

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—2024

大熊猫血液交叉配血技术规范

Technical specification of blood cross-matching test for giant panda

征求意见稿

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA

目 录

目 录..... I

前 言..... II

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

4 样本、材料与设备..... 2

5 操作方法..... 3

6 结果判定..... 5

附 录 A （交叉配血实验离心条件）（规范性）..... 6

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由上海市血液中心提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

大熊猫血液交叉配血试验技术规范

1 范围

本文件规定了大熊猫输血前交叉配血所需的样本和材料、操作方法以及结果判定。
本文件适用于大熊猫输血前交叉配血实验操作及结果判定。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 凝集 Agglutination

抗体分子在相邻的红细胞表面抗原或结合其上的免疫球蛋白之间搭桥，使之形成肉眼可见的凝集团块。

3.2 滴 Drop

以滴管加样时，以“滴”为单位，1滴约等于 $50\mu\text{l}$ 。实际操作中，可以使用 $50\mu\text{l}$ 代替1滴。

3.3 检测标识 Detection identification

用于和特定检测过程关联，可标记样本类别、检测方法、序列号等，或者以上信息的缩略形式。要求检测标识与特定试验过程有明确的对应关系，且不易与试验过程中同时存在的其它检测标识混淆。

3.4 红细胞悬液 Red blood cell suspension

血型血清学实验默采用 2%-5%浓度的红细胞生理盐水悬液。

3.5 交叉培训实验 Cross-matching test

通过体外免疫血清学实验，检查供血个体和受血个体的血液是否配合，预判输注后是否存在抗原-抗体反应诱发的免疫风险，是确定能否输血的重要依据。

3.6 盐水交叉配血 IS crossmatch

指采用红细胞悬液与血浆在盐水介质中进行检测，该实验用于体外检测红细胞与天然血型抗体在体外是否发生反应。

3.7 抗球蛋白介质交叉配血 AHG crossmatch

指采用间接抗球蛋白试验 indirect antiglobulin test; IAT (或称间接库姆氏试验 Indirect Coombs' test)

该实验需用抗大熊猫免疫球蛋白试剂, 来检测红细胞与抗体在体外是否发生反应。

3.8 聚凝胺介质交叉配血 Polybrene crossmatch

指利用聚凝胺介质, 在缺乏抗球蛋白情况下, 对非直接凝集抗体进行检测。

3.9 细胞扣 Cell clot

红细胞悬液在试管中经离心后, 在试管底部聚集成圆形并黏附于试管壁上。这种形态的红细胞, 在试验中称为细胞扣。

4 样本、材料与设备

4.1 样本类型

实验样本包括大熊猫受血个体和献血个体的EDTA抗凝或未抗凝全血。

4.1.1 红细胞悬液

4.1.1.1 原理

用 0.9%的生理盐水将压积红细胞配制成 2%~5%。

由于压积红细胞中大约含有 10%的细胞间液, 因此在使用压积红细胞配制特定浓度的红细胞悬液时, 应将压积红细胞体积 $\times 0.9$ 后算作红细胞近似体积。

4.1.1.2 红细胞压积

红细胞样本经充分离心后, 尽量去除上清液, 形成压积红细胞。

4.1.1.3 特殊情况

少量红细胞, 在普通试管内无法制成压积红细胞。在对浓度精确性要求不高时, 可以通过肉眼比对的方法, 与已知浓度红细胞比较, 制成接近目标浓度的红细胞悬液。

4.1.1.4 方法的局限性

由于压积过程受到离心力, 红细胞量的大小, 去除上清液的彻底程度, 细胞间液体的类型等诸多因素影响, 因此通过压积红细胞稀释法获得的特定浓度红细胞具有一定误差。

4.1.2 血清

4.1.2.1 原理

非抗凝全血在血液凝固后, 血清成分会析出, 血清中含有血型抗体。

采用新鲜非抗凝全血, 静置 30min 或至无流动血液相时, 采用离心方法, 获得上清即为血清。

4.1.2.2 特殊情况

如血清出现溶血或浑浊, 应考虑污染等因素, 应再次采血观察。

4.2 材料与设备

生理盐水、一次性吸管、微量移液器、离心试管、低速离心机、恒温水浴箱、计时器、载玻片、盖玻片、微柱凝胶卡。

4.3 抗球试剂与聚凝胺试剂

抗球试剂可通过免疫纯化获得，聚凝胺试剂可采用商品化试剂

5 操作方法

5.1 主侧交叉配血

5.1.1 盐水介质主侧交叉配血

- 试验步骤 取试管做好标识后，分别滴加受血动物的血清 2 滴，再滴加供血动物红的细胞悬液 1 滴，直接离心观察结果。
- 结果判读 自身对照为阴性时，红细胞出现肉眼可见凝集为阳性结果，反之为阴性结果；凝集强度判断参见表 1，自身对照为阳性时，应排除干扰后继续实验。
- 特殊情况 某些盐水反应性抗体需要在特殊的条件下才能和红细胞发生反应，例如 4℃ 放置 10min、37℃ 放置 10min 等。
- 方法的局限性 大部分 IgG 类血型抗体无法用盐水法检出。

5.1.2 抗球蛋白介质主侧交叉配血

- 试验步骤 采用盐水法对主侧待配血标本进行实验，如果阴性则继续试验；如果阳性，需分析原因排除干扰后方可继续试验；置 37℃ 水浴箱孵育 30 分钟，用生理盐水洗涤实验试管三次，末次离心后用吸水纸扣干管口残余液体。在各管中加抗球蛋白试剂各 1 滴，混匀离心，肉眼判断红细胞凝集情况（微柱凝胶方法按照厂商标准操作进行）。
- 结果判读 红细胞出现肉眼可见凝集为阳性结果，反之为阴性结果。
- 特殊情况 该实验应设置对照管（具体方法见附录），如对照管结果为阳性，则需处理样本去除干扰后方可继续实验。
- 方法的局限性 对于一些弱抗体可能在抗球蛋白介质反应性不强，宜结合多种检查方法，以减少抗体的漏检。

5.1.3 聚凝胺主侧交叉配血

- 试验步骤 采用盐水法对主侧待配血标本进行实验，如果阴性则继续试验；如果阳性，需分析原因排除干扰后方可继续试验；每管中加 0.6ml 或 10 滴低离子介质溶液在室温放置 1 分钟，每管加入 2 滴聚凝胺试剂，立即以 1000g 离心 1 分钟，弃去试管中液体，摇动试管，肉眼判断红细胞凝集情况。如果有凝集则继续操作；如无凝集出现则该试验无效。加入 1 滴重悬液，轻摇试管，肉眼观察结果。
- 结果判读 阴性、阳性质控管与试验管平行观察结果，当阴性质控管（自身对照）阴性，同时阳性质控管凝集达到 ± 或 1+ 时，观察试验管反应，红细胞凝集为阳性结果，红细胞不凝集为阴性结果（微柱凝胶方法按照厂商标准操作进行）。
- 特殊情况 当血清/血浆中存在肝素或止血敏等药物时，可能导致聚凝胺试剂的失效；对于多凝集细胞，可能无法在聚凝胺作用下出现凝集反应。
- 方法的局限性 轻摇看结果时，操作者经验不足可能会导致试验结果出现假阳性和假阴性，需加做平行对照试验；部分血型系统抗体可能出现漏检。

5.2 次侧交叉配血

5.2.1 盐水介质次侧交叉配血

- 试验步骤 取试管做好标识后，分别滴加供血动物的血清 2 滴，再滴加受血动物红的细胞悬液 1 滴，直接离心观察结果。
- 结果判读 自身对照为阴性时，红细胞出现肉眼可见凝集为阳性结果，反之为阴性结果；凝集强度判断参见表 1，自身对照为阳性时，应排除干扰后继续实验。
- 特殊情况 某些盐水反应性抗体需要在特殊的条件下才能和红细胞发生反应，例如 4℃ 放置 10min、37℃ 放置 10min 等。
- 方法的局限性 大部分 IgG 类血型抗体无法用盐水法检出。

5.2.2 抗球蛋白介质次侧交叉配血

- 试验步骤 采用盐水法对次侧待配血标本进行实验，如果阴性则继续试验；如果阳性，需分析原因排除干扰后方可继续试验；置 37℃ 水浴箱孵育 30 分钟，用生理盐水洗涤实验试管三次，末次离心后用吸水纸扣干管口残余液体。在各管中加抗球蛋白试剂各 1 滴，混匀离心，肉眼判断红细胞凝集情况。
- 结果判读 红细胞出现肉眼可见凝集为阳性结果，反之为阴性结果。
- 特殊情况 该实验应设置对照管（具体方法见附录），如对照管结果为阳性，则需处理样本去除干扰后方可继续实验。
- 方法的局限性 对于一些弱抗体可能在抗球蛋白介质反应性不强，宜结合多种检查方法，以减少抗体的漏检。

5.2.3 聚凝胺次侧交叉配血

- 试验步骤 采用盐水法对主侧待配血标本进行实验，如果阴性则继续试验；如果阳性，需分析原因排除干扰后方可继续试验；每管中加 0.6ml 或 10 滴低离子介质溶液在室温放置 1 分钟，每管加入 2 滴聚凝胺试剂，立即以 1000g 离心 1 分钟，弃去试管中液体，摇动试管，肉眼判断红细胞凝集情况。如果有凝集则继续操作；如无凝集出现则该试验无效。加入 1 滴重悬液，轻摇试管，肉眼观察结果。
- 结果判读 阴性、阳性质控管与试验管平行观察结果，当阴性质控管（自身对照）阴性，同时阳性质控管凝集达到 ± 或 1+ 时，观察试验管反应，红细胞凝集为阳性结果，红细胞不凝集为阴性结果。
- 特殊情况 当样本中存在肝素或止血敏等药物时，可能导致聚凝胺试剂的失效；对于多凝集细胞，可能无法在聚凝胺作用下出现凝集反应。
- 方法的局限性 轻摇看结果时，操作者经验不足可能会导致试验结果出现假阳性和假阴性，需加做平行对照试验；部分血型系统抗体可能出现漏检。

5.3 对照试验

5.3.1 盐水介质实验对照

盐水法交叉配血实验，应采用自身血清与自身红细胞作为自身对照，整体实验应设置阳性实验孔（可用自制阳性对照或商品化试剂作为阳性实验）。

5.3.2 抗球蛋白介质实验对照。

抗球蛋白介质配血实验，应采用自身血清与自身红细胞作为自身对照，整体实验应设置阳性实验孔（可用自制阳性对照或商品化试剂作为阳性实验）。

5.3.3 聚凝胺介质实验对照

聚凝胶介质配血实验，应采用自身血清与自身红细胞作为自身对照，应采用自制试剂设置为弱阳性对照。

6 结果判定

6.1 判断总则

交叉配血实验一般在试管中进行，还可对弱凝集结果进行显微镜观察；此外，也可利用微柱凝胶方法进行实验。

6.2 试管方法结果判定

6.2.1 操作

- 试管位置 转动试管，使细胞扣朝向判读者；
- 轻摇 轻柔摇动试管，使试管中液体反复冲刷细胞扣上缘，直至细胞扣完全或大部分脱离试管壁；
- 振摇 经轻摇确定阳性后，用力摇动试管 2 秒左右，以判定凝块的结实程度。

6.2.2 判读

- 阴性与阳性结果 轻摇时发现肉眼可见的红细胞凝块从细胞扣上边缘脱落，或整个细胞扣整体从试管壁脱落，为阳性结果；轻摇至细胞扣消失，未见肉眼可见红细胞凝块从细胞扣上边缘脱落，为阴性结果。
- 不同凝集强度的判读，详见表 1。

表 1 试管法凝集强度判读表

轻摇结果	振摇结果	凝集强度
细胞扣脱落成 1 个凝块，底液清澈	细胞凝块未散开，底液清澈	4+
细胞扣脱落形成 1 个或多个凝块，底液清澈	形成多个细胞凝块，底液清澈	3+
细胞扣脱落形成 1 个或多个凝块，底液清澈	形成多个细胞凝块，底液浑浊	2+
细胞扣脱落形成多个凝块，底液浑浊	细胞凝块肉眼可见	1+
细胞扣脱落形成多个凝块，底液浑浊	细胞凝块肉眼不可见	±
红细胞从细胞扣上缘均匀滑落，直至细胞扣消失	/	0

6.3 其他结果判定

如在配血实验中，出现溶血现象（观察到上清呈淡粉色至红色，表明发生溶血），应判定为阳性。显微镜下如观察到不规则凝集，并排除缗钱状蛋白凝集后，应判定为阳性。凝胶卡结果判定应参考相关试剂生产厂商规定标准。

附录 A

交叉配血实验离心条件

- A.1 红细胞悬液制备离心条件：离心应采用 $1000\times g$ ，1min离心
 - A.2 血清制备离心条件：离心应采用 $1000\times g$ ，5min离心
 - A.3 盐水法及抗球法观察结果离心条件：离心应采用 $1000\times g$ ，15s离心
-