血型相容性检测–免疫生物学创新技术

Blood Group Compatibility Tests

Innovative Immunobiology Assays

李　勇

医学博士　　　研究员

中国科学院苏州生物医学工程技术研究所

Li Yong. MD. PhD Professor
Suzhou Institute of Biological Engineering and Technology, Chinese Academy of Scences

1. 血型相容实验技术概述

2. 红细胞膜血型抗原磁珠试剂及应用

3. 非细胞性Miltenberger血型抗原及应用

4. 血小板抗原抗体-磁珠化学发光免疫层析技术检测

Simplified Content of Compatibility Tests

血型相容性实验
compatibility tests

Transfusion
RBC
Plt

Transplantation
Bone Marrow
Solid organ
……

recipient

donor

Three Procedure

Grouping
(Ag / genotyping)

Antibody Test
(screening
and
Identification)

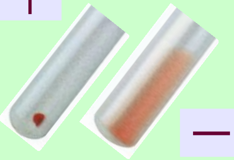
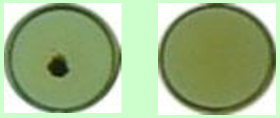
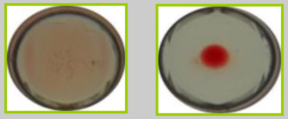
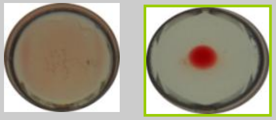
Crossmatching

Category of Ab tests

Agg tests :
Complete
/ Incomplete
Ab Tests

Modern
Physics /
chemistry
(magnetic /
Optical /
Eletric /
acoustic wave…)
+
Immuno-tagging

Pattern of Current RBC Serology Tests

	Test tube	Tile (glass\paper)	Microwell	Microwell (HDM)	Microtube Gel
Agglutinate tests	+  −	+ −	+ − 		
Solid phase RBC adherence assays			+ − 	+ − 	
Gel Tests					+ −

Different Red Cell Antigens Currently

		Fresh whole RBC	RBC Ghost	Soluble cell membrane Ag	EMAMP	Synthetic peptide
Agglutinate tests		√			√	√
Solid phase RBC adherence assays		√	√	√	√	
Gel Tests	Direct	√				√
	AHG	√		√		√

Longstanding problems of the immunoassays on blood group compatibility

Longstanding problems	Solutions
红细胞溶解-细胞膜抗原消失，各种保存液和冷冻条件保存红细胞不能解决红细胞必然要溶解的根本问题。临床上稀有细胞的保存，ＡＢＯ高效价抗体检测和反定型检测，血型检测标准化等具体问题难以解决的瓶颈所在。	红细胞膜抗原磁珠（Erythrocyte Membrane Antigen Magnetic Bead，EMAMB)
细胞膜抗原检测非特异性反应，目前（１）各种封闭（空白位点）方法，封闭不理想，免疫标记技术没能取代ＨＴ；（２）细胞膜溶解，分离抗原－抗体复合物，但膜结构蛋白性质抗原，细胞溶解，抗原性受损，至少是分离程序复杂、时间长，限制应用，如ＭＡＩＰＡ。	双相免疫化学发光检测 免疫层析荧光检测技术
基因检测，必须核酸扩增（ＰＣＲ），各种核酸扩增技术的进步，但实验成本增高，实验程序复杂性和技术要求增加，不能满足临床医学的急需，如妊妇外周血中胎儿核酸检测，各种遗传性疾病的检测。	压电声波磁珠免疫分析技术-核酸非扩增分析
试管Coombs 没能临床常规应用，MGIA只用于红细胞血型检测。不完全抗体的检测，实质上不完全抗体不只是红细胞血型抗体，其他血液细胞抗体、病原微生物抗体、TAA抗体等都存在小分子抗体，不容易发生直接凝集反应。	MGIA-间接凝集 -化学发光免疫分析

1. 血型相容实验技术概述

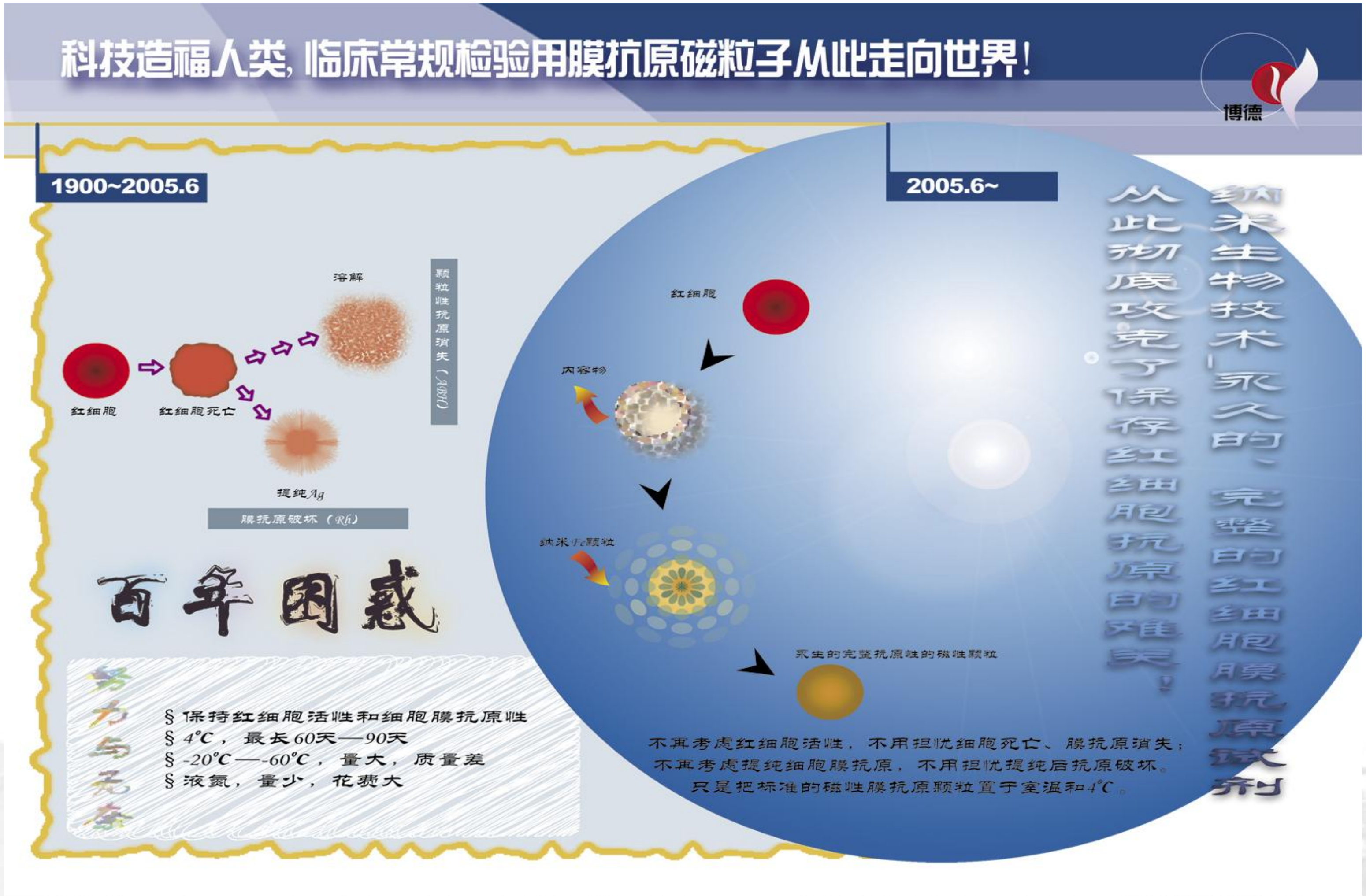
2. 红细胞膜血型抗原磁珠试剂及应用

3. 非细胞性**Multenberger**血型抗原及应用

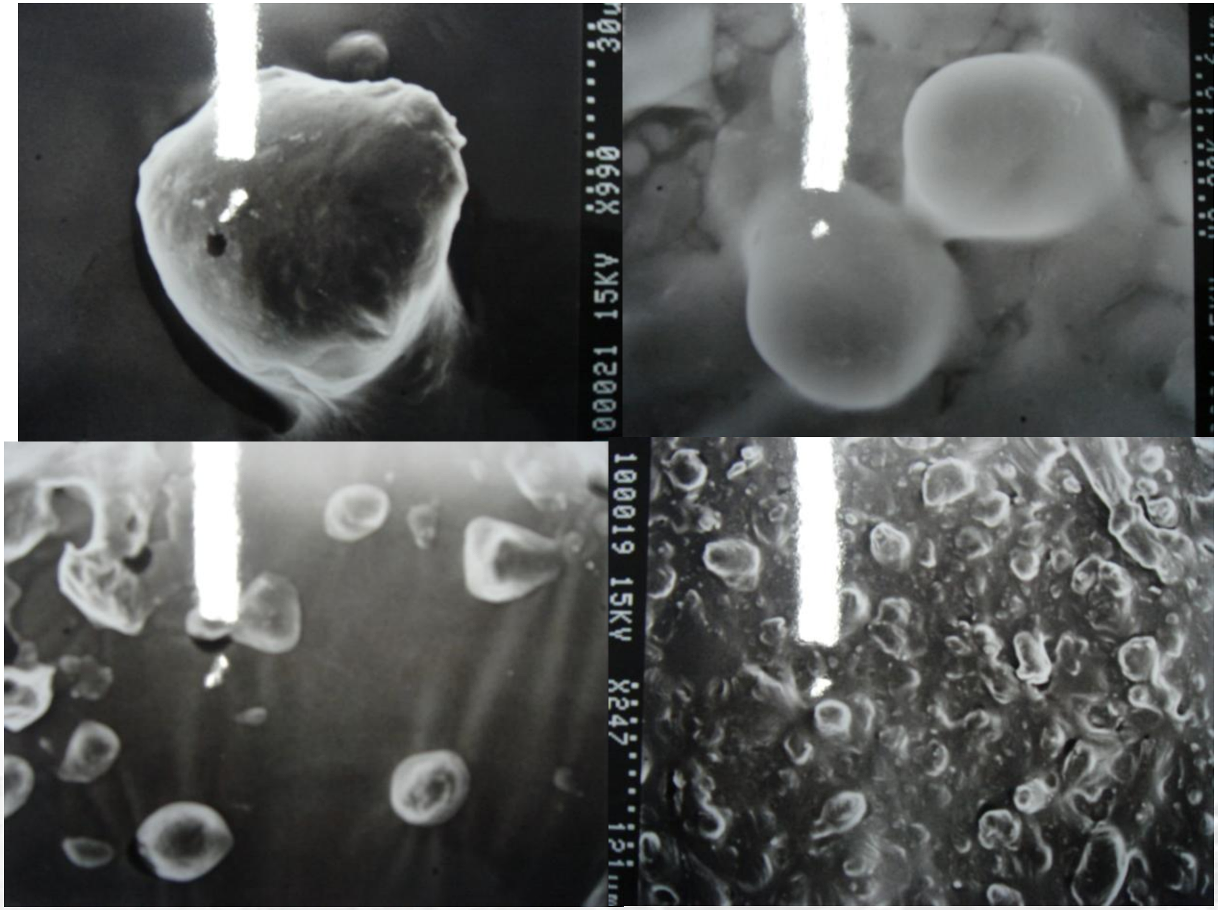
4. 血小板抗原抗体-磁珠化学发光免疫层析技术检测

Erythrocyte Membrane Antigen Magnetic Particles

The content of fresh RBC is replaced with iron-nano particle

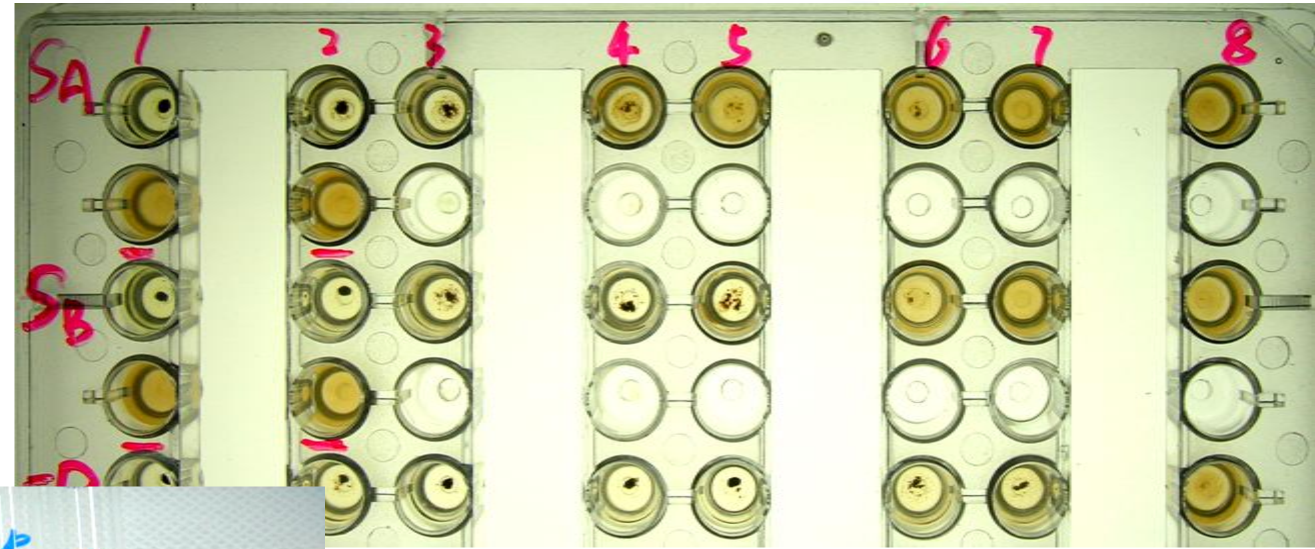


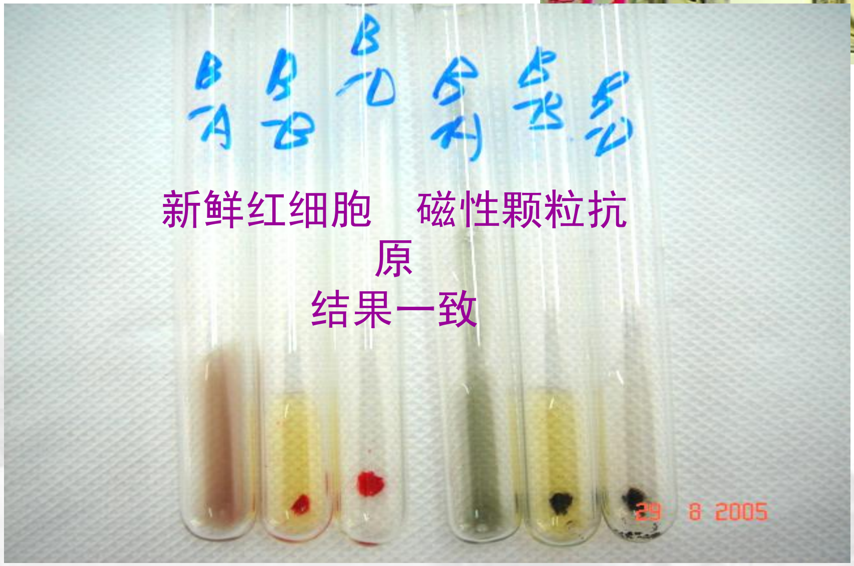
Scann-electric Micro-Photos of RBC Membrane Antigen Magnetic Beads



The Intact Antigen of EMAMB

Agglutination results with tube test on both fresh RBC and erythrocyte membrane antigen magnetic beads





Agglutination results with the 96-well test on EMAMB

Erythrocyte Membrane Antigen Magnetic Particles (EMAMP)

Longstanding Problems

① Heamolysis of the Reagent Red Cells within a few weeks.
② Antigens are destroyed after purification from cell membrane.
③ No standard RBC group antigens

EMAMP Properties

① RBC membrane antigen intact, Lyophilized, eternally keep in RT
② Production in an industrial scale.

Signification and advantage

① A milestone in immunoassays on cell membrane
② No need to purify cell membrane Ag.
③ No need to preserve the cell in cool and cold temperature.
④ immunoassays on cell much easier and more standard.

Application

① High titre ABO antibody test（ QC on blood products ），
② Preserve rare group antigens eternally，
③ Affinity purification of antibodies ,such as AHG，
④ Establishment of standard of 。

1. 血型相容实验技术概述

2. 红细胞膜血型抗原磁珠试剂及应用

3. **非细胞性Miltenberger血型抗原及应用**

4. 血小板抗原抗体-磁珠化学发光免疫层析技术检测

非细胞型 Miltenberger 血型（Mur）血型抗原研究

Miltenberger血型：MNS血型亚系统该亚系统，其中Mur、Mil等抗原发生频率在欧洲白人低于千分之一；中国人和亚洲人中为3%～10%；人血液中抗-Mur的发生频率甚至是仅次于抗-A/抗-B（免疫抗体和自然发生的抗体）。

抗-Mur抗体会导致同种异型免疫性疾病，如输血不良反应、新生儿溶血病、器官移植排异反应等；

对中国人、亚洲人，Miltenberger血型临床意义比Rh血型重要,仅次于ABO血型重要；

血型抗体筛查红细胞、鉴定谱细胞应该有Mur抗原阳性红细胞。

目前抗体检测中面临的几个主要问题是:

1）由于临床检测谱细胞中未使用Mur筛选红细胞，该不规则抗体经常漏检；

2）含有稀有抗原的筛选红细胞的稳定供应得不到长期保证；

3）新鲜红细胞保存时间极短。

如何解决这样几个难题?

合成多肽-实验方法？

澳大利亚CSL公司利用Kode技术，将合成的多肽抗原（Mur和Mut）连接到红细胞上，制备得到筛检抗-Mur的红细胞（已经商业化）。仍然是基于存活的红细胞的血型抗原试剂，根本问题并没有得到解决，红细胞膜上的血型抗原，红细胞容易溶血，抗原性也随之消亡；此外只有Mur抗原，无该亚系列其他抗原。

本课题组创新性地初步研制成功“非依赖存活红细胞的Mur等血型抗原特异性的抗体检测技术和相应试剂。

目前除澳大利亚该相关研究，没有查到国际上和我国其他人有同样研究工作和技术路线的研究报道和信息。

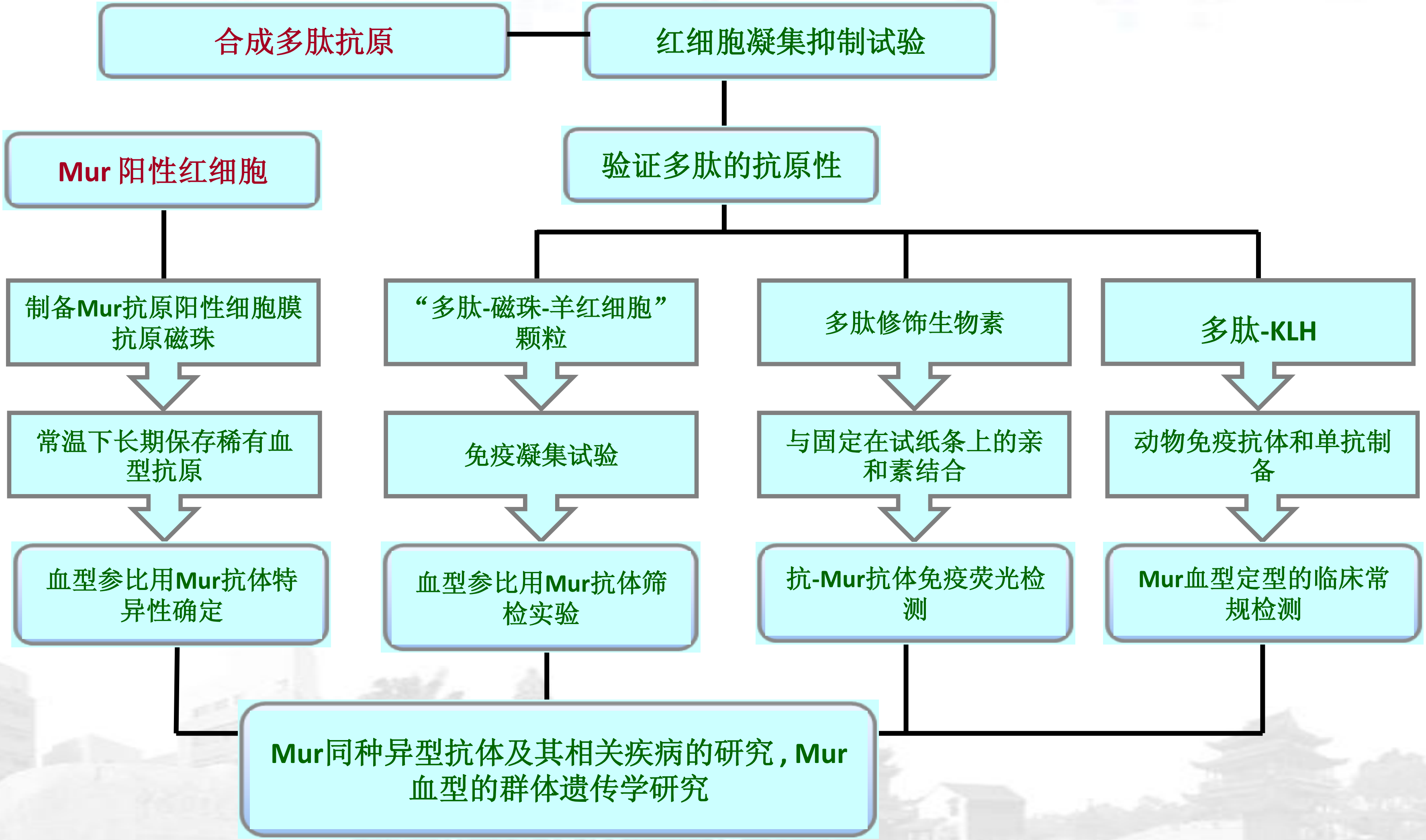
1. 血型相容实验技术概述

2. 红细胞膜血型抗原磁珠试剂及应用

3. 非细胞性Miltenberger血型抗原及应用

4. 血小板抗原抗体-磁珠化学发光免疫层析技术检测

Mur Group Project proposal

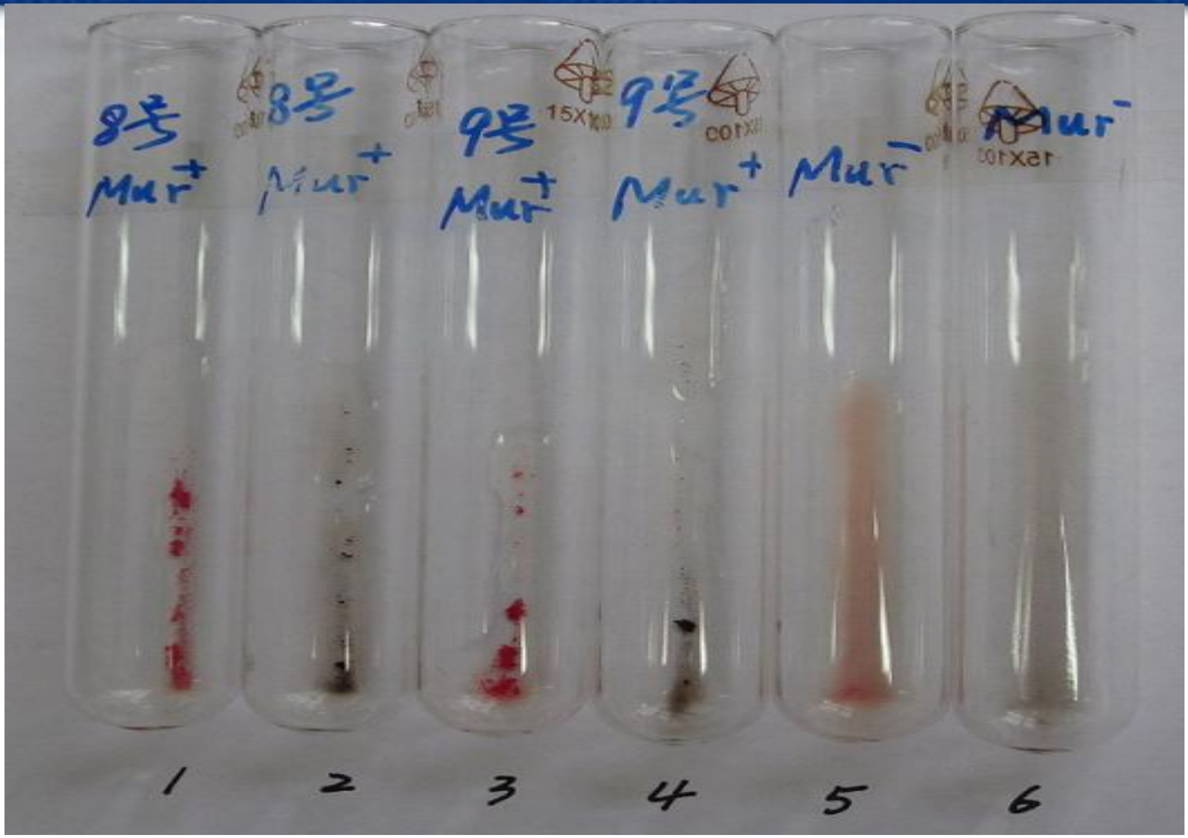


研 究 内 容

1、非细胞型红细胞Mur血型抗原纳米磁珠试剂

（1）制备Mur抗原包被的纳米磁珠，连接化学发光物质，进行免疫荧光免疫反应，对Mur抗体定性和定量反应；

（2）Mur抗原纳米磁珠连接生物颗粒，制备大小略等于红细胞的“人工筛查细胞”，可以替代阳性红细胞，进行免疫凝集分析（定性检测）。



	Mur+ (8号)		Mur+ (9号)		Mur-	
	新鲜红细胞	膜抗原磁珠	新鲜红细胞	膜抗原磁珠	新鲜红细胞	膜抗原磁珠
与抗-Mur反应结果	3+	2+	3+	3+	-	-

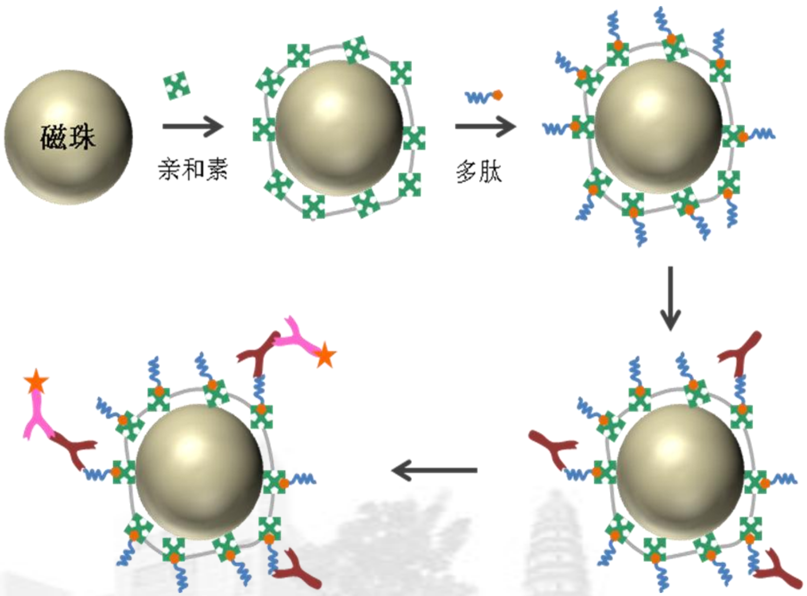
拟采取的研究方法、技术路线

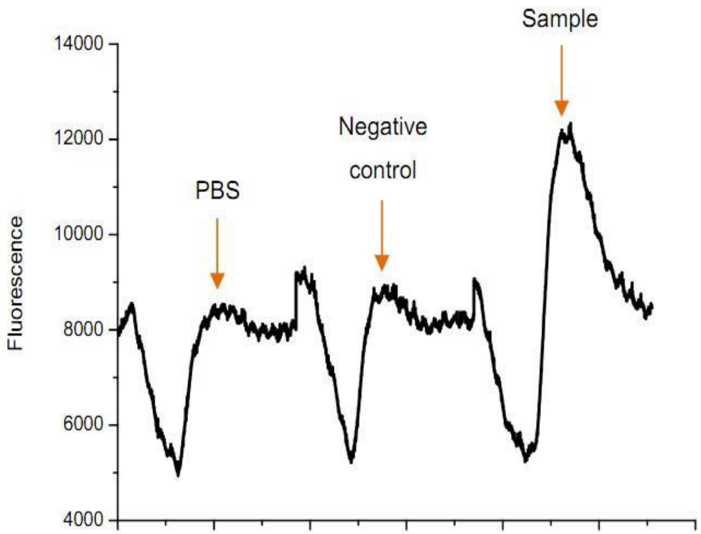
非细胞型红细胞Miltenberger抗原纳米磁珠试剂

（1）红细胞凝集抑制试验：确证多肽Mur特异性

（2）抗体的免疫荧光检测：同时定量和定性、结果更客观

图. Mur抗体免疫荧光检测示意图





血小板抗原抗体反应纳米磁珠化学发光免疫分析技术(试剂和设备仪器) 研发必要性

临床上最为常见的血小板减少症及相关疾病有：胎母血小板血型不相容性血小板减少症、原发性自身免疫性血小板减少症、自身免疫性疾病继发性血小板减少症、药物型免疫性血小板减少症，以及其它很多种类疾病（如白血病）。

患者输注血小板前进行交叉配型，输血有效率大于90%（重症患者＞70%），随机选择（仅ABO同型相容）的血小板输血有效率低于30%！病人体内生成血小板抗体，即浪费了宝贵血液，导致输注无效，病人也几乎无例外地病情加重。目前在我国以及世界上绝大多数国家是随机血小板输血。只有极少数医疗单位常规检测血小板抗原抗体，其直接原因是缺少简单、高效、准确、价廉以及实用的血小板抗原抗体检测免疫学试验技术。

在英国、法国和美国等少数发达国家，应用昂贵的试验程序繁杂的HLA和血小板基因检测技术进行全系列谱抗原基因定型，血小板献血员库的献血员。

本研究团队改进SPRCA实验技术，同时研究创新性的试验技术-血小板抗原抗体反应纳米磁珠化学发光免疫分析技术，应用现代光磁电技术的免疫学检验新技术：高敏感性、高特异性，结果客观、数字图像化显示，试验程序简单，试剂和设备仪器价格合理。

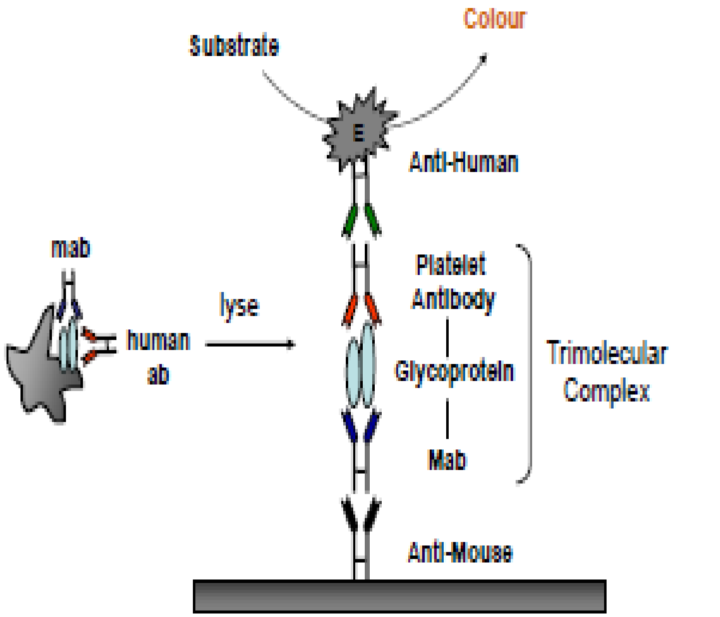
血小板相容性检测

Platelet compatibility tests

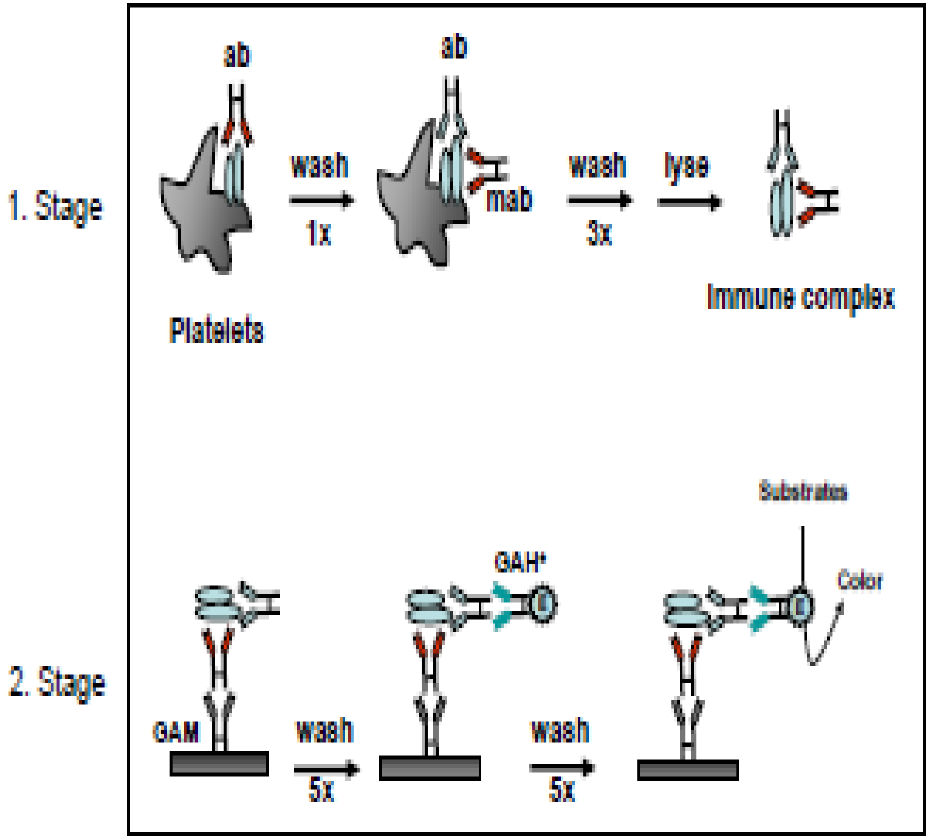
Platelet compatibility tests

- **Genotyping**
  - Platelet bank establishment
    - HLA degree matching
    - HPA matching
    - HLA/HPA ASP
- **Ab tests**
  - Diseases Diagnostic
    - Allo/iso/auto-immune refractory
    - NAIT/PTP/AITP patients
- **Crossmatch**
  - Donors selection
    - Reducing and delay PTR

单克隆抗体固着血小板抗原分析
（MAIPA）



Kiefel et al, Blood 19



Kiefel et al, Blood 1987

单克隆抗体固着血小板抗原分析（MAIPA）

◆优点：

特异性检测HPA抗体，使得人们在近几年发现了许多新的血小板特异性抗原。

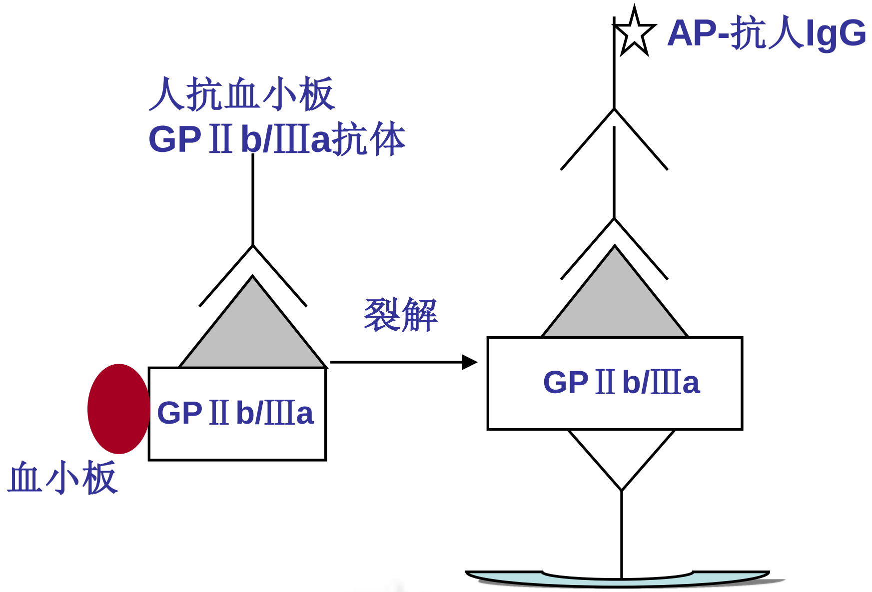
◆缺点：

➢若待检血清中抗血小板抗体与鼠单克隆抗体识别的是同一抗原决定簇，它们将竞争性结合抗原位点而易出现假阴性反应。

➢血小板裂解过程中，可能破坏血小板糖蛋白抗原性，特别是对HPA-3a/HPA-15破坏较大，使其抗原性大大减弱，容易造成漏检。

➢该方法操作时间长（约8h），技术要求高，各个实验室的检测结果差异较大等不足也限制了其在临床上的应用。

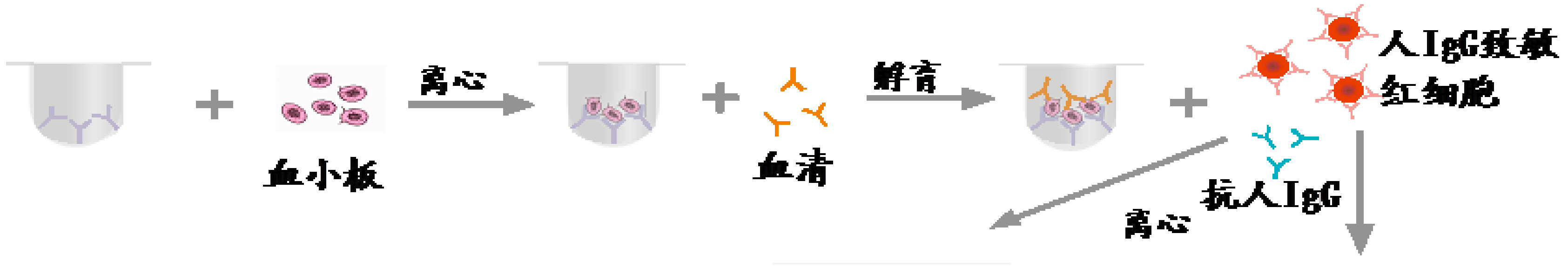
修饰的抗原捕获ELISA分析(MACE)

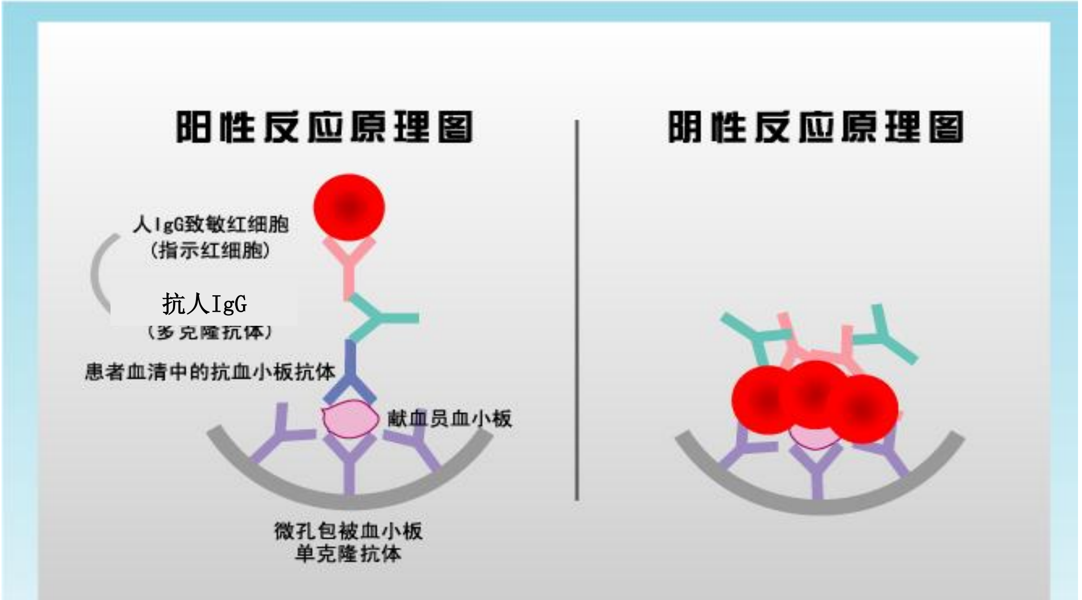


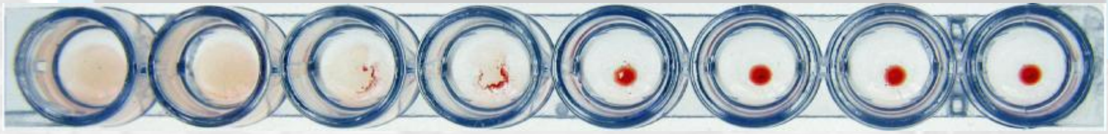
优点：可定量检测血清中的血小板特异性抗体。

缺点：需要将人血清抗体致敏的血小板裂解，裂解后的血小板膜糖蛋白构象表位会发生变化而不能与微孔中的鼠抗血小板糖蛋白单克隆抗体结合，因此导致其抗体检出率降低。

3.1 固相红细胞黏附实验技术







优点：

➢快速简便，应用于临床血小板交叉配血；

➢已知基因型血小板，应用于HPA抗体筛检。

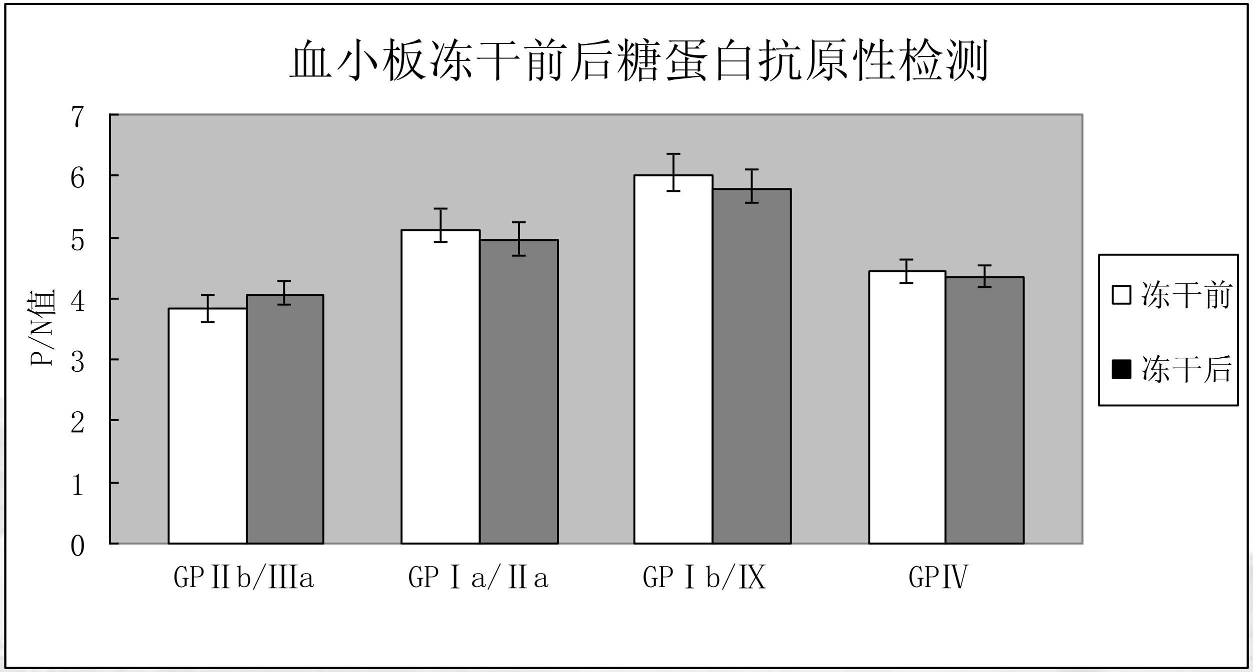
缺点：

➢一套试剂中两种不同有效期成分，指示红细胞有效期只有数周，其他部分有效期为一年；

➢实验技术要求高，肉眼观察结果，弱阳性抗体反应格局不易判断，受主观因素影响。

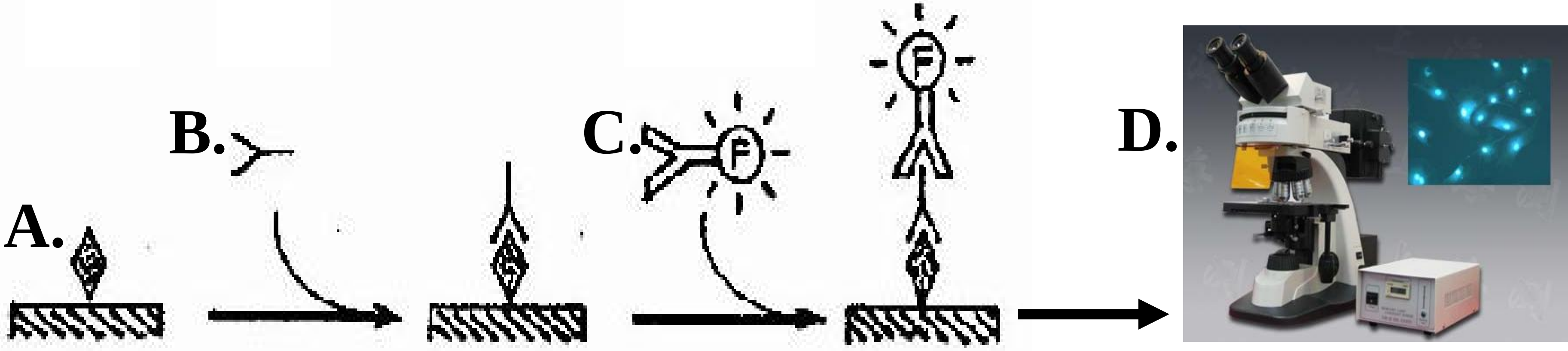
冻干型血小板抗体检测细胞

	HPA-1	HPA-2	HPA-3	HPA-4	HPA-5	HPA-15
C1	1aa	2aa	3aa	4ab	5aa	15bb
C2	1ab	2aa	3aa	4aa	5ab	15aa
C3	1aa	2ab	3bb	4aa	5aa	15aa



◆通过间接ELISA法采用特异性单克隆抗体检测血小板抗体筛检细胞冻干前后糖蛋白Ⅱb/Ⅲa、Ⅰa/Ⅱa、Ⅰb/Ⅸ、Ⅳ的抗原性变化是否显著，同时用无关单抗作为对照。以P/N值（特异性糖蛋白单抗检测值/无关单抗检测值）作为衡量抗原性的指标绘制柱形图，结果表明血小板冻干前后上述糖蛋白抗原性差异无统计学意义（P>0.05）。

血小板抗体检测方法—荧光法



A: 血小板

B: 血清中血小板抗体

C: 荧光标记抗人IgG抗体

D: 荧光显微镜/流式细胞仪

血小板抗原抗体检测-创新性免疫分析技术
Innovative immunoassays for Plt Ag-Ab reaction

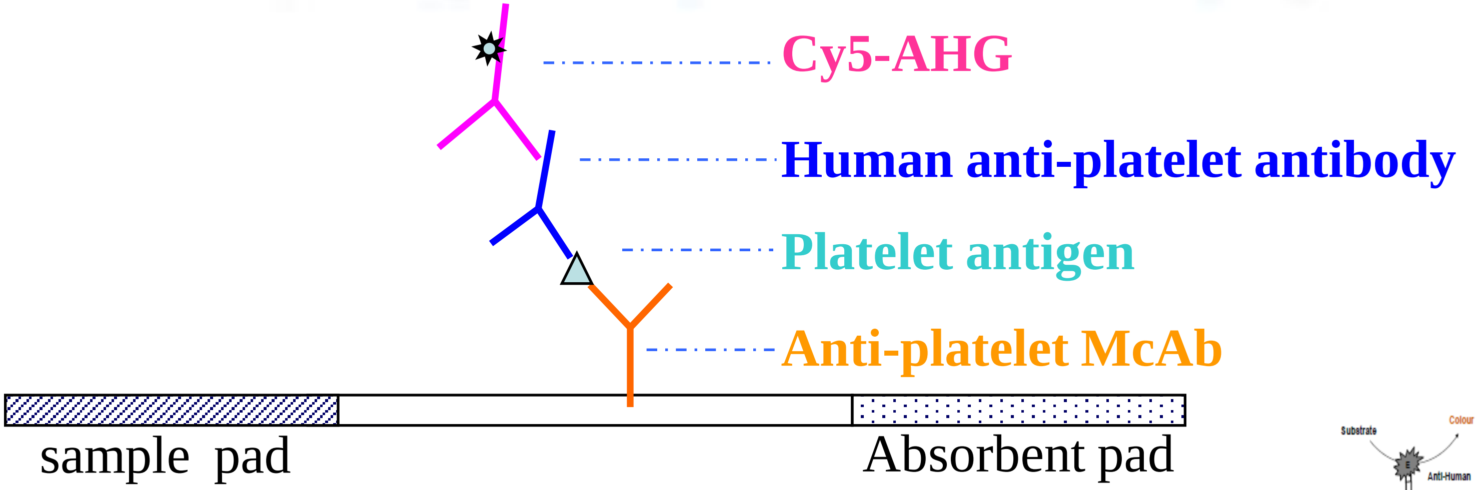
1、免疫层析荧光检测技术
Chromatography Fluorescence Immunoassay （CFIA）

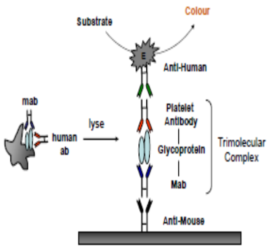
2、化学发光免疫分析技术
Chemical-luminescent Immunoassay （CLIA）

3、CD36 ELISA /CFIA 检测试剂
ELISA/ CFIA Kit for detection of CD36 Antigen and Antibody

原始创新，自主产权-核心技术，学科进步

免疫荧光层析检测技术(CFIA)





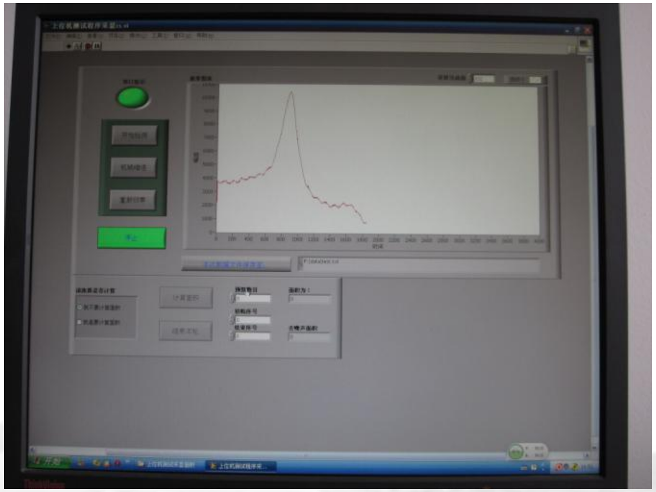
Kiefel et al, Blood 1987

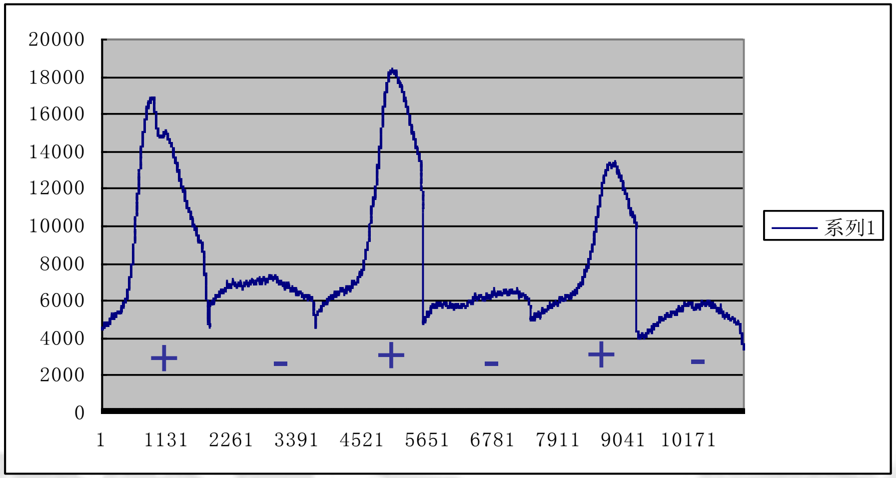
Final reaction pattern

1、Principles of CFIA are same to MAIPA, but with the advantages of taking much less time and laborious, 1 hour : 8 hours ;
2、Phase 3 test, more flexible useful in Platelet antibody testing and analysis and crossmatching routinely .

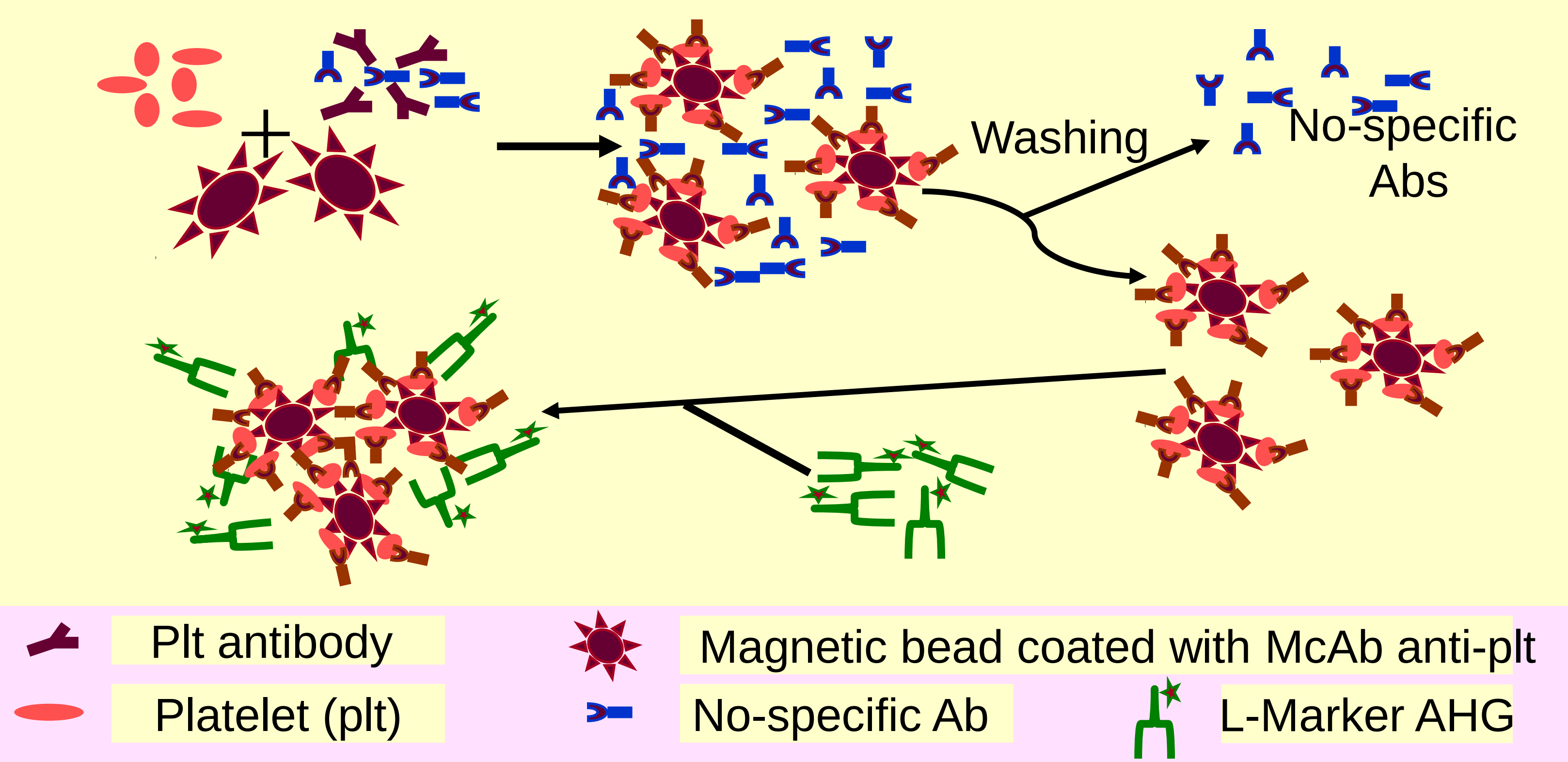
➢优点：可实现抗体的定量检测；

结果客观且图像化显示，可长期存档。





Detection of Plt Ag-Ab reaction with magnetic bead coated with McAb-anti-plt and luminescent marker on the AHG



1、Magnetic bead make the washing step much easier !
2、Most reliable and simple method for clinical routine of Plt crossmathing and antibody screening !

	标记二抗 稀释倍数 4000		8000	
阳性样本	3. 47	3. 197	1. 027	0. 621
阴性样本	0. 742	0. 956	0. 406	0. 495
空白对照	0. 83	1. 197	0. 415	0. 555

拟解决的关键技术问题和创新点

血小板抗原抗体反应纳米磁珠化学发光免疫分析技术

关键技术

（1）磁珠生物粒子的制备;

（2）高效价分泌血小板特异性糖蛋白（IIb/IIIa，Ia/IIa，Ib/IX，IV等）单克隆抗体的细胞株和抗体特异性检定;

（3）化学发光免疫分析系统的建立。

创新点

（1）磁珠生物粒子取代化学合成磁珠颗粒，来源充分且价格低廉;

（2）与固相吸附试验法比较，克服其缺点：

1）指示红细胞有效期短，2）弱阳性不易判断，

3）非定量检测，　　4）难以鉴定抗体特异性等问题。

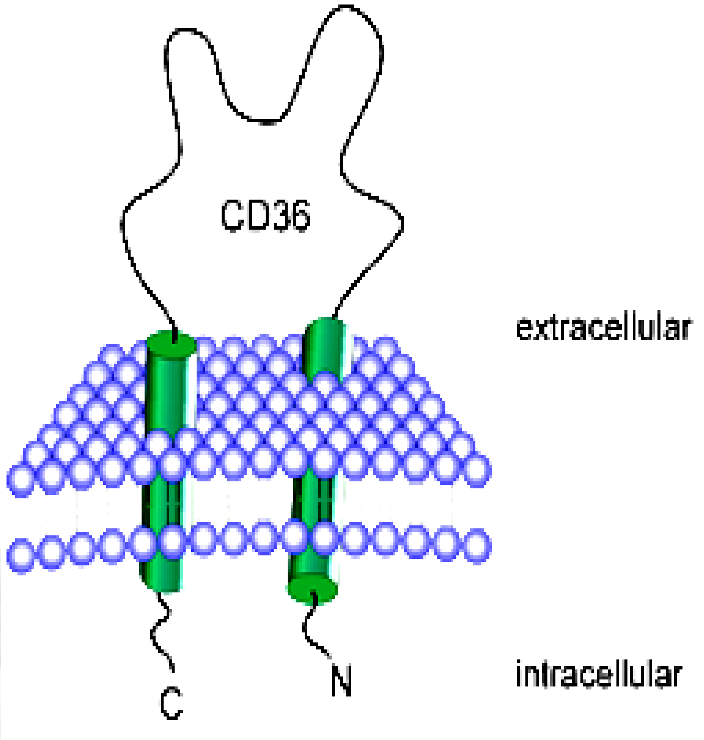
（3）与MAIPA比较，克服其缺点：

1）实验程序复杂，容易出假阴性，2）耗时长，需6-8个小时，不易用于临床常规检测，

3）单克隆抗体和人血清抗体竞争反应位点。

3.4 CD36抗原检测（酶联免疫法）

GPIV(CD36)



◆TypeI:血小板和单核细胞均缺失CD36
TypeII:仅血小板缺失CD36

◆缺失频率：日本、韩国：3-11%
印尼、台湾：4%
美国黑人：2.4%
Sub-Saharan：7.8%
高加索人：0.06%

Incidence of the Nak(a)-negative platelet phenotype in African Americans is similar to that of Asians

BR Curtis; RH Aster

About 5 to 10 percent of Asians have platelets that lack the major membrane glycoprotein (GP) IV (CD36, GPIIIb) that carries the isoantigen Naka. Isoimmunization against GPIV can occur in GPIV- negative persons and can lead to platelet transfusion refractoriness

Expression of GPIV and Naka antigen on monocytes in Naka-negative subjects whose platelets lack GPIV

Hironori Take 1 , Hirokazu Kashiwagi 1 , Yoshiaki Tomiyama 1 Japan

Role of anti-Naka antibody, monocytes and platelets in the development of transfusion-related acute lung injury

Conclusion Anti-Naka antibody may be strongly implicated in lung microvascular endothelial dysfunctions that lead to TRALI in a monocyte- and platelet-dependent manner.

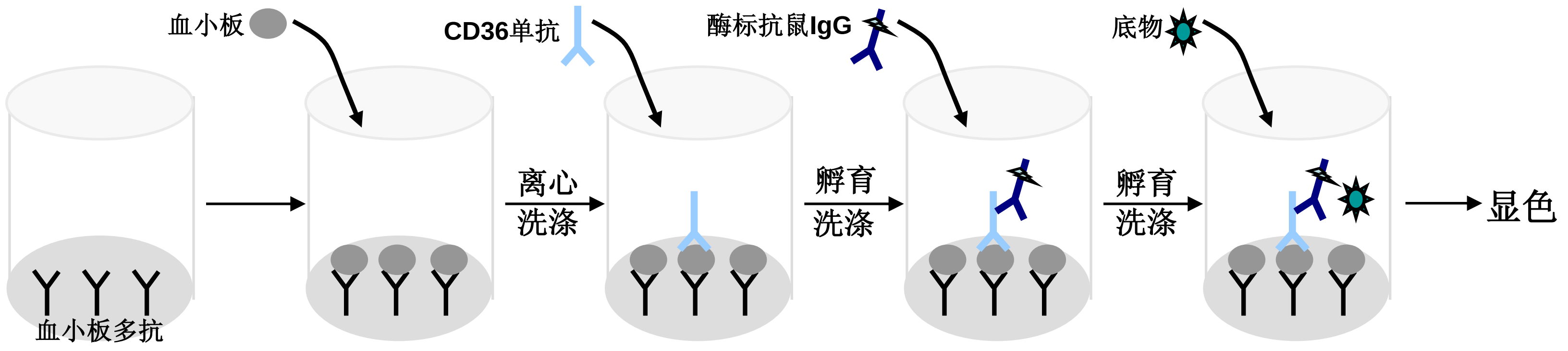
Primary refractoriness to platelet transfusion caused by Naka antibody alone

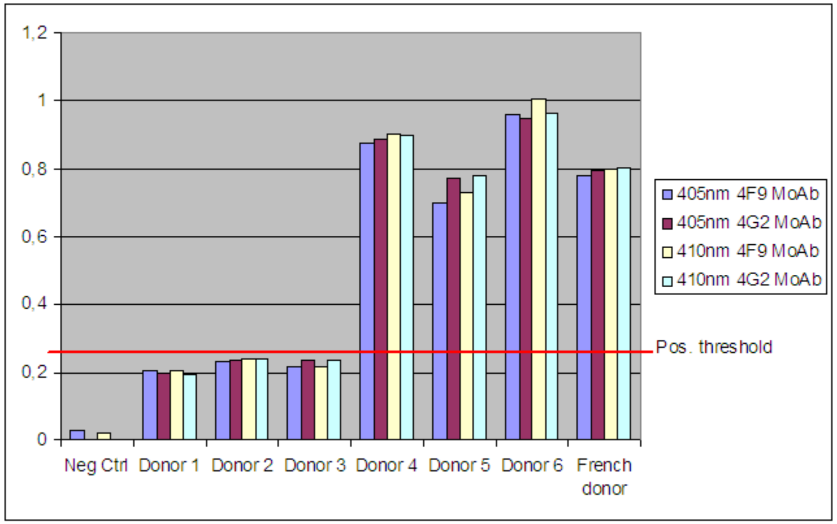
The transfusion of Naka-negative, but HLA non-selected, platelets was effective in raising the platelet count. **Conclusion** Clinically significant Naka antibody was present as naturally occurring antibody in a platelet glycoprotein IV (CD36)-negative non-transfused male patient.

A new platelet-specific antigen, Naka, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion.

Ikeda H, Mitani T, Ohnuma M, Haga H, Ohtzuka S, Kato T, Nakase T, Sekiguchi S.
Hokkaido Red Cross Blood Center, Sapporo, Japan.

CD36抗原检测（ELISA）





注：4F9和4G2为两株抗人血小板CD36单克隆抗体。

Donor1~Donor6为中国人血小板。

谢 谢 ！