白试验: 阴性和自身对照为阴性, 阳性对照为阳性的前提下, 3 个批号抗 D 血清检测均阳性判定为弱 D 型; 3 个批号抗 D 血清结果不一(即 1 种或 2 种阳性)判定为部分 D 型; 3 个批号抗 D 血清检测均阴性判为 RhD 阴性^[3-4]。

2 结果

RhD 阴性检测所有待检标本用 3 个批号单克隆 IgM 抗 D 血清和 3 个批号单克隆 IgM/IgG 抗 D 血清常规盐水试管检测, 结果均为阴性。

传统 RhD 阴性血型确认法将所有待检标本分别和 3 个同批号的人源性 IgG 抗 D 血清做间接抗人球蛋白试验。结果 101 例 RhD 初筛阴性标本中检出 RhD 阴性 81 例, 弱 D 型 15 例, 5 例标本自身对照阳性 RhD 血型不能确认, 见表 1。

¹温州医科大学附属第二医院(浙江温州, 325027)
通信作者: 朱碎永, E-mail: zxy0090@163.com

表 1 101 例 Rh 初筛阴性标本 2 种方法检测结果

例数	传统 RhD 阴性血型确认法			单克隆 IgM/IgG 抗 D 低离子抗人球蛋白法			自身对照
	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgM/IgG ₁	IgM/IgG ₂	IgM/IgG ₃	
1	±	±	±	1+	1+	1+	—
1	±	±	±	1+	1+	1+	—
1	1+	1+	1+	1+	1+	1+	—
1	1+	1+	1+	2+	2+	2+	—
2	1+	1+	1+	2+	2+	2+	—
1	1+	1+	1+	3+	3+	3+	—
1	2+	2+	2+	3+	3+	3+	—
5	2+	2+	2+	3+	3+	3+	—
2	2+	2+	2+	3+	3+	3+	—
81	—	—	—	—	—	—	—
2	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
3	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+

注: IgG₁、IgG₂、IgG₃ 表示 3 种不同批号人源性 IgG 抗 D 血清, IgM/IgG₁、IgM/IgG₂、IgM/IgG₃ 表示 3 种不同批号单克隆 IgM/IgG 抗 D 血清。

吸收试验 RhD 阴性血型确认法对 101 例 RhD 初筛阴性标本使用 IgM 抗 D 血清检测, 98 例阴性, 3 例室温吸收试验阳性, 在其他温度下吸收试验均为阴性; 使用 IgM/IgG 抗 D 血清检测, 96 例阴性, 5 例标本 4℃ 吸收后阳性, 在其他温度下均为阴性。提示单克隆 IgM 和 IgM/IgG 抗 D 血清吸收法检测不能用于 RhD 阴性血型的确认。

单克隆 IgM/IgG 抗 D 低离子抗人球蛋白 RhD 阴性血型确认法将所有待检标本分别和 3 个批号的单克隆 IgM/IgG 抗 D 加入低离子抗球蛋白卡反应腔中做间接抗人球蛋白试验。结果同传统 RhD 阴性血型确认法一致, 101 例 RhD 初筛阴性标本中检出 RhD 阴性 81 例, 弱 D 型 15 例, 5 例标本自身对照阳性 RhD 血型不能确认, 见表 1。

自身对照阳性标本 RhD 血型检测对 5 例用单克隆 IgM/IgG 抗 D 低离子抗人球蛋白法检测自身对照阳性的标本红细胞做 45℃ 放散试验, 放散后取红细胞低离子抗人球蛋白法检测, 阴性者再用入源性 IgG 抗 D 间接抗人球蛋白法和 IgM/IgG 抗 D 低离子抗人球蛋白法检测。结果 3 例标本 2 种方法检测均为阴性, 确认此 3 例标本为 RhD 阴性; 2 例标本用 2 种方法检测均为阳性, 确认为 Rh 弱 D 型。

3 讨论

1995 年 Rouiliac 等人用单克隆抗 D 检测, 表明正常 D 抗原是一个嵌合体结构, 至少有 9 个抗原表位。D 抗原存在变异, 主要表现为 RHD 基因编码区发生碱基变异, 造成编码的 RHD 蛋白氨基酸替换所致 D 抗原表位数目减少的弱 D, 也可表现为

D 抗原表位部分缺失的部分 D。目前 GenBank 已记录百余种弱 D 变异体^[5], 多存在于白人中, 我国近些年也陆续有发现新的弱 D 变异体^[5]。本文用单克隆抗 D 血清常规盐水试管法对临床标本进行检测, 检出 RhD 初筛阴性标本 101 例。对上述标本用人源性 IgG 抗 D 间接抗人球蛋白法进行检测, 发现 15 例标本为弱 D 型, 5 例标本不能确认。可见, 对 RhD 初筛阴性标本必须进行 RhD 阴性血型确认试验。

由于人源性 IgG 抗 D 来源困难, 抗人球蛋白法操作繁琐、耗时, 以至于传统 RhD 阴性血型确认法不便于开展, 本文采用来源广泛的单克隆 IgM 和 IgM/IgG 抗 D 血清在各种条件和介质中对 RhD 初筛阴性的标本进行检测比较。结果 101 例 RhD 初筛阴性标本用单克隆 IgM 和 IgM/IgG 抗 D 血清做吸收试验(4℃、室温、37℃), 2 种单克隆抗 D 血清仅检出小部分弱 D 型(单克隆 IgM 抗 D 检出 3 例、单克隆 IgM/IgG 抗 D 检出 5 例), 而将大部分弱 D 型鉴定为 RhD 阴性, 因此不能用于 RhD 阴性血型确认试验; 用单克隆 IgM/IgG 抗 D 低离子抗人球蛋白法检测, 检出弱 D 型 15 例, 5 例标本自身对照阳性不能确认, 同人源性 IgG 抗 D 间接抗人球蛋白法结果一致。另外, 直接抗人球蛋白试验阳性可致 RhD 阴性血型确认试验自身对照阳性, 直接影响检测结果, 须去除红细胞上的致敏 IgG 抗体或 C₃d, 才能做 RhD 阴性血型确认试验。本文 5 例自身对照阳性不能确认 RhD 血型的标本, 经 45℃ 热放散后, 用人源性 IgG 抗 D 抗人球蛋白法和 IgM/IgG 抗 D 低离子抗人球蛋白法检测, 3 例标本为 RhD 阴性, 2 例标本为弱 D 型。

综上所述, 3 种确认 RhD 阴性血型方法中, 单克隆 IgM/IgG 抗 D 低离子抗人球蛋白法试剂来源广泛、操作简便, 可代替传统 RhD 阴性血型确认法用于 RhD 阴性血型的确认。同时注意, 直接抗人球蛋白试验阳性会影响 RhD 阴性血型的检测结果, 须去除红细胞上的致敏 IgG 抗体和 C₃d 使其直接抗球蛋白试验阴性后再检测。

参考文献

[1] 曾化峰. 56 例初筛 RhD 阴性患者血清学阴性确认及抗体检测的临床价值[J]. 吉林医学, 2014, (15): 3293-3293.
 [2] 杨琳, 张勇萍, 杨世明, 等. RhD 初筛阴性患者 Du 型、Del 型及 CE 表型的血清学检测分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(7): 640-642.
 [3] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 中华人民共和国卫生部医政司, 2015: 124-137.
 [4] 孙禾, 谢作听, 洪俊英. RhD 初筛阴性患者 RhD 变异体检测分析[J]. 现代实用医学, 2015, 27(1): 47-48.
 [5] 贺玉蕾, 俞露, 许德义, 等. 新的 Rh 血型弱 D 变异体一例[J]. 中华医学遗传学杂志, 2019, 36(7): 731-733.

(收稿日期: 2020-06-22)