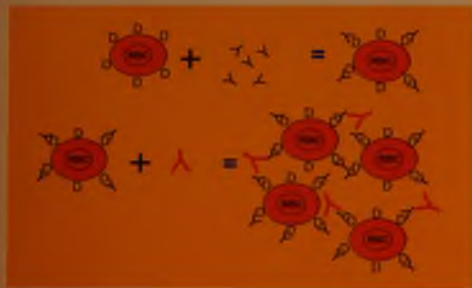


HÒA HỢP MIỄN DỊCH HỒNG CẦU TRONG TRUYỀN MÁU HIỆN ĐẠI



TS. BSCC. TRỊNH XUÂN KIỂM

**HOÀ HỢP MIỄN DỊCH HỒNG CẦU
TRONG TRUYỀN MÁU HIỆN ĐẠI**

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

HÀ NỘI - 2010

LỜI GIỚI THIỆU

Từ năm 1900 nhà bác học thiện tài người Đức K. Landsteiner phát hiện ra nhóm máu A, B, O, việc truyền máu cứu sống người bệnh đã và đang phát triển rộng khắp toàn cầu. Cho tới nay và cả trong tương lai, máu vẫn là dược phẩm thiên phú quý giá, chưa có chất nhân tạo nào thay thế được. Vì vậy, an toàn truyền máu có tầm quan trọng hàng đầu. Thật vậy, truyền máu càng nhiều thì nguy cơ tai biến càng dễ xảy ra dưới nhiều hình thức phức tạp khác nhau.

Ở nước ta hệ thống truyền máu từ trung ương tới địa phương đã có nhiều tiến bộ. Tuy nhiên, trong thực tế ứng dụng lâm sàng còn có nhiều hạn chế từ kinh nghiệm đến phương tiện và kỹ thuật thực hành, nhất là với sinh viên y khoa.

Đáp ứng một phần yêu cầu nói trên, TS.BSCC. Trịnh Xuân Kiêm đã biên soạn cuốn sách ***"Hòa hợp miễn dịch hồng cầu trong truyền máu hiện đại"***. Cuốn sách này đã đề cập đến một số kiến thức cơ bản và kinh nghiệm trong lĩnh vực miễn dịch dòng hồng cầu. Đó là hệ thống nhóm máu A,B,O và các hệ thống nhóm máu khác ngoài hệ thống A,B,O với kháng thể bất thường, gây tai biến tan máu sớm hoặc muộn, ngày càng phổ biến nhưng rất khó phát hiện trong phòng thí nghiệm cũng như trên lâm sàng. Đồng thời cuốn sách cũng giới thiệu một số kỹ thuật nhằm giải quyết những vấn đề thiết thực này.

Xin giới thiệu cuốn sách này với sinh viên y dược khoa, các đồng nghiệp cùng tham khảo trong thực hành và nghiên cứu.

Tôi tin rằng tác giả mong được tiếp thu nhiều ý kiến bổ sung của các bạn.

Hà Nội, tháng 12 năm 2010

GS.TSKH. ĐỖ TRUNG PHÂN

Nguyên Chủ nhiệm Bộ môn

Huyết học · Truyền máu

Đại học Y Hà Nội

Nguyên Viện trưởng Viện

Huyết học · Truyền máu Trung ương

LỜI NÓI ĐẦU

Trong những năm gần đây, cùng với sự phát triển chung của đất nước, hòa nhập cộng đồng Quốc tế, nền Y học Việt Nam cũng như chuyên ngành Truyền máu đã có nhiều tiến bộ. Tuy nhiên, hòa hợp miễn dịch, trước hết là các hệ nhóm máu đông hồng cầu trong truyền máu hiện đại, ứng dụng lâm sàng vẫn cần được quan tâm nhiều hơn nữa.

Để góp phần đáp ứng yêu cầu thực tế phục vụ lâm sàng và đào tạo lại các cơ sở y tế, cuốn sách *“Hòa hợp miễn dịch hồng cầu trong truyền máu hiện đại”* được ra đời.

Cuốn sách bao gồm 06 chương:

Chương 1: Cơ sở di truyền và miễn dịch của các hệ nhóm máu.

Chương 2: Các hệ nhóm hồng cầu.

Chương 3: Thực hành kỹ thuật an toàn truyền máu.

Chương 4: Các kháng thể bất thường và an toàn truyền máu.

Chương 5: Những tai biến và sự cố trong truyền máu.

Chương 6: Chế tạo và bảo quản sinh phẩm dùng trong truyền máu.

Cuốn sách này là kết quả học tập, nghiên cứu trong và ngoài nước, ứng dụng thực tế lâm sàng suốt nhiều năm qua của tác giả.

Hy vọng cuốn sách sẽ mang lại những thông tin bổ ích và thiết thực với người đọc, đặc biệt các sinh viên, học viên ngành Y-Dược.

Tuy nhiên, trong quá trình biên soạn không tránh khỏi còn nhiều thiếu sót.

Rất mong sự độ lượng và góp ý của người đọc.

Tác giả

TS.BSCC. TRỊNH XUÂN KIỂM

MỤC LỤC

<i>Lời giới thiệu</i>	3
<i>Lời nói đầu</i>	5
CHƯƠNG 1: CƠ SỞ DI TRUYỀN VÀ MIỄN DỊCH CỦA CÁC HỆ NHÓM MÁU	
<i>I. Di truyền của các hệ nhóm máu</i>	11
1. Cấu trúc cơ bản của DNA và RNA	11
2. Các gen và locus phân chia tế bào	17
3. Di truyền qua hệ tiết các kháng nguyên nhóm máu	25
<i>II. Miễn dịch của các hệ nhóm máu</i>	27
A. Một số vấn đề cơ bản	27
1. Các kháng nguyên nhóm máu	27
2. Các kháng thể nhóm máu	29
3. Kết hợp bổ thể	35
B. Ứng dụng các hoạt tính kháng thể in - vitro	37
C. Cơ chế của các phản ứng miễn dịch và các yếu tố tác động	38
CHƯƠNG 2: CÁC HỆ NHÓM HỒNG CẦU	
HỆ NHÓM ABO	40
<i>I. Lịch sử</i>	40
<i>II. Di truyền và tính kế thừa</i>	41
<i>III. Sinh hoá các kháng nguyên nhóm máu</i>	43
<i>IV. Các kháng nguyên hệ ABO</i>	46

V. Các kháng thể thuộc hệ ABO	53
VI. Phương pháp xác định nhóm máu hệ ABO	57
VII. Những trường hợp bất thường khi xác định nhóm máu hệ ABO	62
VIII. Cách phòng tránh và xử lý các khó khăn khi xác định nhóm máu ABO	66
HỆ Rh	68
I. Lịch sử	68
II. Danh pháp	69
III. Tần số kháng nguyên hệ Rh ở người da trắng	73
IV. Các kháng thể hệ Rh	74
HỆ KELL	75
HỆ MNSs	78
HỆ LEWIS	81
HỆ P	85
HỆ LUTHERAN	91
HỆ DUFFY	92
HỆ KIDD	93
CHƯƠNG 3: THỰC HÀNH KỸ THUẬT AN TOÀN TRUYỀN MÁU	
I. Xây dựng và bố trí một phòng xét nghiệm miễn dịch huyết học	96

II. Một số thiết bị nhỏ dùng trong xác định nhóm máu và kháng thể nhóm máu	99
1. Các pipett Pasteur dùng chung	99
2. Thuốc thử chủ yếu	101
III. Phản ứng kháng nguyên, kháng thể và các thể hiện in vitro	102
A. Kỹ thuật gấn hay hấp thụ	103
B. Kỹ thuật tách	106
C. Kỹ thuật ngưng kết	109
CHƯƠNG 4: CÁC KHÁNG THỂ BẤT THƯỜNG VÀ AN TOÀN TRUYỀN MÁU	
I. Đại cương	138
II. Thiết lập Panel hồng cầu	140
1. Định nghĩa	140
2. Nguyên tắc thiết lập các Panel hồng cầu	141
3. Nguyên lý tiến hành kỹ thuật phát hiện và xác định kháng thể bất thường	142
4. Chế tạo hồng cầu nghiệm cho các Panel, cách bảo quản	145
CHƯƠNG 5: NHỮNG TAI BIẾN VÀ SỰ CỐ TRONG TRUYỀN MÁU	
I. Những phản ứng không huyết tán	146
1. Phản ứng sốt	146
2. Phản ứng dị ứng	148

3. Phản ứng nhiễm khuẩn	149
4. Tai biến lách bệnh	150
5. Tai biến gây miễn dịch	151
II. Những phản ứng huyết tán	151
A. Nguyên nhân miễn dịch	151
B. Nguyên nhân ngoài miễn dịch	153
III. Thái độ phòng, chống và xử trí	154
1. Chẩn đoán	154
2. Xử trí	155
CHƯƠNG 6: CHẾ TẠO VÀ BẢO QUẢN SINH PHẨM DÙNG TRONG TRUYỀN MÁU	
I. Giữ máu và các sinh vật phẩm	157
1. Các thành phần cấu trúc của tế bào	157
2. Các tế bào đóng băng	158
3. Các kháng huyết thanh	158
II. Chế tạo các sinh phẩm chủ yếu	159
1. Tiêu chuẩn chế tạo Anti-A, Anti-B, Anti-A + B	160
2. Tiêu chuẩn chế tạo thuốc thử Antiglobulin người sử dụng trong miễn dịch huyết học	163
Phụ lục: Một số dung dịch chống đông và dung dịch đệm dùng trong miễn dịch truyền máu	173
Tài liệu tham khảo	178

Chương 1

CƠ SỞ DI TRUYỀN VÀ MIỄN DỊCH CỦA CÁC HỆ NHÓM MÁU

Từ năm 1900, Karl Landsteiner phát hiện đầu tiên nhóm máu thuộc hệ ABO, tiếp theo đó hàng loạt các phát hiện khác đều chứng minh rằng tính kế thừa, di truyền về nhóm máu tuân theo đúng các định luật Mendel. Việc nghiên cứu xác định nhóm máu đều áp dụng các nguyên tắc và phương pháp kỹ thuật miễn dịch. Các nhóm máu khác nhau đều là những kiểu thể hiện của những kháng nguyên nằm trên bề mặt hồng cầu, các kháng nguyên này lại là sản phẩm của các gen nằm ở các locus nhất định, bố trí trong các thể nhiễm sắc (chromosome) của nhân tế bào. Trước khi khảo sát cụ thể từng hệ nhóm máu, cần thiết phải nhắc lại một số điều cơ sở về tổng hợp protein, về DNA và gen, về thể nhiễm sắc, phân chia tế bào, kháng nguyên, kháng thể, và các phản ứng miễn dịch có liên quan đến việc nghiên cứu các hệ nhóm máu sau này.

I. DI TRUYỀN CỦA CÁC HỆ NHÓM MÁU

Cơ sở vật chất di truyền của gen là các acid nhân. DNA (deoxyribonucleic acid) và RNA (ribonucleic acid).

1. Cấu trúc và chức năng cơ bản của DNA và RNA

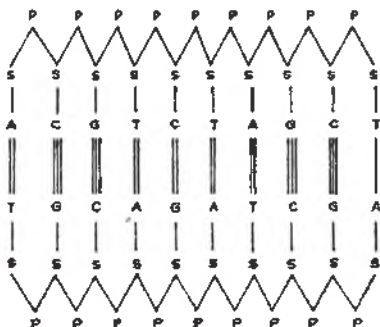
Cấu trúc cơ bản của DNA gồm 2 chuỗi polynucleotid dài, gấp lại thành một vòng xoắn kép, mỗi chuỗi chạy theo một hướng ngược chiều nhau (hình 1.1). Thông tin di truyền được mã hoá trên DNA bằng sự sắp xếp trình tự của 4 gốc: Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T), và Cytosin (C). Trong số đó thì A và G là gốc purin còn T và C là gốc pyrimidin.



Hình 1.1. Cấu trúc cơ bản của DNA

Một phân tử DNA gồm 3 thành phần: 1 đường, 1 gốc, và 1 phosphat, ba thành phần này tạo thành một nucleotid. Số lượng nucleotid chứa adenin bao giờ cũng ngang bằng số lượng nucleotid chứa thymin. Số lượng nucleotid chứa guanin bao giờ cũng ngang bằng số lượng nucleotid chứa cytosin. Do đó A bao giờ cũng cặp đôi với T, còn G thì cặp đôi với C. Các đoạn trên phân tử DNA chứa đựng các gen, nên gen là những đơn vị của di truyền. Mã di truyền là do trình tự bộ ba (triplet) của 3 gốc xếp theo thứ tự nhất định. Thứ tự này được mã hoá đối với một acid amin. Bộ ba như thế gọi là một codon, một dãy sắp xếp những "bộ ba" tạo thành một trình tự acid amin trên một chuỗi polypeptid. Một gen là một trình tự sắp xếp của những "bộ ba" có chứa mã đối với một polypeptid (hình 1.2 và 1.3).

– RNA cũng là một phân tử đơn như DNA nhưng khác ở chỗ đường của RNA là ribose, không phải desoxyribose như DNA, và "gốc" của RNA là Uracil (U) chứ không phải là thymin như trong DNA (hình 1.4). Có 3 loại RNA với 3 chức năng khác nhau tham gia trong tổng hợp protein:

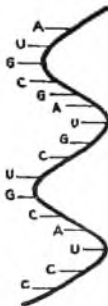


P: phosphate; S: sugar (desoxyribose)
 A: Adenine; T: thymine; G: guanine; C: cytosine

Hình 1.2. Các thành phần của phân tử DNA



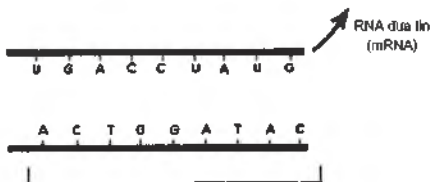
Hình 1.3. Trình tự sắp xếp các bộ ba có chứa mã di truyền



Hình 1.4. Cấu trúc của phân tử RNA

- RNA đưa tin (messenger RNA hay mRNA).
- RNA chuyển (tRNA), còn gọi là RNA hoà tan (sRNA).
- RNA của ribosom (rRNA).

Chức năng của RNA là thông dịch mã từ DNA đến một polypeptid hoặc protein. RNA đưa tin được sinh ra bởi sự sao chép từ DNA, khuôn mẫu sắp xếp các gốc trên mRNA giống hệt như trên DNA, chỉ khác là U thay cho T và cặp đôi với A. Khi mRNA nhân mã di truyền rồi, thì rời nhân đi ra bào tương kết hợp với các ribosom. Ribosom là những hạt nhỏ chứa nhiều acid nhân và là nơi tổng hợp protein. Ribosom chỉ hoạt động sau khi tiếp xúc với một phân tử mRNA (hình 1.5).



Hình 1.5. Trình tự sắp xếp của phân tử RNA

RNA chuyển (tRNA) hoà tan trong bào tương, có chức năng chuyển các acid amin từ bào tương đến từng vị trí thích hợp trên khuôn của mRNA, trình tự diễn biến như sau:

- Ribosom gắn vào một điểm dính của mRNA. Mỗi acid amin gắn vào một mặt của tRNA, mặt thứ hai của tRNA trình ra một mã "bộ ba" như đã định.
- Ribosom chạy dọc theo mRNA, đọc mã và đặt mỗi acid amin thích hợp vào một vị trí đã định trước.
- Các acid amin được nối với nhau bởi những dây peptid, những dây này cũng do ribosom tạo ra dưới tác dụng của 1 men. Sau khi tạo thành các dây này bắt đầu chạy tách ra khỏi ribosom và các tRNA trở nên tự do. Mỗi ribosom cần độ 10 giây để "đọc" suốt chiều dài của 1 RNA. Mỗi khi đọc xong 1 mã và nhiều mRNA cùng đọc 1 lần, thì 1 polypeptid với trình tự sắp xếp các acid amin nhất định được tạo xong. Sản phẩm này có thể là 1 men (enzym), 1 hemoglobin v.v (bảng 1.1. mã di truyền).

Bảng 1.1. Mã di truyền

Nucleotid thứ nhất

Nucleotid thứ hai

	A hoặc U		G hoặc C		T hoặc A		C hoặc G		A hoặc U
A hoặc U	AAA AAG AAT AAC	Phe Leu	AGA AGG AGT AGC	Ser	ATA ATG ATT ATC	Tyr Stop	ACA ACG ACT ACC	Cys Stop Trp	G C A G
G hoặc C	GAA GAG GAT GAC	Leu	GGA GGG GGT GGC	Pro	GTA GTG GTT GTC	His Gln	GCA GCG GCT GCC	Arg C	A G A G
T hoặc A	TAA TAG TAT TAC	Ile Met	TAG TGG TGT TGC	Thr	TTA TTG TTT TTC	Asn Lys	TCA TCG TCT TCC	Ser Arg	A G A G
C hoặc G	CAA CAG CAT CAC	Val	CGA CGG CGT CGC	Ala	CTA CTG CTT CTC	Asp Glu	CCA CCG CCT CCC	Gly	A G A G

Chú thích :

A = adenin
G = guanine

C = cytosine
T = thymine

U = uridine
Stop =

Ala = alanine
Arg = arginine
Asn = asparagine
Asp = aspartic acid

Cys = cysteine
Gln = glutamine
Glu = glutamic acid
Gly = glycine

His = histidine
Ile = isoleucine
Leu = leucine
Lys = lysine

Met = methionine
Phe = phenylalanine
Pro = proline
Ser = serine

Nucleotid thứ ba

Chú thích :

A = adenine
G = guanineC = cytosine
T = thymineU = uridine
Stop =Ala = alanine
Arg = arginine
Asn = asparagine
Asp = aspartic acidCys = cysteine
Gln = glutamine
Glu = glutamic acid
Gly = glycineHis = histidine
Ile = isoleucine
Leu = leucine
Lys = lysineMet = methionine
Phe = phenylalanine
Pro = proline
Ser = serine

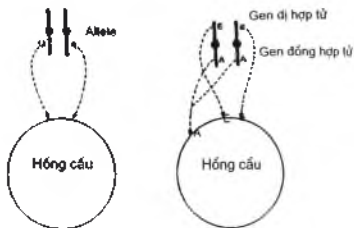
Song song với chức năng chủ yếu tổng hợp protein nói trên, DNA còn có chức năng nhân đôi, tạo ra nhiều DNA các quá trình phân chia tế bào.

2. Các gen và locus phân chia tế bào

Những đặc tính cá thể được mang trong các tế bào ở những phân tử nhỏ gọi là gen. Mỗi gen là một đơn vị di truyền, chiếm lĩnh một vị trí đặc hiệu trên chuỗi DNA gọi là locus. Chức năng của mỗi gen cũng đặc hiệu, gen nào tạo ra sản phẩm ấy. Các gen có mặt ở trạng thái nghỉ trong thể nhiễm sắc của nhân tế bào. Ở giai đoạn đầu của phân chia, thể nhiễm sắc tự lại thành một dải dài (spirene). Ở đó các gen được phân bố từng locus theo một thứ tự nhất định. Khi dải dài đó được cắt ra nhiều mảnh thể nhiễm sắc. Ở người có 46 thể nhiễm sắc, được xếp thành 23 cặp. Trong đó có 1 cặp giới tính XX hoặc XY. Mỗi cá nhân nhận 2 gen: 1 từ mẹ, 1 từ bố, hợp thành 1 đôi gen allele tương đồng. Nếu 2 gen allele này giống hệt nhau thì gọi là đồng hợp tử (homozygote). Nếu 2 gen đó khác nhau thì gọi là dị hợp tử (heterozygote). Gọi như thế vì tính kế thừa bao giờ cũng từ cả bố và mẹ (hình 1.6).

Trong kiểu phân chia các tế bào somatic, các DNA được nhân đôi cho hai tế bào con giống như tế bào cũ (mitosis). Trong kiểu phân chia của tế bào sinh dục thì lại phân 2 nửa, mỗi nửa kết với nửa khác của cá thể khác giới, cấu thành một thể toàn vẹn (meiosis) (hình 1.7).

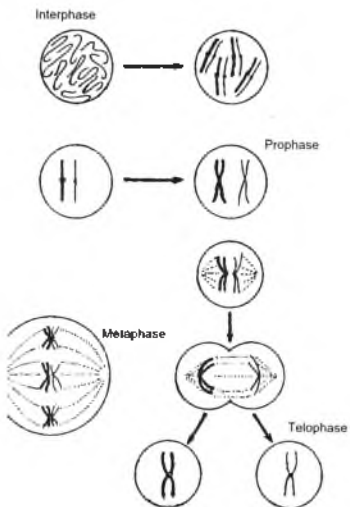
Dù là phân chia kiểu mitosis hay meiosis thì cũng có 4 pha phân chia và 1 pha nghỉ. Bốn pha phân chia là. Kỳ đầu (prophase), kỳ giữa (metaphase), kỳ hậu (anaphase), kỳ cuối (telophase), pha nghỉ gọi là (interphase). Ở pha nghỉ, các thể nhiễm sắc nối liền thành một dây dài, cuộn lại trong nhân, không phân tách được. Từ pha giữa mỗi nhân định được từng cặp thể nhiễm sắc (chromosomes) (hình 1.8a, và 1.8b).



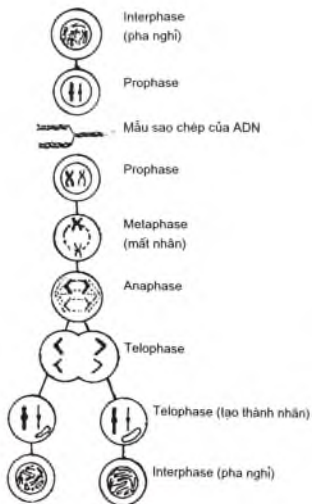
Hình 1.6. Các dạng gen tương đồng



Hình 1.7. Nhân tế bào với các thể nhiễm sắc



Hình 1.8a. Các pha phân chia tế bào



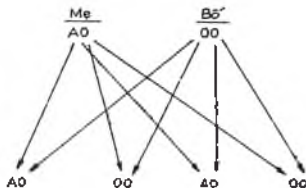
Hình 1.8b. Sự phân chia tế bào

Tính kế thừa và di truyền là do các tế bào sinh dục nam và nữ (tinh trùng và trứng). Thông qua kiểu phân chia giảm nhiễm (meiosis). Mỗi tế bào sinh trùng hoặc trứng chỉ có nửa số thể nhiễm sắc (cụ thể là 23). Đến khi kết hợp được với một tế bào trứng hoặc tinh trùng khác giới mới tạo thành một tế bào soma đủ 46 nhiễm sắc thể (23 cặp) và cũng bắt đầu từ tế bào đầu tiên này, sự phân chia tế bào tiến hành theo kiểu mitosis, nghĩa là các DNA, các gen cũng như các thể nhiễm sắc đều phân đôi để từ một tế bào mẹ thành hai tế bào con giống hệt tế bào mẹ. Cũng do sự khác nhau cơ bản giữa mitosis (phân chia kiểu soma) với meiosis (phân chia kiểu giảm nhiễm) mà những biến dị (mutation) xảy ra trong di truyền cao hơn nhiều so với những biến dị xảy ra trong tế bào soma, do những hiện tượng "bắt chéo" (crossing over) bất ngờ của các thể nhiễm sắc từ 2 tế bào hai giới khác nhau kết hợp lại khi thụ thai.

Cho tới nay, chưa có kỹ thuật xác định và phân lập từng gen, trực tiếp trong từng locus, mà người ta dùng các phương pháp gián tiếp qua những sản phẩm do gen sinh ra. Chính vì lẽ đó khi sinh ra 1 cặp gen allele (tương đồng) sinh ra 2 sản phẩm tương đồng mà một sản phẩm thể hiện rõ hơn hoặc duy nhất phát hiện được còn sản phẩm kia thể hiện yếu hơn hoặc không phát hiện được, người ta quen gọi là "gen trội" và "gen lặn". Thực ra thì "trội" và "lặn" chỉ có ý nghĩa khi dùng để giải thích một số bệnh lý, thí dụ điển hình như gen bệnh hemophilia gắn với chromosom X (Xh) được gọi là di truyền "lặn" vì khi di truyền cùng 1 X bình thường thì gen bệnh Xh không thể hiện ra ngoài, đó là trường hợp người nữ mang 1 gen Xh và 1 gen X bình thường, không phát bệnh nhưng vẫn truyền được bệnh qua gen bệnh lý "lặn" đó. Nói chung trong di truyền và kế thừa, không có tính "trội" và tính "lặn" thực thụ, vì khi một thể hiện nào có vẻ "trội" lẫn át, thể hiện kia có vẻ chìm, bị át đi, thì chỉ có nghĩa rằng người ta chưa có đủ nguyên liệu và biện pháp để phát hiện những thể hiện chìm đó mà thôi. Khi có được nguyên liệu và biện pháp thích hợp thì mọi sản phẩm của gen đều được thể

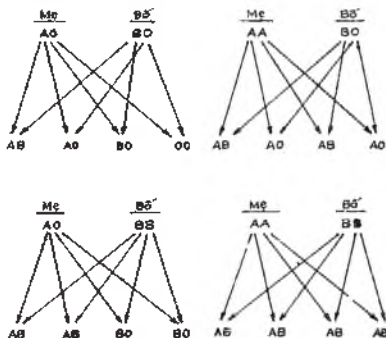
hiện ngang nhau và mọi gen đều bình đẳng, bình quyền như người ta thường gọi những trường hợp cùng trội (*co-dominant* hoặc *egalitarian*).

Tuy nhiên cũng có trường hợp do một tính trội nào khác, thí dụ màu sắc mà người ta gọi lầm là tính trội của gen. Điển hình là trường hợp lai giữa hai màu da trắng và da đen. Người con được kế thừa từ 2 bố mẹ, 1 người da trắng, 1 người da đen chẳng hạn, những gen và sản phẩm gen là màu trắng, đen hoàn toàn bằng nhau và đều thể hiện với liều lượng ngang nhau, nhưng màu da đen bao giờ cũng nổi bật hơn mặc dù đã pha với một nửa trắng. Do đó có cảm nghĩ rằng gen đen trội hơn gen trắng. Một thí dụ nữa về nhóm máu: Một người nhận từ bố gen A và từ mẹ gen O, khi định nhóm thì chỉ thấy A thể hiện mà không thấy O, có thể hiểu lầm rằng gen A "trội" và gen O "lặn". Thực ra, nhóm mà người ta gọi O chỉ có nghĩa là không A, không B. Gen H sinh ra chất H rồi từ chất H các gen A và B tác động tiếp để sinh ra chất A hoặc B. Nếu không có cả gen A và B thì chất H còn nguyên vẹn. Nếu dùng Anti H để phát hiện yếu tố H thì thấy yếu tố này thể hiện rất mạnh ở hồng cầu nhóm O, không kèm gì các yếu tố A hoặc B ở những hồng cầu nhóm A hoặc B (hình 1.9).



Hình 1.9. Các kiểu di truyền nhóm máu hệ ABO

Từ những khái niệm cơ bản trên, người ta phân làm hai kiểu thể hiện: kiểu hiện (phenotype) và kiểu di truyền hoặc kiểu gen (genotype). Kiểu hiện chỉ là những sản phẩm của gen (kháng nguyên) phát hiện được, còn kiểu di truyền là chỉ tất cả các sản phẩm của tất cả các gen có mặt trong 1 hệ. Thí dụ khi nói nhóm máu A, nhóm máu B là nói kiểu hiện, còn khi muốn nói kiểu di truyền thì phải xác định được là AA hay AO, BB hay BO. Từ đó suy ra khi nói nhóm máu O, hoặc nhóm máu AB là đồng thời đã xác định được cả kiểu hiện và kiểu di truyền, vì nhóm O chỉ có thể là OO, nhóm AB chỉ có thể là có cả 1 gen A và 1 gen B kế thừa từ cả hai bố mẹ chứ không thể từ một người bố hoặc một người mẹ (hình 1.10).



Hình 1.10. Các kiểu hiện và kiểu di truyền

Bảng 1.2. Những nhóm kế thừa có hoặc không có khả năng từ cha mẹ (không kể các nhóm phụ)

Kiểu hình của Cha Mẹ	Kiểu di truyền của Cha Mẹ	Nhóm kế thừa có khả năng (Kiểu hình và kiểu di truyền)	Những kiểu hình kế thừa không có khả năng
O × O	OO × OO	O (OO)	A, B, AB
O × A	OO × AA OO × AO	A (AO) A (AO) O (OO)	O, B, AB B, AB
O × B	OO × BB OO × BO	B (BO) B (BO) O (OO)	O, A, AB A, AB
O × AB	OO × AB	A (AO) B (BO)	O, AB
A × B	AA × BB AO × BB AO × BO AA × BO	AB (AB) AB (AB) B (BO) A (AO) B (BO) AB (AB) O (OO) A (AO) AB (AB)	O, A, B O, A Không B, O
A × AB	AA × AB AO × AB	A (AA) AB (AB) A (AA) AB (AB) B (BO)	B, O O
A × A	AA × AA AO × AA AO × AO	A (AA) A (AA) A (AO) A (AA) A (AO) O (OO)	O, B, AB O, B, AB B, AB
B × B	BB × BB BO × BB BO × BO	B (BB) B (BB) B (BO) B (BO) B (BB) O (OO)	O, A, AB O, A, AB A, AB
B × AB	BB × AB BO × AB	AB (AB) B (BB) AB (AB) A (AO) B (BO)	O, A O
AB × AB	AB × AB	A (AA) B (BB) AB (AB)	O

Nhiều trường hợp không phát hiện được kiểu di truyền bằng phương pháp xét nghiệm trực tiếp mà phải bằng điều tra gián tiếp và phả hệ. Thí dụ người Bố là nhóm A (kiểu hiện), người Mẹ là nhóm B (kiểu hiện), sinh con là nhóm O (vừa kiểu hiện vừa kiểu di truyền) thì chắc chắn người Bố có kiểu di truyền là AO và người mẹ có kiểu di truyền là BO. Với một hệ nhóm máu, thường chưa đủ để xác định, phải điều tra ở nhiều hệ khác nhau. Với nguyên liệu, thuốc thử sinh học, phương pháp kỹ thuật đầy đủ, việc xác định các kiểu di truyền qua điều tra phả hệ và gia đình, có thể đạt được ở đa số trường hợp, chỉ trừ những trường hợp quá hãn hữu. Mỗi thành viên gia đình được điều tra, nếu là nam thì ký hiệu là *propositus*, nếu là nữ thì ký hiệu là *proposita* (bảng 1.2).

3. Di truyền qua hệ tiết các kháng nguyên nhóm máu

Từ 1924, Moss và Yamakami đã phát hiện các yếu tố kháng nguyên A, B, H của hệ nhóm máu ABO không chỉ có mặt trong hồng cầu mà còn thấy trong nước bọt những người có hồng cầu mang kháng nguyên đó. Tuy nhiên, không phải bất kỳ người nào mà có người thấy, có người không. Từ đó để ra danh từ những người tiết (*secreteurs*), có tiết các yếu tố A, B, H qua nước bọt và những người không tiết (*non secreteurs*), không thấy các yếu tố đó trong nước bọt. Tính di truyền của hệ tiết ABH do 1 cặp gen allele *se* quyết định, có tính chất trội và độc lập. Sau đó nhiều tác giả xác định có hai dạng kháng nguyên rõ rệt, một dạng hoà tan trong nước, bản chất là polysaccharid thấy ở đa số các dịch trong cơ thể như nước bọt, dịch vị, dịch tụy, nước tiểu và một dạng hoà tan trong cồn, bản chất là glycolipid thấy trên màng các hồng cầu.

Cepellini, Watkins, Morgan còn thấy có sự liên quan chặt chẽ giữa hệ tiết ABH với hệ tiết nhóm hồng cầu Lewis.

II. MIỄN DỊCH HỌC CỦA CÁC HỆ NHÓM MÁU

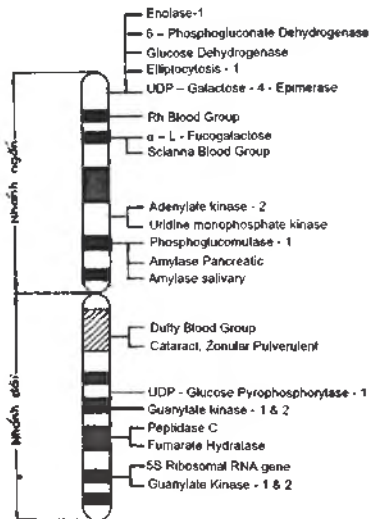
A. MỘT SỐ VẤN ĐỀ CƠ BẢN

1. Các kháng nguyên nhóm máu

Các kháng nguyên nhóm máu đều là sản phẩm của các gen. Gen quyết định nhóm máu có mặt ở thể nhiễm sắc trong nhân hồng cầu non (Erythroblaste) và phát huy chức năng như mọi hệ thống gen khác của cơ thể. Thí dụ locus của hệ ABO (A1, A2, B, H) nằm trên nhánh dài của chromosom số 9. Locus của các gen hệ Rh nằm trên nhánh ngắn của chromosom số 1. Các gen quyết định các sản phẩm tương ứng A1, A, B, H thuộc hệ ABO, hoặc D, C, E, c, e thuộc hệ Rh trên màng hồng cầu (hình 1.11). Khi hồng cầu non mất nhân trở thành hồng cầu trưởng thành làm nhiệm vụ vận chuyển oxy ở máu ngoại vi thì các sản phẩm nói trên vẫn tồn tại suốt đời sống của hồng cầu. Đó chính là các kháng nguyên nhóm máu.

Đặc tính cơ bản của kháng nguyên là tính miễn dịch và tham gia tích cực vào phản ứng miễn dịch của cơ thể. Vì vậy người ta dùng các phương pháp kỹ thuật miễn dịch nhằm phát hiện và xác định các kháng nguyên cũng như các kháng thể ứng với những kháng nguyên đó. Để phát hiện và xác định các hệ nhóm máu và các kháng thể thuộc các hệ đó, người ta cũng hướng như vậy. Đây là nội dung chủ yếu của các phương pháp kỹ thuật Miễn dịch-Huyết học dùng trong truyền máu và bệnh lý huyết học miễn dịch từ trước tới nay.

Thuốc thử cơ bản để xác định nhóm máu là các kháng thể tương ứng với từng kháng nguyên nhóm máu, mà người ta đã chế tạo đạt đủ tiêu chuẩn để làm xét nghiệm bảo đảm an toàn. Các thuốc thử sinh học này được gọi là huyết thanh nghiệm (Serum-tests). Quy tắc an toàn miễn dịch trong truyền máu là phải truyền máu hoà hợp miễn dịch, nghĩa là không để xảy ra phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể nhóm máu.



Hình 1.11. Sắp xếp gen của chromosom 1 của người

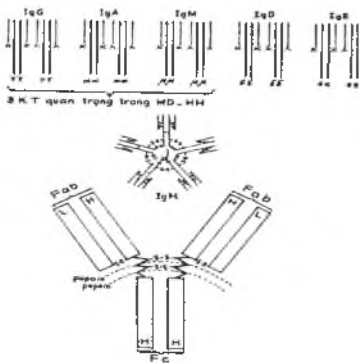
Cũng như các đáp ứng miễn dịch khác, khi đưa một kháng nguyên hồng cầu vào cơ thể không có kháng nguyên ấy, thì cơ thể sẽ nhận biết kháng nguyên đưa vào như một "tính lạ". Nhờ hệ miễn dịch của bản thân sẽ huy động hệ miễn dịch sản sinh ra kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên "lạ" ấy. Cụ thể, nếu truyền hồng cầu A cho người nhóm O hoặc truyền hồng cầu Rh dương (+) có kháng nguyên D cho người Rh âm (-) không có D (đỏ), thì sau một thời gian nhất định trong huyết thanh người nhóm O sẽ sản sinh ra kháng thể Anti-A miễn dịch, trong huyết thanh Rh (-) sẽ có mặt kháng thể Anti-D miễn dịch, gây nên các tai biến truyền máu. Gọi là kháng thể miễn dịch vì phải qua một quá trình gây miễn dịch khi đưa kháng nguyên "lạ" vào cơ thể, khác với kháng thể tự nhiên.

Với hệ ABO, có một số điều đặc biệt là từ khi sinh ra, đã thấy những kháng thể sẵn có trong huyết thanh không ứng với kháng nguyên trên hồng cầu như một tất yếu và tuyệt đối. Cụ thể là ở huyết thanh người hồng cầu nhóm A tất yếu phải có kháng thể Anti-B, không có kháng thể Anti-A; ở huyết thanh người hồng cầu nhóm B thì tất yếu có kháng thể Anti-A, không bao giờ có kháng thể Anti-B. Huyết thanh người hồng cầu nhóm O thì có mặt cả kháng thể Anti-A và Anti-B; ở huyết thanh người hồng cầu nhóm AB, tất yếu không có kháng thể nào thuộc hệ ABO, nghĩa là không có cả Anti-A và Anti-B. Những kháng nguyên và kháng thể nói trên là tự nhiên và thường xuyên.

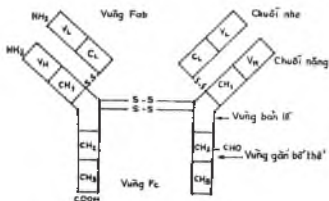
2. Các kháng thể nhóm máu

Cũng như mọi kháng thể khác, các kháng thể nhóm máu đều có bản chất lý hoá là các globulin miễn dịch Ig. Có 5 loại chính: IgA, IgG, IgM, IgE, IgD. Các kháng thể nhóm máu chủ yếu thuộc 2 loại IgG và IgM (hình 1.12).

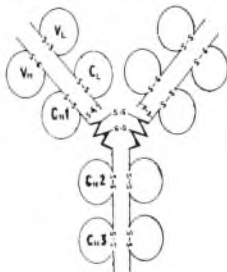
Cấu trúc hoá học của IgG được dùng để mô tả cơ bản, chung cho các loại Ig, vì IgG ở dạng đơn phân (monomer). IgG gồm 4 chuỗi polypeptid, cấu trúc 4 bậc: 2 chuỗi nặng (Heavy Chain) ký hiệu là H giống hệt nhau, mỗi chuỗi có khối lượng phân tử khoảng 55.000; 2 chuỗi nhẹ (Light Chain) ký hiệu là L giống hệt nhau, mỗi chuỗi có khối lượng phân tử khoảng 22.500. Có 2 loại chuỗi nhẹ Kappa hoặc hai chuỗi nhẹ Lamda, mỗi chuỗi nhẹ nối với 1 chuỗi nặng bằng 1 cầu nối disulfua (disulfide bond S-S), 2 chuỗi nặng nối với nhau bằng 1 đến 2 hoặc hơn nữa các cầu nối S-S như trên (hình 1.13).



Hình 1.12. Sơ đồ cấu trúc của 5 lớp globulin miễn dịch và phân tử IgG



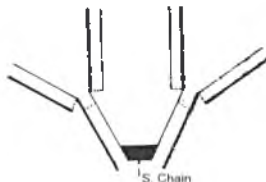
Hình 1.13a. Sơ đồ cấu trúc của phân tử IgG



Hình 1.13b. Sơ đồ cấu tạo của phân tử IgG

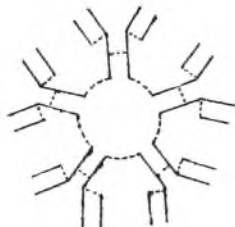
Các liên kết disulfua trong chuỗi đã tạo ra tại mỗi vùng (V_H , V_L , C_L , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) một số cấu hình gồm 60 acid amin đó là các lĩnh vực của Ig (immunoglobulin domains)

IgA cũng có cấu trúc tương tự như vậy, chỉ khác nhau ở chỗ IgA hay ở dạng lưỡng phân (dimer), 2 đơn vị nhỏ (subunits) nối nhau bằng một chuỗi phụ, gọi là J.Chain. (hình 1.14).



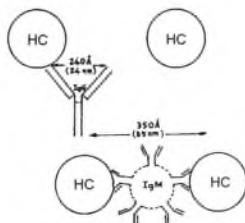
Hình 1.14. Cấu trúc phân tử IgA

IgM gồm 5 đơn vị nhỏ, cấu trúc tương tự như đơn vị IgG, 5 đơn vị nhỏ này gắn với nhau bằng chuỗi phụ J. Chain, một pentamer như 5 cánh sao (hình 1.15) (hình 1.16).



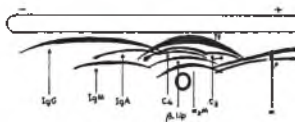
Hình 1.15. Phân tử IgM

----- liên kết disulfid . ——— chuỗi polypeptid



Hình 1.16. Phân tử IgG và IgM gắn trên bề mặt hồng cầu

Trở lại đặc điểm của IgG, loại Ig này chiếm tỷ lệ 70 đến 75% tổng số Ig trong huyết thanh người bình thường, cụ thể là nồng độ từ 10- 14g/lít. Khối lượng phân tử khoảng 150.000 ứng với hệ số lắng là 7S (siêu ly tâm). Vì thế trước đây quen gọi là gamma globulin 7S. Các IgG không đồng nhất mà bao gồm nhiều loại nhỏ. Vì vậy trên diện di miễn dịch thể hiện một cung tựa chạy dài từ vùng dịch chuyển của các globulin alpha 2 đến điểm cuối của vùng cực âm (hình 1.17).



Hình 1.17. Hình ảnh điện di miễn dịch với các cung của các globulin miễn dịch IgG, IgA, IgM: 2 thành phần bổ thể C3 và C4, 1 số các protein khác: β lip (Beta lipoprotein), α 2M (alpha 2-macroglobulin và Tf (transferrin)

Vì tính lý hoá tương tự nhau giữa phân tử IgG và các đơn vị nhỏ của phân tử IgM nên Porter và Edelman cùng các cộng sự đã phân tích phân tử IgG để từ đó làm sáng tỏ cấu trúc và tính năng của các Ig khác như IgA và IgM như sau:

- Sử dụng các men tiêu protein khác nhau (Papain, cystein, pepsin...), có thể cắt rời từng phần của phân tử IgG, nghiên cứu những chức năng và đặc tính khác nhau của từng phần đó.

- Đoạn Fab (Fragment Antigen-binding) là đoạn mang tính chất kháng thể sẽ gắn vào kháng nguyên tương ứng.

- Đoạn Fc (Fragment Cristallisable) là đoạn không có biến đổi, mang tính kháng nguyên. Nếu dùng IgG làm kháng nguyên gây miễn dịch ở động vật như thỏ hoặc ngựa để tạo ra kháng thể anti-globulin người, thì tác động sinh miễn dịch chính là do các vị trí của các yếu tố quyết định kháng nguyên (Antigenic Determinants) trên đoạn Fc.

- Trên đoạn Fc có một vị trí để có thể gắn với bổ thể.

- Giữa đoạn Fab và Fc có một vùng bản lề (Hinge region) cho phép 2 nhánh Fab mở ra một góc alpha, thuận lợi cho việc gắn với kháng nguyên.

IgM là một pentamer gồm 5 đơn vị nhỏ, mỗi đơn vị nhỏ cấu trúc tương tự như một phân tử monomer IgG. Khối lượng phân tử IgM khoảng 900.000, hệ số lắng (siêu ly tâm) là 19 S, tỷ lệ trong huyết thanh là 1g/lít.

Các kháng thể nhóm máu chủ yếu thuộc loại IgG và IgM:

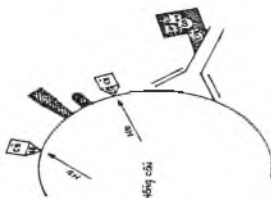
- Các kháng thể thường xuyên và tự nhiên đều là IgM, như anti-A, anti-B tự nhiên của hệ ABO, phân tử lượng lớn, không qua nhau thai được.

- Các kháng thể miễn dịch thường là IgG, như anti-A miễn dịch thuộc hệ ABO, anti-D thuộc hệ Rh, Anti-K thuộc hệ Kell phân tử lượng tương đối nhỏ nên qua nhau thai được, vì thế mà có khả năng gây nên bệnh huyết tán sơ sinh (xem Chương 2).

3. Kết hợp bổ thể

Nhiều kháng thể loại IgG và IgM có tính năng kết hợp bổ thể. Nếu không có vai trò của bổ thể kết hợp vào, các kháng thể dù là IgG, IgM, IgA chỉ có khả năng gắn lên hồng cầu mang kháng nguyên tương ứng, mạnh nữa thì gây ngưng kết các hồng cầu với nhau và những cục ngưng kết này bị các đại thực bào (Macrophage) và các tế bào của hệ vòng mô trong gan và lách tiêu huỷ, loại khỏi vòng tuần hoàn, tạo nên hiện tượng huỷ hồng cầu ở trong mô, ngoài huyết quản, vẫn quen gọi là huyết tán ngoài huyết quản extra vascular hemolysis.

Bổ thể là một nhóm thành phần gồm từ C1 đến C9, có mặt trong các huyết thanh tươi bình thường, đa số là các beta globulin. Khi kháng thể gắn vào kháng nguyên thì phân tử kháng thể có sự biến đổi, mở ra và bộc lộ vị trí kích hoạt bổ thể nằm ở đoạn Fc của nó. Nếu kháng thể thuộc loại IgG thì ít nhất cần hai phân tử kế cận nhau mới đủ vị trí để kích hoạt việc gắn với bổ thể, vì các phân tử IgG đều là monomer. Nếu là IgM thì chỉ một phân tử cũng đủ, vì phân tử IgM là pentamer, tức là có 5 đơn vị nhỏ giống như IgG. Điều này là một trong những lý giải về hoạt tính mạnh của những kháng thể IgM. Sau bước kích hoạt khởi đầu, sẽ diễn biến hoạt hoá một loạt các thành phần bổ thể từ C1 đến C9 theo kiểu dây chuyền khá phức tạp nhưng rất tuần tự và nhanh, có sự tham gia của các ion Ca^{++} và Mg^{++} , dẫn tới cuối cùng là C8 và C9 được hoạt hoá, hỗ trợ nhau, tăng cường cho nhau cùng gắn lên hồng cầu, gây nên tổn thương ở màng hồng cầu. Từ những chỗ tổn thương ấy huyết sắc tố thoát ra ngoài, tạo nên hiện tượng huỷ hồng cầu trong lòng mạch (Intra Vascular Hemolysis). Kiểu huyết tán này không cần sự tham gia của các đại thực bào và tổ chức vòng mô (RES), xảy ra trong cơ thể. Kỹ thuật invitro cũng thấy tiến hành được như vậy, với sự tham gia của bổ thể lấy từ huyết thanh tươi của người, của chuột lang hoặc thỏ (hình 1.18).



Hình 1.18. Kháng thể kết hợp bổ thể gắn trên hồng cầu

Trong bệnh lý miễn dịch huyết học, những kháng thể nào có tính năng kết hợp bổ thể dễ gây ra huyết tán ngay trong lòng mạch được gọi tên là hemolysin, tức là kháng thể gây huyết tán. Cũng như những kháng thể chỉ gây ngưng kết hồng cầu quen được gọi là agglutinin, nghĩa là các kháng thể gây ngưng kết.

Nhiều tác nhân có thể dùng để ức chế hoạt tính của bổ thể, từ đó ngăn hiện tượng huỷ hồng cầu trong lòng mạch, như các chất chống đông có Sodium hay Kalium, Ethylene-Diamino-Tetra-Acetic Acid (EDTA Na hay EDTA K). Các ion Ca^{++} rất cần cho sự hoạt hoá C1. Vì vậy các chất chống đông ức chế Ca^{++} đều có tác dụng ngăn cản hoạt động của bổ thể. Heparin cũng chống bổ thể. Nhiệt độ $56^{\circ}C$ trong 30 phút làm mất hoạt tính hoàn toàn C1 và C2, một phần của C4. Đa số các tác nhân trên thường được sử dụng chủ yếu "invitro", tùy cơ chế, tùy theo yêu cầu. Khi sử dụng tác nhân nào cũng phải chú ý tính năng tác dụng của nó, thí dụ heparin tuy cũng có tác dụng chống bổ thể nhưng phải dùng liều lượng cao. Thông thường trong kỹ thuật, dùng phổ biến nhiệt độ $56^{\circ}C$ để làm mất hoạt tính bổ thể, ngăn ngừa hiện tượng huyết tán miễn dịch trong ống nghiệm, vì hiện tượng huyết tán thường che lấp mất hiện tượng ngưng kết một khi cả hai hiện tượng huyết tán và ngưng kết cùng xảy ra, và đều cần phát hiện, chẩn đoán, khảo sát.

B. ỨNG DỤNG CÁC HOẠT TÍNH KHÁNG THỂ IN-VITRO

Nhiều hoạt tính kháng thể được sử dụng để phát hiện, xác định sự có mặt của kháng nguyên hồng cầu (trong định nhóm), và đánh giá các phản ứng miễn dịch kiểu kháng nguyên, kháng thể, nhằm nhiều mục đích kỹ thuật. Thường sử dụng những nguyên lý chính sau đây:

1. Gây ngưng kết hồng cầu: Khi một kháng thể đặc hiệu tiếp xúc với những hồng cầu ở vị trí của kháng nguyên ấy và kéo 2 hoặc nhiều hồng cầu khác tụm lại với nhau thành một cụm ngưng kết (agglutinats). Hiện tượng này gọi là hiện tượng ngưng kết hồng cầu.

2. Gây huỷ hồng cầu (huyết tán): Khi kháng thể có tính năng kết hợp bỏ thể và nếu có mặt của bỏ thể thì sau khi gặp kháng nguyên tương ứng trên màng hồng cầu, kháng thể không chỉ gắn vào, không chỉ gây ngưng kết mà cao hơn nữa, gây huỷ hồng cầu ngay trong ống nghiệm. Nhiều khi cần sử dụng hiện tượng này để làm kỹ thuật chẩn đoán, nhưng cũng nhiều khi cần biết để tránh, khi người ta cần ngăn hiện tượng huyết tán để bộc lộ ra hiện tượng ngưng kết mà người ta cần chẩn đoán hoặc khảo sát.

3. Gây cảm thụ hồng cầu: Khi một kháng thể đặc hiệu đã gắn lên kháng nguyên tương ứng trên màng hồng cầu, nhưng không đủ vị trí kháng thể, nói cách khác, không đủ cường độ hoạt tính để kéo hai hoặc nhiều hồng cầu tụm thành một cụm ngưng kết thì hiện tượng đó gọi là kháng thể mới gây cảm thụ hồng cầu, hoặc hồng cầu đã được cảm thụ với kháng thể. Sự cảm thụ này không nhìn thấy bằng mắt thường cũng như qua kính hiển vi quang học nếu không sử dụng một số biện pháp kỹ thuật phụ thêm như kỹ thuật Antiglobulin, kỹ thuật men (xem Chương 3).

4. Gây tủa: Khi kháng nguyên không nằm trên các tế bào lưu động như các tế bào máu (hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu) mà cũng hoà tan như kháng thể thì không dùng hiện tượng ngưng kết để

quan sát và đánh giá được, thường phải dùng các kỹ thuật gây tủa. Thường người ta cho kháng nguyên và kháng thể khuếch tán trong môi trường gel thạch Agarose, hoặc vừa cho khuếch tán vừa tạo một dịch chuyển điện di điều khiển theo một hướng nhất định.

Cao hơn nữa, người ta dùng phương pháp hai thì. Thì thứ nhất là điện di, thì thứ hai là khuếch tán miễn dịch, đó là nguyên lý của phương pháp điện di miễn dịch. Tất cả các phương pháp đều nhằm mục đích tạo ra được sự tiếp xúc đặc hiệu với hiệu suất cao nhất giữa kháng nguyên và kháng thể cũng là yếu tố hoá tan. Sự tiếp xúc đặc hiệu ấy, nếu có sẽ được thể hiện thành những cung tủa cố định trong gel thạch. Thực chất những cung tủa đó là những phức hợp kháng nguyên kháng thể thường rất khó tái hoà tan, có thể được nhuộm màu khác nhau để phân tích chỉ tiết.

Kỹ thuật gây tủa ít dùng trong xác định nhóm máu, nhưng đối với việc chẩn đoán các kháng nguyên hoà tan liên quan đến an toàn truyền máu thì có ý nghĩa phổ cập rộng rãi, cụ thể là dùng trong chẩn đoán kháng nguyên HBsAg mà trước đây vẫn quen gọi là kháng nguyên "Au", trong chẩn đoán các chứng bệnh rối loạn protein huyết thanh (Đa u tủy, bệnh Waldenstrom, các bệnh chuỗi nặng).

5. Các kỹ thuật khác

Kỹ thuật ức chế ngưng kết hồng cầu, kỹ thuật kết hợp bổ thể, kỹ thuật huyết tán, kỹ thuật gán (absorption) và tách (elution), kỹ thuật ngưng kết thụ động sẽ đề cập đến trong các chương sau.

C. CƠ CHẾ CỦA CÁC PHẢN ỨNG MIỄN DỊCH VÀ CÁC YẾU TỐ TÁC ĐỘNG

Phản ứng miễn dịch là phản ứng sinh học. Nhưng các phản ứng sinh học đều do các đặc tính lý hoá của các phân tử kháng nguyên, kháng thể chi phối: nhiệt độ, độ pH, nồng độ ion, lượng

kháng nguyên, lượng kháng thể, khoảng cách và mức tiếp xúc giữa kháng nguyên và kháng thể, cấu trúc kháng nguyên, cấu trúc của kháng thể, số lượng các vị trí kháng thể, lực đẩy, lực hút giữa các phân tử, điện tích của các phân tử, tính chất lý hoá của môi trường tiến hành phản ứng, vị trí kháng nguyên trên bề mặt hồng cầu...

Nhờ hiểu biết và vận dụng điều khiển các yếu tố tác động trên mà người ta có thể tạo những điều kiện tối ưu (optima) cho các phản ứng kháng nguyên kháng thể trong kỹ thuật để tăng cường và biến đổi các phản ứng yếu thành mạnh, không nhạy thành nhạy khiến cho dễ khảo sát, đánh giá. Thí dụ: dùng các men tiêu protein làm giảm bớt lực đẩy giữa các hồng cầu với nhau (enzyme techniques) hoặc dùng các Antiglobulin làm trung gian để gây ngưng kết hồng cầu khi các kháng thể chỉ mới gắn được trên hồng cầu chứ không đủ mạnh, không đủ vị trí kháng thể để tự nó gây được ngưng kết hồng cầu; hoặc dùng môi trường albumin cũng làm giảm đi lực đẩy của các hồng cầu. Mặt khác, có thể sử dụng các nhiệt độ thích hợp, pH thích hợp, nồng độ, thời gian tiếp xúc thích hợp với từng loại kháng thể, từng loại kháng nguyên, từng loại phản ứng nhằm đạt hiệu quả tối đa. Thí dụ nhiệt độ thuận lợi cho các kháng thể ngưng kết lạnh là 4°C đến 10°C, nhiệt độ tốt nhất cho các kháng thể nóng là từ 37°C đến 40°C. Tuy nhiên có loại kháng thể có biên độ hoạt động nhiệt khá rộng, có thể từ 4°C đến 37°C, tuy vậy vẫn có phạm vi tối ưu của nó. Với pH thường là từ 5,5 đến 8,5.

Ngoài phạm vi nói trên của nhiệt độ và pH, phản ứng miễn dịch bị giảm rõ rệt, thậm chí mất hoàn toàn, thí dụ như đưa nhiệt độ tới 56°C thì mọi kháng thể đều tách rời khỏi hồng cầu, dù là loại kháng thể nóng hay lạnh. Vì vậy thường dùng phương pháp tách ở 56°C để thu lại kháng thể từ cụm ngưng kết hoặc từ phản ứng gắn trước đó.

Chương 2

CÁC HỆ NHÓM HỒNG CẦU

HỆ NHÓM ABO

I. LỊCH SỬ

Năm 1900, Karl Landsteiner phát hiện hệ nhóm máu ABO, mở đầu cho kỷ nguyên truyền máu. Thoạt tiên, K. Landsteiner xác định 2 kháng nguyên A và B, cùng với hai kháng thể tương ứng là Anti-A và Anti-B, từ đó có 3 nhóm hồng cầu A, B và O:

- Nhóm A: Trên hồng cầu có kháng nguyên A, được ngưng kết bởi các kháng thể Anti-A.
- Nhóm B: Trên hồng cầu có kháng nguyên B, được ngưng kết bởi Anti-B
- Nhóm O: Trên hồng cầu không có cả kháng nguyên A và kháng nguyên B, không ngưng kết với Anti-A và Anti-B, vì vậy được gọi là O, với nghĩa không A, không B.

Đến năm 1902, Von Decastella và Sturli học trò của K. Landsteiner, phát hiện thêm nhóm thứ tư: Nhóm AB. Hồng cầu thuộc nhóm này có cả hai kháng nguyên A và B và ngưng kết với cả Anti-A và Anti-B. Các tác giả đã hoàn chỉnh bước đầu hệ nhóm này gồm 4 nhóm hồng cầu như sau:

- Nhóm A: Trên hồng cầu có kháng nguyên A, ngưng kết tất yếu với kháng thể Anti-A đồng thời trong huyết thanh có kháng thể Anti-B, không có kháng thể Anti-A.

– Nhóm B: Trên hồng cầu có kháng nguyên B, ngưng kết tất yếu với kháng thể Anti-B, đồng thời trong huyết thanh có kháng thể Anti-A, không có kháng thể Anti-B.

– Nhóm AB: Trên hồng cầu có hai kháng nguyên A và B, ngưng kết tất yếu với cả hai kháng thể Anti-A và Anti-B, đồng thời trong huyết thanh không thể có một kháng thể nào dù là Anti-A hay Anti-B.

– Nhóm O: Trên hồng cầu không có cả hai kháng nguyên A và B, đồng thời trong huyết thanh có mặt cả hai kháng thể Anti-A và Anti-B. (Xem bảng 2.1).

Bảng 2.1. Định nhóm máu hệ ABO

Thí nghiệm pháp hồng cầu (Beth Vincent) dùng các huyết thanh thí nghiệm			Thí nghiệm pháp huyết thanh (Simoni) dùng các hồng cầu thí nghiệm			Nhóm máu
Anti-A	Anti-B	Anti-A+B	Hồng cầu A	Hồng cầu B	Chứng (HCO)	
+	-	+	-	+	-	A
-	+	+	+	-	-	B
-	-	-	+	+	-	O
+	+	+	-	-	-	AB

II. DI TRUYỀN VÀ TÍNH KẾ THỪA

Tính di truyền và kế thừa nhóm máu thuộc hệ ABO đã được Epstein và Ottenberg nêu ra từ năm 1908, tiếp đến Von Dungern và Hirschfeld chứng minh năm 1910, nhưng đến năm 1924 Bernstein mới xác định rõ 3 gen allele là A, B, O, di truyền và kế thừa theo luật Mendel. Đến nay các tác giả phương Tây đều công nhận có ít nhất 4 gen allele là A1, A2, B và O (bảng 2.2a và 2.2b).

**Bảng 2.2a. Tần số nhóm máu ABO ở một số dân tộc
(MOURANT và CS 1976)**

Dân tộc (số người được định nhóm máu)	% kiểu hiện khác nhau						Đặc điểm riêng
	O	A1	A2	B	A1B	A2B	
Người da Đỏ Nam Mỹ (539)	100	0	0	0	0	0	Tất cả là O
Việt Nam (220)	45	21,4	0	29,1	4,5	0	Không có A2, B và A gần ngang nhau
Người Aborigines Úc (126)	44,4	55,6	0	0	0	0	
Đức (100 000)	42,8	32,5	9,4	11,0	3,1	1,1	Không có A2 và B
Bengal (240)	22,0	22,2	1,6	38,2	14,8	0,9	B cao nhất
Lapps (324)	18,2	36,1	18,5	4,8	6,2	6,2	A2 rất cao

Bảng 2.2b. Tần số nhóm máu ABO (Tỷ lệ %)

Nhóm máu	Người da trắng	Người da đen	Người da đỏ (Mỹ)	Người Phương Đông	Người Việt Nam*
O	45	49	79	40	48
A	40	27	16	28	20
B	11	20	4	27	28
AB	4	4	<1	5	4

* Hàng số sinh học người Việt Nam (Bộ Y tế, 1975).

Bernstein chứng minh rằng mỗi người đều kế thừa hai gen ABO, mỗi gen từ một cha hoặc mẹ, những gen này quyết định các kháng nguyên ABO có mặt trên hồng cầu.

Gen A và gen B cùng có tính di truyền trội (co-dominant) còn Gen O không tạo nên sản phẩm kháng nguyên nên gọi là gen amorphic (vô định hình). Vì vậy tạo ra những kiểu hiện và kiểu di truyền (Genotype, Phenotype) với điều kiện như sau:

Bảng trên nói lên rằng khi định nhóm hồng cầu của một người là A hoặc B, người ta mới chỉ xác định kiểu hiện (Phenotype) mà chưa xác định được kiểu di truyền (Genotype) vì kiểu di truyền của người nhóm A có thể là AA (đồng hợp tử) hoặc AO (dị hợp tử). Còn khi định nhóm hồng cầu của một người là AB hoặc O, người ta đã đồng thời xác định cả kiểu hiện và kiểu di truyền: Nhóm AB bắt buộc phải là dị hợp tử, nhóm O bắt buộc phải là di truyền đồng hợp tử OO. (xem bảng 2.3)

Bảng 2.3. Kiểu hiện và kiểu di truyền nhóm máu ABO

Kiểu hiện (Phenotype)	Kiểu di truyền (Genotype)
A	AA
	AO
B	BB
	BO
AB	AB
O	OO

III. SINH HOÁ CÁC KHÁNG NGUYÊN NHÓM MÁU

Các kháng nguyên nhóm hồng cầu hệ ABO là các chất đa đường (mucopolysaccharides). Những kháng nguyên A và B trên bề mặt hồng cầu, chỉ có thể xuất hiện nếu có tác động của gen H. Trong cơ thể có sẵn một tiền chất mucopolysaccharide (precursor mucopolysaccharide substance). Gen H chuyển chất này thành chất H nhờ một men đặc hiệu. Chỉ có trên nền chất H đó, các gen A và B mới tác động bằng những men đặc hiệu của

minh dễ biến đổi chất H thành các chất A và B. Mức độ biến đổi này có thể rất nhiều, có thể rất ít tạo ra các kháng nguyên A mạnh, A yếu, B mạnh, B yếu khác nhau. Nếu không có tác động của các gen A và B thì chất H còn nguyên không bị biến đổi, đó là trường hợp nhóm O, vì vậy người ta gọi gen O là gen vô định hình (amorphic), thực chất những người nhóm O là có gen H, gen H tạo ra chất H trên hồng cầu. Nếu định nhóm hồng cầu với Anti-H, sẽ tạo được kết quả trình tự như sau:

Độ ngưng kết của Anti-H với O là cao nhất rồi đến với A2, A2B, B, A1 thấp nhất là với A1B.

(O > A2 > A2B > B > A1 > A1B)

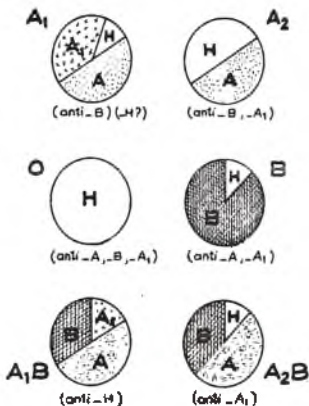
Điều trên có nghĩa chất H ở hồng cầu O còn lại nguyên vẹn, giảm dần theo thứ tự A2, A2B, B, A1, A1B.

Tiền chất gồm 4 phân tử đường: 1 phân tử N-acetyl-galactosamine, 1 phân tử N-acetyl-glucosamine và phân tử D-galactose (xem hình 2.1)

Bằng vận hành một men chuyển đường đặc hiệu (glucosyl transferase), gen H gắn thêm một phân tử đường L-fucose vào phân tử D-galactose tận cùng, tạo nên chất H.

Xem bảng 1.3 thấy rõ từ tiền chất (precursor substance), các gen Sese, Lele, H, A, B lần lượt tác dụng, phối hợp xen kẽ, liên quan mật thiết với nhau để tạo ra hoặc không tạo ra các yếu tố Le^a Le^b, H, A, B hoà tan trong các dịch sinh lý của cơ thể. Người ta mới biết được sự tổng hợp này trong các tế bào niêm mạc của tuyến nước bọt, các yếu tố tổng hợp đều ở dạng hoà tan và có mặt trong các dịch tiết. Còn sự tổng hợp trong các hồng cầu non thì chưa được biết hết vì tách được các yếu tố đó từ hồng cầu ra khó và công phu hơn nhiều. Tuy nhiên về tính đặc hiệu thì chắc chắn là giống nhau. Có khác chăng là ở chỗ các gen chi phối đối với các yếu tố hoà tan thì đã biết là do sự chi phối của

các gen Se, Le, H, A, B. Người ta đã biết rằng một sản phẩm cuối cùng có thể do hai hoặc nhiều loại tế bào, hai hoặc nhiều loại gen đặc hiệu cùng tổng hợp ra.



Hình 2.1. Sơ đồ minh họa KN: H, A_1 , A, B

IV. CÁC KHÁNG NGUYÊN THUỘC HỆ ABO

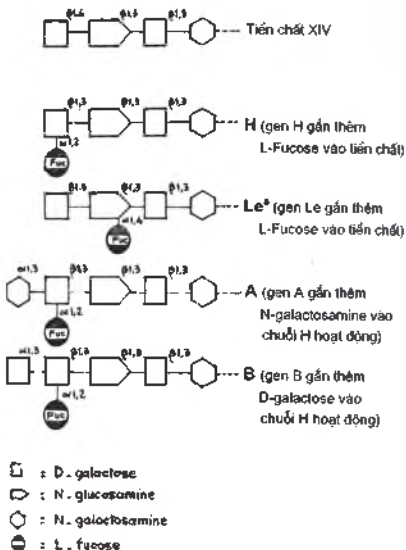
Các kháng nguyên A, B, H có thể phát hiện được từ lúc còn là bào thai 5 đến 6 tuần, trong suốt thời kỳ bào thai không tăng là mấy, chỉ từ khi sau sinh mới tăng dần, nhưng phải từ 2 đến 4 năm sau mới phát triển tới mức ổn định và tồn tại hàng định suốt cuộc đời.

Vị trí của các kháng nguyên A,B,H trên hồng cầu đã được nhiều tác giả nghiên cứu: Greenbury năm 1963, Economidou năm 1967, Carton năm 1974, Schenkel-Brunner năm 1980. Số lượng vị trí kháng nguyên A (trên hồng cầu A₁), của người trưởng thành ước tính vào khoảng 850.000. Số lượng vị trí kháng nguyên B (trên hồng cầu nhóm B) cũng tương tự. Số lượng vị trí kháng nguyên H (trên hồng cầu O) khoảng gấp đôi. Việc tính này dựa trên số lượng phân tử kháng thể dùng để kết hợp với kháng nguyên hồng cầu, với giả định rằng một phân tử kháng thể gắn với một vị trí kháng nguyên. Cách này không phản ánh thực tế lắm vì có nhiều bằng chứng rằng Anti-A và Anti-B gắn với hai vị trí kháng nguyên của hồng cầu. Schenkenl-Brunner dùng men đặc hiệu A-glucosyltransferase đánh dấu bằng C¹⁴ để tính số lượng vị trí kháng nguyên A .v.v. Từ đó có số liệu đáng tin cậy để so sánh số vị trí kháng nguyên A,B của hồng cầu người lớn với hồng cầu của trẻ sơ sinh, chỉ xấp xỉ 1/3. Năm 1976, Carton cho số liệu về vị trí kháng nguyên A của các hồng cầu thuộc các dưới nhóm của A như sau:

A ₁	:	850.000	
A ₂	:	240.000	- 290.000
A ₃	:	35.000	
A _x	:	4.800	
A _{end}	:	3.500	
A _m	:	700	

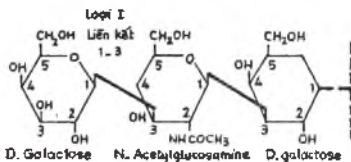
Dựa vào kết quả trên, có thể tóm lại rằng A_1 là mạnh nhất vì số lượng vị trí kháng nguyên cao nhất, A_2 đứng thứ hai, nhưng từ A_3 trở đi có thể gọi chung là các A yếu. So với A_1 thì A_2 cũng đã là A yếu hơn hẳn.

Cũng bằng một men chuyển đường đặc hiệu của mình, gen A hoặc gen B gắn một phân tử đường đặc hiệu vào chất H ở vị trí D-galactose tận cùng. Nếu là gen A thì gắn đường N-acetyl-galactosamin, nếu là gen B thì gắn đường D-galactose (xem hình 2.2 và 2.3). Nói các khác, khi có mặt của gen A thì chất H sẽ được chuyển thành chất A bằng cách gắn thêm vào chất H một đường N-acetyl-galactose; khi có mặt của gen B thì chất H sẽ được chuyển thành chất B bằng cách gắn thêm vào chất H một đường D-galactose. Khi không có mặt cả gen A và gen B thì chất H không chuyển thành A hoặc B được, còn nguyên vẹn chất H, đó là hồng cầu nhóm O thông thường. Hồng cầu nhóm O thông thường không có nghĩa là không có gì, mà chỉ có nghĩa là không có chất A hoặc chất B nhưng lại có chất H vì chất H là nền của các chất A và B. Có những trường hợp hiếm hủ, đó là nhóm O_h (kiểu hiện Bom bay), hồng cầu không có chất H, khi đó dù có mặt gen A hoặc gen B nhưng hồng cầu vẫn xác định nhóm là O vì đã không có chất H làm nền thì gen A hoặc B đều không thể tác động để tạo ra hoạt tính A hoặc B được. Nhóm O_h rất hiếm, lần đầu tìm thấy ở Bombay năm 1962, tuy ở nhiều nước không có ý nghĩa thực tiễn, nhưng lại mang một giá trị lý thuyết rất quan trọng sáng tỏ về hệ ABO.

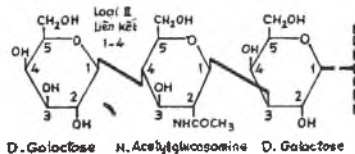


Hình 2.2. Cấu trúc của các kháng nguyên nhóm máu (Watkins, Ceppellini)

1. Chuỗi loại I



2. Chuỗi loại II



Hình 2.3. Sơ đồ minh họa chuỗi loại I và II

- Chuỗi loại I: Liên kết 1-3 giữa D. galactose tận cùng và N-acetyl glucosamine
- Chuỗi loại II: Liên kết 1-4 giữa 2 phân tử đường tương tự

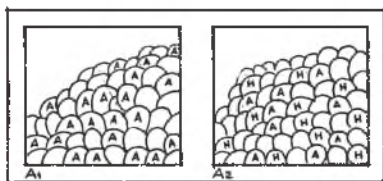
Hồng cầu Oh không bị ngưng kết bởi Anti - A, Anti - B, Anti - H, nhưng trong huyết thanh lại có mặt cả Anti - A, Anti - B và Anti - H, vì vậy gây ngưng kết tất cả mọi hồng cầu dù là A, B, O hay AB.

Sau nhiều năm nghiên cứu, Cepellini đã nêu giả thiết về sự có mặt 1 gen vô định hình (amorphic) không sinh ra yếu tố H, hoặc ức chế gen H không hoạt động. Giả thiết này được Levine và cộng sự chứng minh thực tế qua nhiều công trình thực nghiệm. Tới nay đã đi đến xác nhận những điều sau đây:

- Có một số quan hệ mật thiết giữa 3 hệ: hệ ABO (hay ABH), hệ Lewis và hệ Sese (hệ tiết yếu tố ABH). Những yếu tố A, B, H loại hoà tan trong nước (hydrosoluble) đều có thể có mặt trong các dịch sinh lý của cơ thể như nước bọt, huyết thanh, sữa, dịch u nang buồng trứng v.v hoặc không có mặt tuỳ theo người đó có mang gen Se hoặc Sese. Hệ Sese được gọi là hệ tiết ABH. Mối liên quan được thiết lập như sau: Khi một người thuộc loại không tiết yếu tố ABH, nghĩa là mang gen đồng hợp tử sese thì không có mặt các yếu tố A, B, H trong các dịch tiết mặc dù có đủ các gen H, A hoặc B. Khi một người thuộc loại tiết, nghĩa là gen Se, dù SeSe hay Sese, gen H hoạt động và chỉ khi đã có yếu tố H thì gen A, B mới phát huy tác dụng của mình. Khi ấy, nếu không có gen A và B thì chất H không bị biến đổi, gọi là người nhóm O. Nhưng nếu không có cả gen H (những người đồng hợp tử hh) thì được ký hiệu là O_h . Tuỳ theo những người O_h này có gen A, gen B hay không mà có những nhóm O_h^A , O_h^B , O_h^{AB} . Ở những người sese, nếu có mặt gen Le thì yếu tố Le^a sẽ có mặt trong các dịch tiết (thí dụ nước bọt) và hồng cầu sẽ là Le^a , nhưng nếu không có mặt gen Le, nghĩa là thuộc loại đồng hợp tử lele thì yếu tố Le^a cũng không có mặt trong các dịch tiết, do đó hồng cầu phải là Le^b . (Xem hệ Lewis)

1. A_1 và A_2

Được Dungern và Hirschfeld phát hiện từ năm 1911, cho tới nay vẫn là hai dưới nhóm chủ yếu, nhiều ứng dụng thực tế nhất. Sự khác biệt giữa A_1 và A_2 chủ yếu là do lượng chuyển yếu tố H khác nhau, với A_1 thì lượng yếu tố H chuyển mạnh hơn, với A_2 thì ít hơn (hình 2.4). Nếu dùng Anti - H cho "chạy" với hồng cầu A_1 sẽ cho kết quả âm tính hoặc dương tính rất yếu, nhưng cho chạy với hồng cầu A_2 thì kết quả dương tính khá rõ.



Hình 2.4. Sơ đồ minh họa điều kiện A_1 và A_2

- HC A_1 : Men N - acetyl galactosaminyl transferase chuyển kháng nguyên H thành kháng nguyên A nhiều hơn
- HC A_2 : Men N - acetyl galactosaminyl transferase kém hiệu lực nên ít kháng nguyên A, còn lại nhiều kháng nguyên H hơn.

Mặt khác lại thấy sự khác biệt không thuần túy số lượng vì trong huyết thanh những người nhóm A_2 đôi khi có mặt anti- A_1 tự nhiên. Theo Race và Sanger cho rằng:

Nhóm	Kháng nguyên	Anti-A	
		Anti- A_1	Anti- A_2
A_1	A, A_1	+	+
A_2	A	+	-

Theo bảng trên, phải hiểu rằng trong huyết thanh Anti-A của người nhóm B hoặc nhóm O gồm 2 kháng thể là Anti-A và Anti-A₁. Trên hồng cầu nhóm A₁ có hai kháng nguyên là A và A₁. Nếu đem huyết thanh Anti-A của người nhóm B hoặc nhóm O gán với hồng cầu A₁ thì các kháng thể sẽ tiêu thụ hết, không còn lại gì, nhưng nếu đem huyết thanh Anti-A đó gán với hồng cầu A₂ thì chỉ gán được phần kháng thể Anti-A thôi, còn lại Anti-A₁ (xem trên mục hệ P).

Ở các nước phương Tây (Áu, Mỹ) trong ứng dụng phổ thông, người ta xác định 6 loại nhóm thuộc hệ ABO là A₁, A₂, A₁B, A₂B, O và B vì tần suất nhóm A₂ và A₂B khá cao (20%). Hơn nữa trong huyết thanh những người A₂ và A₂B lại rất hay có mặt Anti-A₁ tự nhiên rất dễ gây tai biến không hợp nhóm thuộc hệ ABO trong huyết mầu (từ 20 đến 30%).

Ở Việt Nam, có khác. Theo tài liệu của Bạch Quốc Tuyên và Nguyễn Đình Lượng thì ở người Việt Nam không thấy có A₂ hoặc A₂B. Một số tác giả khác cho kết quả điều tra từng địa phương cũng thống nhất như vậy. Trong khi chờ đợi một kết quả nghiên cứu trên quy mô rộng lớn khắp mọi miền đất nước và dân số, chúng ta đã có cơ sở bước đầu để xác định 4 loại nhóm A, B, AB và O.

2. Các A yếu: A₁, A₂, A_m v.v

- A₁: Friedenreich phát hiện đầu tiên nhóm A₁ năm 1936, từ đó phát hiện nhóm A, B. Các hồng cầu A₁ ngưng kết rất yếu, rất ít với kháng thể có trong huyết thanh Anti-A, rất khó nhận thấy vì đa số hồng cầu tự do không ngưng kết. Hồng cầu A₂ không ngưng kết với Anti-A₁. Ngược lại, với Anti-H thì hồng cầu A₁ ngưng kết mạnh hơn cả hồng cầu A₂. Trong huyết thanh người A₁ đôi khi cũng có Anti-A₁ tự nhiên.

- A_2 : Gồm 1 loạt A_4, A_6, A_8, A_{10} , gọi chung một tên A_x : Fischer và Hahn mô tả năm 1930. Phản ứng rất yếu hoặc không phản ứng với huyết thanh Anti-A, thường định nhóm lầm là O vì 2 lý. Khi làm nghiệm pháp hồng cầu thì không ngưng kết với Anti-A, khi làm nghiệm pháp huyết thanh thì huyết thanh có thể gây ngưng kết với hồng cầu A_1 .

- $A_{\text{int}}, A_{\text{end}}, A_{\text{homin}}$: tất cả đều là các dưới nhóm rất yếu, ít có ý nghĩa thực tế trong truyền máu, chỉ có giá trị trong di truyền học, nhân chủng học và các nghiên cứu khoa học (xem các tài liệu chuyên sâu của Race Sanger, Mollison, Salmon).

3. Các nhóm B yếu (dưới nhóm của B)

Với kháng nguyên B, người ta không thấy các dưới nhóm giống như đối với A, vì thế trong truyền máu thường không được nhắc tới. Tuy nhiên từ năm 1976 Salmon.C cũng đề nghị sử dụng các thuật ngữ dưới nhóm của B. Thí dụ B_3, B_1, B_{11} . Tuy các dưới nhóm này không hoặc rất ít gây ngưng kết với Anti-B, các kháng nguyên B yếu cũng không phát hiện được trong nước bọt của những người "tiết", vẫn có ý nghĩa trong học thuật. Người ta vẫn có thể dùng kỹ thuật gán và tách để nghiên cứu phát hiện những kháng nguyên yếu này.

V. CÁC KHÁNG THỂ THUỘC HỆ ABO

Theo quy luật tự nhiên, những người có hồng cầu mang những kháng nguyên A, B hoặc H thì trong huyết thanh nhất thiết có mặt những kháng thể ứng với những kháng nguyên không có trên hồng cầu của bản thân, ngược lại nhất thiết không có mặt những kháng thể ứng với những kháng nguyên có trên hồng cầu của bản thân. Cụ thể là người có hồng cầu mang kháng nguyên A, nhất thiết có kháng thể Anti-B trong huyết thanh, không thể có Anti-A; người có hồng cầu mang kháng nguyên B, nhất thiết có kháng thể Anti-A trong huyết thanh,

không thể có Anti-B; người có hồng cầu mang kháng nguyên H (tức là nhóm O) nhất thiết trong huyết thanh có mặt cả Anti-A và Anti-B; người có hồng cầu mang kháng nguyên A và B, nhất thiết không có Anti-A hoặc Anti-B trong huyết thanh. Dựa trên quy luật tự nhiên tuyệt đối này mà người ta có hai nghiệm pháp để xác định nhóm thuộc hệ ABO: nghiệm pháp hồng cầu (Beth Vincent) và nghiệm pháp huyết thanh (Simonin) (Xem phần định nhóm).

1. Quá trình phát triển của Anti-A và Anti-B

Người ta cho rằng những chất có "tính đặc hiệu" A, B, H có nhiều và phổ biến trong thiên nhiên (màng hồng cầu, thành các tế bào vi khuẩn, thức ăn, lông thú, bụi trong môi trường quanh con người). Các kháng nguyên này đã xâm nhập cơ thể từ những ngày đầu của đời sống bào thai, khiến cơ thể con người tạo ra những kháng thể tương ứng. Các kháng thể này được hình thành và phát triển dần lên, khi sinh ra đời đã có sẵn nên được coi là các kháng thể tự nhiên. Kháng thể đó chỉ có thể không tương ứng với những kháng nguyên mà cơ thể sẵn có, thí dụ một người O_h (không có kháng nguyên H) mới có thể có Anti-H trong huyết thanh. Người A_1 hoặc A_1B vì có quá ít kháng nguyên H nên đôi khi cũng thấy có Anti-H trong huyết thanh, tuy nhiên Anti-H này rất yếu so với Anti-H của người O_h .

2. Anti- A_1

Kháng thể Anti- A_1 có thể tách được từ huyết thanh Anti-A của người nhóm máu O hoặc B (như phần kháng nguyên A_1 đã nói) bằng cách hấp thụ huyết thanh Anti-A với hồng cầu A_2 nhưng thường thì Anti- A_1 thu được theo cách này rất yếu, chỉ có thể đủ cho việc chẩn đoán, không đủ để dùng làm nguồn thuốc thử định nhóm A_1 . Người ta đã thử gán nhiều lần Anti- A_1 tự nhiên với hồng cầu A_2 thì đến một lúc nào đó kháng thể đó cũng

bị giảm dần rồi mất hẳn hoạt tính. Vì lẽ đó Anti-A₁ dùng để làm huyết thanh nghiệm thường được chế tạo từ hạt *Dolichos Biflorus* (Lectin).

3. Thời điểm xuất hiện và tiến triển của Anti-A và Anti-B

Thông thường, các kháng thể nhóm máu bắt đầu được tạo ra sau khi sinh, tăng dần cường độ đến tuổi thứ 5, thứ 6 rồi từ đó giữ mức hằng định suốt đời, khi tuổi già lại giảm dần. Vậy đáng lưu ý khi định mức ở những trẻ mới sinh trong vòng 4 đến 6 tháng nếu thấy hoạt tính Anti-A, Anti-B thấp là bình thường, ngược lại nếu thấy cao thì phải cảnh giác với loại Anti-A hoặc Anti-B miễn dịch (chủ yếu hay gặp là Anti-A miễn dịch), từ huyết thanh mẹ qua màng nhau sang tuần hoàn thai nhi.

4. Anti-A, Anti-B tự nhiên và miễn dịch

Các kháng thể Anti-A và Anti-B tự nhiên, bản chất hoá học là IgM, hình thành tự nhiên, từ khi là thai nhi, không qua màng nhau thai được, nên không có khả năng từ tuần hoàn mẹ sang tuần hoàn thai nhi, hằng định suốt đời (xem mục I và V).

Các kháng thể Anti-A, Anti-B (chủ yếu là Anti-A) loại miễn dịch, bản chất hoá học là IgG không hình thành tự nhiên mà phải sau một quá trình đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên lạ xâm nhập vào, cụ thể trong hai trường hợp sau đây:

- Không cùng nhóm máu giữa mẹ và thai nhi, thí dụ mẹ nhóm O, thai nhi nhóm A. Trong quá trình sinh, hồng cầu thai nhi có thể qua tuần hoàn của mẹ ít hay nhiều, gây miễn dịch cho mẹ, từ đó cơ thể mẹ thông qua đáp ứng của hệ miễn dịch mà tạo ra kháng thể Anti-A miễn dịch.

- Những người không có kháng nguyên A, bị những chất mang kháng nguyên A trong thiên nhiên xâm nhập cơ thể. Những sản phẩm sinh học của vi khuẩn, của virus, những

thành phần trong protein của các vaccin, các huyết thanh phòng và chữa bệnh chế từ các động vật tiêm chủng cho người, những thành phẩm huyết tương tươi và khô, những trường hợp không hoà hợp ABO đều có thể là những nguồn đưa kháng nguyên A vào cơ thể và tạo ra những kháng thể Anti-A, Anti-A. Đó là kháng thể miễn dịch. Anti-B miễn dịch cũng được tạo ra theo cách trên, nhưng hiếm xảy ra so với Anti-A. Các kháng thể miễn dịch khác với kháng thể tự nhiên ở chỗ qua màng nhau thai từ tuần hoàn mẹ sang tuần hoàn thai nhi, hoạt tính mạnh ở 37°C và trong môi trường albumin, cường độ, hiệu giá và độ nhạy cao hơn nhiều, hoạt tính huyết tán mạnh hơn, nếu cứ bị kích thích nhắc nhở thì hoạt tính cao lên, nhưng nếu không bị nhắc nhở sẽ giảm dần đến mất hẳn.

Bảng 2.4. So sánh các đặc tính của Anti-A1, Anti-B tự nhiên và miễn dịch

Đặc tính của Anti-A, Anti-B tự nhiên	Đặc tính của Anti-A, Anti-B miễn dịch
Bản chất hoá học là IgM	Bản chất hoá học là IgG
Không qua màng nhau thai	Qua màng nhau thai
Làm phản ứng 4°C: +	Làm phản ứng ở 4°C: -
Làm phản ứng 37°C: +	Làm phản ứng ở 37°C: +++
Phản ứng trong albumin: +	Trong albumin: +++
Có bị ức chế bởi kháng nguyên A hoặc B hoà tan	Không bị ức chế bởi kháng nguyên A hoặc B hoà tan
Không kèm hemolysin	Thường kèm theo hemolysin
Phản ứng với môi trường muối 22°C ngưng kết: ++	Phản ứng ở môi trường muối 22°C ngưng kết: ++
Có bị bất hoạt bởi 2ME (2Mercapto ethanol)	Không bị bất hoạt bởi 2ME

Qua bảng trên, cần rút ra kết luận thực tế là nếu làm xét nghiệm bằng phản ứng ngưng kết thông thường trong môi trường muối ở 22°C thì không phát hiện được các kháng thể

miễn dịch. Muốn phát hiện, thường dùng xét nghiệm hemolysin đầu tiên đơn giản và dễ làm nhất vì thường các kháng thể miễn dịch kèm theo hemolysin. Sau, tới kỹ thuật ức chế và so sánh độ ngưng kết ở môi trường albumin, nhiệt độ 37°C.

Các kháng thể miễn dịch Anti-A, Anti-B (nhất là Anti-A) thường gặp ở người nhóm máu O, vì vậy những người này được gọi là người có nhóm máu O nguy hiểm, không dùng để truyền phổ thông như nhóm O thông thường. Các kháng thể miễn dịch cũng có thể gặp cả trong những người nhóm A hoặc B nhưng hiếm hơn. Do đó trong định nhóm, chủ yếu nhằm phát hiện Anti-A ở nhóm O để xác định những người mang nhóm O nguy hiểm.

5. Anti-H

Như ở mục 1 đã nói, Anti-H là kháng thể ứng với kháng nguyên H trên hồng cầu và cũng có mặt theo quy luật chung của hệ ABO là nếu trên hồng cầu vắng mặt kháng nguyên nào thì trong huyết thanh sẽ có mặt kháng thể ứng với kháng nguyên đó. Vậy trong huyết thanh của những người có nhóm hồng cầu A₁, A₁B có thể có Anti-H. Nhưng loại Anti-H này rất hiếm gặp và hoạt tính rất yếu. Vì thế Anti-H chỉ đáng kể trong huyết thanh của người nhóm O_b (Bombay), có hoạt tính mạnh và phạm vi nhiệt độ hoạt động rất rộng (từ 4°C đến 37°C), ngưng kết với mọi loại hồng cầu, ngưng kết mạnh nhất với tất cả các hồng cầu O, chỉ trừ hồng cầu O_b mà thôi. Tất nhiên người O_b có cả Anti-H, Anti-A, Anti-B trong huyết thanh, chỉ nhận được máu truyền của người O_b. Ở nước ta chưa phát hiện trường hợp nào O_b cả.

VI. PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH NHÓM MÁU HỆ ABO

Xác định nhóm máu hệ ABO là thường quy ở mọi cơ sở có làm công việc truyền máu. Cần định nhóm cả người cho máu và người nhận máu bằng hai nghiệm pháp sau đây: (bảng 2.5).

Bảng 2.5. Kết quả định nhóm máu ABO
(theo AABB technical manual)

Thử nghiệm hồng cầu (dùng huyết thanh thử nghiệm)			Thử nghiệm huyết thanh (dùng hồng cầu thử nghiệm)			Nhóm máu
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	HC A	HC B	HC O	ABO
-	-	-	+	+	-	O
+	-	+	-	+	-	A
-	+	+	+	-	-	B
+	+	+	-	-	-	AB

Ghi chú: + Có ngưng kết (dương tính)
 - Không ngưng kết (âm tính)
 Thử nghiệm huyết thanh với HC O
 Bao giờ cũng phải âm tính (-)

1. Thử nghiệm hồng cầu

Đây là thử nghiệm pháp sử dụng kỹ thuật trực tiếp (direct grouping), còn gọi là định nhóm xuôi (forward grouping), nhằm xác định kháng nguyên hệ ABO trên hồng cầu, quen gọi là thử nghiệm pháp Beth-Vincent. Nguyên lý kỹ thuật này là sử dụng những kháng huyết thanh đã chuẩn hoá chứa các kháng thể Anti-A, Anti-B, Anti-A+B đủ tiêu chuẩn mọi mặt để làm xét nghiệm, đem làm phản ứng ngưng kết với hồng cầu cần định nhóm. Những kháng huyết thanh đủ tiêu chuẩn như thế được gọi chung là huyết thanh thử nghiệm (serum-test) có nghĩa là đủ điều kiện để được sử dụng làm thuốc thử thử nghiệm pháp Beth-Vincent, là thử nghiệm pháp sử dụng huyết thanh nhằm xác định kháng nguyên trên hồng cầu. Căn cứ vào kháng thể đã biết chứa trong huyết thanh thử nghiệm, nếu sau tiếp xúc mà ngưng kết dương tính là hồng cầu mang kháng nguyên ứng với kháng thể đã biết, nếu ngưng kết âm tính là hồng cầu không mang kháng nguyên đó.

2. Nghiệm pháp huyết thanh

Nghiệm pháp này sử dụng kỹ thuật định nhóm huyết thanh (serum grouping), còn gọi là định nhóm ngược (reverse grouping), quen gọi là nghiệm pháp Simonin. Nguyên lý kỹ thuật này là sử dụng những hồng cầu mang kháng nguyên đã biết, làm phản ứng ngưng kết với huyết thanh của người cần định nhóm nhằm xác định sự có mặt hoặc không của kháng thể Anti-A, Anti-B trong huyết thanh, từ đó biết được kháng nguyên trên hồng cầu, theo cách ngược lại nghĩa là nếu không có mặt Anti-A trong huyết thanh thì hồng cầu không thể là A, nếu có mặt Anti-B trong huyết thanh thì hồng cầu không thể là B, nếu có mặt cả Anti-A, Anti-B trong huyết thanh thì hồng cầu phải là O, nếu không có mặt cả Anti-A, Anti-B trong huyết thanh thì hồng cầu phải là AB. Các hồng cầu dùng làm chuẩn để thử cũng phải là những hồng cầu đã xác định kháng nguyên chính xác để tiến hành nghiệm pháp, vì thế cũng được gọi là hồng cầu nghiệm (Globule-test). Đối với hệ ABO, người ta thường dùng các Hồng cầu nghiệm A, B, O hoặc A_1 , B và O.

Để đảm bảo chính xác và an toàn cao, với hệ ABO, yêu cầu những điều sau đây:

- Tiến hành đồng thời, song song cả hai nghiệm pháp nói trên, chỉ khi kết quả của cả hai nghiệm pháp hoàn toàn khớp mới kết luận, nếu không phải dùng các kỹ thuật cao hơn để xác định.

- Huyết thanh nghiệm phải đủ Anti- A_1 , (hoặc Anti-A), Anti-B, Anti- A_1B (hoặc Anti-AB). Hồng cầu nghiệm phải có đủ hồng cầu A_1 (hoặc A), B và O.

- Với một số trường hợp đặc biệt, cần sử dụng thêm huyết thanh người nhóm AB. Nói chung hồng cầu O và huyết thanh AB đều là những nguyên liệu dùng làm chứng (Control) vì trong huyết thanh người AB không có kháng thể nào thuộc hệ ABO,

trên hồng cầu O không có một kháng nguyên nào thuộc hệ ABO. Nếu với huyết thanh người nhóm AB và hồng cầu nhóm O mà thấy phản ứng dương tính khi làm các nghiệm pháp định nhóm, dù nhiều, dù ít đều phải nghi ngờ, điều tra sâu thêm xác định cho rõ, không thể kết luận ngay được. (Xem phần các kháng thể bất thường).

- Huyết thanh nghiệm cần đạt đủ 4 điều kiện tiêu chuẩn của quốc gia và quốc tế là độ nhạy (Avidity), độ mạnh (Potency), hiệu giá (Titre). Có nhiều cách tính, cách đánh giá. Nhiều tác giả sử dụng cách cho điểm (score) để dễ thống nhất.

- Hồng cầu nghiệm hoặc hồng cầu cần định nhóm (chủ yếu là hồng cầu nghiệm) khi dùng phải sử dụng hồng cầu mới, đã rửa sạch 3 lần bằng nước muối (9/1.000) rồi pha thành huyền dịch 5/100 đến 10/100. Tuy nhiên tùy theo từng chỉ định đối với từng trường hợp ứng dụng kỹ thuật mà có thể dùng các nồng độ huyền dịch khác nhau. 10/100, 20/100, 30/100, 50/100 hoặc 2/100 v.v

- Có thể tiến hành kỹ thuật định nhóm trên tấm hoặc trong ống. Trên tấm nghĩa là dùng một tấm men trắng (opahn) do các hãng chế tạo sẵn, to nhỏ tùy theo yêu cầu. Thường dùng cỡ vừa phải mỗi lần định nhóm được 5 mẫu nhóm. Nếu không sẵn tấm men opahn như thế, có thể dùng một viên gạch trắng hình vuông mỗi cạnh 15cm hoặc 2 viên như thế ghép lại thành một tấm hình chữ nhật. Phản ứng ngưng kết định nhóm được tiến hành bằng cách cho trộn huyết thanh với hồng cầu trên mặt tấm men, hiện tượng ngưng kết dương hay âm được quan sát trên nền men trắng. Thông thường, việc xác định nhóm có thể tin cậy với kỹ thuật trên tấm nếu làm đúng quy cách, không linh động. cụ thể là: làm đồng thời song song 2 nghiệm pháp định nhóm, dùng huyền dịch hồng cầu theo đúng quy định, sát cạnh nhau rồi dùng một đầu tròn của thìa thủy tinh, hoặc một vật gì tròn nhẵn như đầu đũa nhựa, đẩy một ống nghiệm trộn đều hồng cầu với huyết thanh trên một diện tròn từ 2cm đến

3cm đường kính, sau cùng cắm tám men đảo nhẹ nhàng tạo một sự tiếp xúc kháng nguyên/ kháng thể tối ưu và quan sát, đánh giá ghi kết quả. Tất cả những thao tác kỹ thuật đó phải thành thạo, khéo, nhanh, đúng vì đều có ảnh hưởng đến kết quả: Thí dụ nếu lượng huyết thanh hoặc hồng cầu không thích hợp thì sẽ thừa hoặc thiếu kháng nguyên, kháng thể, hiện tượng ngưng kết sẽ không thoả đáng, nếu hồng cầu không được rửa kỹ thì fibrinogen còn dính trên bề mặt hồng cầu sẽ có thể gây hiện tượng lắng với ngưng kết, tám men rửa không sạch, còn mỡ thì rất khó tạo diện tròn cho phản ứng hoặc các dịch lỏng sẽ chảy dài lẫn mẫu nọ với mẫu kia làm hỏng tất cả. Nhiệt độ phải từ 20°C đến 24°C để thuận lợi cho phản ứng vì ở nhiệt độ cao từ 35°C trở lên phản ứng ngưng kết sẽ yếu đi (kháng thể hệ ABO thông thường là loại hoạt động tối ưu ở nhiệt độ từ 4°C đến 25°C). Nếu ở xứ nóng, nhiệt độ phòng lên tới 35°C thì cần có điều hoà nhiệt độ, ít nhất cũng có một khoảng nhỏ trong phòng, dùng nước đá hạ nhiệt xuống dưới 30°C. Nếu thao tác chậm, mà nhiệt độ cao sẽ gây bay hơi nhanh, đọc kết quả dễ lầm. Nền trắng của tám men có ý nghĩa lớn, nếu bắt dặc dĩ phải dùng một lam kính trong suốt thì phải đưa lên một nền giấy trắng, bìa trắng và chỉ trên một nền trắng mới nhận định được ngưng kết mạnh, yếu, vừa ngưng kết vừa không, ngưng kết giả và các hiện tượng bất thường khác.

- Có thể tiến hành kỹ thuật định nhóm trong ống nghiệm, thường gọi là trong typ, có độ tin cậy cao hơn kỹ thuật trên tám vừa nói. Tuy nhiên đòi hỏi phương tiện, dụng cụ cao hơn, cụ thể là các typ có thể ly tâm được, máy ly tâm. Với kỹ thuật này, các nguyên liệu cũng giống như kỹ thuật trên tám (huyết thanh, hồng cầu), hồng cầu cũng rửa và pha thành huyền dịch thích hợp, nhưng khác ở chỗ phản ứng ngưng kết tiến hành trong typ. Thường dùng loại typ Kahn, mỗi mẫu máu cần 5 đến 6 tub. Nhỏ vào mỗi ống từ 1 đến 2 giọt huyết thanh hoặc huyền dịch hồng cầu, ly tâm nhẹ khoảng từ 1.500 đến 2.000 vòng/phút trong 3 phút. Đọc kết quả có thể bằng mắt thường (đại thể) hoặc qua

kính hiển vi (vĩ thể). Nếu đại thể thấy có bất thường, nghi vấn hoặc là đối với những kháng thể bất thường ngoài hệ ABO (xem Chương 4: Phát hiện và xác định các kháng thể bất thường).

VII. NHỮNG TRƯỜNG HỢP BẤT THƯỜNG KHI XÁC ĐỊNH NHÓM MÁU HỆ ABO

Một khi kết quả của 2 nghiệm pháp định nhóm ABO (nghiệm pháp hồng cầu và nghiệm pháp huyết thanh) có một chút gì không phù hợp hoặc đáng nghi vấn, không được kết luận mà nhất thiết cần điều tra nghiên cứu tiếp bằng những kỹ thuật sâu hơn. Nếu mẫu máu đó là của người cho máu thì phải loại khỏi diện sử dụng cho tới khi xác định rõ những bất thường ấy. Nếu mẫu máu đó là của người cần được truyền máu gấp thì có thể chỉ định dùng hồng cầu O hoặc tối nhất hồng cầu O đã loại huyết tương. Song song tiến hành xác định rõ những bất thường như trên, điều quan trọng là khi lấy những mẫu máu để định nhóm trước khi truyền máu, phải lấy đủ hồng cầu và huyết thanh để có nguyên liệu cho các điều tra nghiên cứu tiếp theo. Thường nên lấy từ 5 đến 10 ml máu, vừa chống đông, vừa để đông, khoảng một nửa chống đông, một nửa để đông, như vậy có đủ nguyên liệu hồng và huyết thanh cho những xét nghiệm tiếp khi cần đến.

Sai lệch kết quả trong định nhóm máu thường do 3 khâu: kỹ thuật, hồng cầu, huyết thanh.

1. Do khâu kỹ thuật

Khâu này bao gồm các sai sót chủ quan trong việc tiến hành kỹ thuật như: Lầm lẫn máu, lầm thuốc thử, ghi chép sai, không tuân theo những quy tắc kỹ thuật nghiêm ngặt, nhận định sai dương tính và âm tính, không xác định được những hiện tượng dương tính giả và âm tính giả, sử dụng những vật phẩm và dụng cụ bị ô nhiễm, sử dụng trong phản ứng những tỷ lệ lượng

kháng nguyên và lượng kháng thể không tương xứng, ly tâm quá mức hoặc chưa đủ mức, trình độ non yếu khi nhận định kết quả không phát hiện những hiện tượng huyết tán ức chế và che lấp ngưng kết, những trường hợp dân số kép (double population) v.v những hình ảnh chuỗi tiền (rouleaux formation).

2. Do hồng cầu

- Khi có chỉ định kỹ thuật pha mẫu hồng cầu trong huyết thanh của chính mình, hoặc trong môi trường protein phân tử lớn, cũng như các mẫu máu lấy từ dây rốn của trẻ sơ sinh có chất nhầy Wharton (Whartons Jelly), có thể gặp những hình ảnh chuỗi tiền (rouleaux formation), dễ lầm với ngưng kết.

- Định nhóm bằng những mẫu máu lấy từ người vừa nhận máu truyền (nhất là ở những người không phải nhóm O mà nhận máu O, hoặc những người nhóm AB mà nhận máu A hoặc B trong những trường hợp cấp cứu), sẽ có thể thấy hình ảnh vừa ngưng kết, vừa không (2 dân số = Double population) dễ dẫn tới nhận định sai nếu không nghiên cứu điều tra cẩn thận. Đặc biệt là khi xảy ra tai biến hoặc biến cố trong truyền máu thấy thuộc chuyên khoa được mời đến xác định vấn đề.

- Những mẫu hồng cầu thuộc nhóm A yếu, B yếu.

- Những mẫu hồng cầu có bề mặt bất thường do di truyền bẩm sinh, hoặc do mắc phải.

- Những mẫu hồng cầu mang kháng nguyên giống B (B like Antigen). Năm 1975 A.Gerbal và cộng sự đã nghiên cứu một số trường hợp, thấy rằng trên một số mẫu hồng cầu mang kháng nguyên A nhưng kháng nguyên A này được chuyển một phần qua hoạt tính của kháng nguyên B. Năm 1976, các tác giả thực nghiệm xử lý hồng cầu A₁ bằng men Deacetylase thì làm mất đi hoạt tính A, chuyển sang hoạt tính B. Tiếp đó các tác giả gắn lại acetyl thì chuyển qua hoạt tính A₁ (phản ứng ngưng kết

với lectin Anti-A, chiết từ đậu *Dolichos Biflorus*). cuối cùng đi đến nhận xét rằng loại kháng nguyên giống B đó thuộc loại Deacetyl type tức là do bị khử acetyl, chỉ thấy xuất hiện trên những hồng cầu A, có thể thực nghiệm trong ống nghiệm, có thể gắp trên lâm sàng ở những người bệnh nhóm máu A mắc các bệnh tắc ruột do viêm, do ung thư đại trực tràng, do tinh thâm thành ruột tăng lên, các men của vi khuẩn dễ xâm nhập tuần hoàn, trong số này có các men khử acetyl của phân tử N. acetyl galactosamin tặn cùng, chuyển thành D. galactosamin, có nghĩa là chuyển hoạt tính kháng nguyên A qua hoạt tính kháng nguyên B mà các tác giả gọi bằng một tên riêng kháng nguyên giống B (B like Antigen). Tuy nhiên, loại B like này rất yếu, không bền vững, khi bệnh lý viêm tắc, nhiễm khuẩn nói trên giảm bớt thì hoạt tính của nó cũng giảm theo và mất đi. Nhưng dù sao cũng vẫn phải đề phòng lâm lẩn trong định nhóm. Sự lẩn này rất dễ tránh nếu bao giờ cũng sử dụng cả hai nghiệm pháp kỹ thuật (hồng cầu và huyết thanh) vì mặc dù kháng nguyên giống B có xuất hiện trên hồng cầu nhưng ngược lại người ta không bao giờ thấy có mặt Anti-A trong huyết thanh những người ấy.

- Hiện tượng da ngưng kết hồng cầu (Pan agglutination). Hiện tượng này thực ra không thuộc hệ ABO, sẽ được đề cập ở chương bốn (xác định các kháng thể bất thường). Tuy nhiên khi tiến hành định nhóm hệ ABO thường quy, ta vẫn phải đối phó và xử trí thích hợp khi bắt gặp tình cờ hiện tượng này. Thuật ngữ "Da ngưng kết" chỉ nói về hiện tượng bề ngoài. Thực chất, có hai lý do chính như sau: Một là do sự có mặt của một hoặc nhiều các kháng thể bất thường thuộc loại nóng hay lạnh, IgG hay IgM (chủ yếu thường là lạnh, IgM) có thể kết hợp bổ thể hoặc không, đã gắn trên hồng cầu hay tự do trong huyết thanh. Đây là phần miễn dịch bệnh lý đối với hồng cầu, nghiên cứu trong phần chuyên khảo riêng. Hai là do một số kháng nguyên cá biệt T, T_m, T_k, C_{2d}, mỗi kháng nguyên là một cảm thụ quan

(Receptor) trên bề mặt hồng cầu, chỉ bộc lộ khi có tác dụng ở một hoàn cảnh đặc biệt, thí dụ một loại men vi khuẩn (trong cơ thể hoặc ông nghiệm). Hầu hết người trưởng thành đều có Anti-T và Anti-T_H trong huyết thanh, khi chế tạo huyết thanh nghiệm Anti-A, Anti-B nhiều khi cũng không loại bỏ hết được những Anti-T và Anti-T_H đó, tuy nhiên vẫn chấp nhận được vì thường chúng rất yếu.

Dại đa số tường hợp, nếu tuân thủ nghiêm khắc các quy tắc an toàn kỹ thuật, người ta có thể loại bỏ riêng những trường hợp nói trên để điều tra nghiên cứu tiếp theo, lý giải thoả đáng, không dễ sai lầm trong xác định nhóm hệ ABO.

Sự suy giảm tính kháng nguyên A, B, H trên hồng cầu. Tình trạng này có thể gặp ở những người bệnh bị những bệnh ác tính cấp về máu như bạch cầu cấp (Leukemias), các bệnh u ác khác. Nhưng quá trình u ác tính có thể gây tác động biến đổi đến các kháng nguyên hồng cầu qua bộ máy gen, không những chỉ làm suy giảm mà còn có thể gây nên những biến đổi, khiến cho việc xác định nhóm máu ở những người bệnh như thế càng phải hết sức lưu ý, tránh nhầm lẫn.

- Khi có chỉ định pha huyền dịch hồng cầu trong chính huyết thanh của mình, ta có thể gặp trường hợp người đồ tiết yếu tố A, B, H trong huyết thanh với nồng độ cao, yếu tố hoà tan này có thể đủ sức kết hợp với huyết thanh nghiệm Anti-A hoặc Anti-B, ức chế kháng thể trong huyết thanh đó, gây nên phản ứng yếu ớt hoặc âm tính khi định nhóm. Để tránh tình trạng này, người ta khuyên chỉ nên sử dụng môi trường albumin hoặc huyết thanh AB đã biết trước, thuộc loại không tiết yếu tố A, B, H (sese).

3. Do huyết thanh

- Khi trong huyết thanh người cần định nhóm, xuất hiện protein bất thường, do bệnh lý (multiple myeloma, macro-globulinemia),

hoặc do quá trình điều trị bằng những dịch cao phân tử, cũng có thể gây nên hiện tượng chuỗi tiền (Rouleaux formation), có thể lẫn với ngưng kết. Nếu huyết thanh ấy có nồng độ fibrinogen cao cũng có thể gây nhầm.

- Khi trong huyết thanh người bệnh có chứa các kháng thể bất thường ngoài hệ ABO (xem kỹ ở Chương 4) thí dụ các tự kháng thể lạnh, tự kháng thể nóng, các kháng thể đồng loại do quá trình gây miễn dịch nhiều lần (allo-antibodies), hoặc các kháng thể tự nhiên nhưng không thường xuyên (Anti-A_n, Anti-H, Anti-Le_a).

- Trường hợp định nhóm cho trẻ sơ sinh, huyết thanh của trẻ chưa đủ nồng độ kháng thể tự sản xuất ra, thường chưa hoàn chỉnh hoặc tiếp nhận từ mẹ qua nhau thai (IgG), vì vậy nghiệm pháp định nhóm bằng huyết thanh chưa có giá trị. Trường hợp tuổi quá già, lượng kháng thể trong huyết thanh cũng giảm đáng kể, khi định nhóm máu phải lưu ý.

- Khi định nhóm ở người bệnh, có thể gặp trường hợp bệnh suy giảm miễn dịch thí dụ bệnh Hodgkin, có thể gặp trạng thái suy giảm miễn dịch do điều trị hoá chất hay phóng xạ, cũng là một khó khăn có thể xảy ra khi xác định nhóm bằng nghiệm pháp huyết thanh.

- Ở những người mới được truyền tủy của người cho khác nhóm ABO, hoặc mới được điều trị bằng thay huyết tương (Plasmapheresis), lượng kháng thể trong huyết thanh có thể bị pha loãng hoặc hỗn tạp, không thể dùng trong xác định nhóm được.

VIII. CÁCH PHÒNG TRÁNH VÀ XỬ LÝ CÁC KHÓ KHĂN KHI XÁC ĐỊNH NHÓM ABO

1. Trước nhất là phải tuân thủ các quy tắc kỹ thuật, định nhóm bằng cả hai nghiệm pháp (hống cầu và huyết thanh), phải rửa kỹ hống cầu, pha huyền dịch thích đáng, thao tác kỹ thuật

thành thạo, nghiêm túc. Như thế đã có thể phòng và tránh được hầu hết các khó khăn dẫn tới khả năng sai lầm trong định nhóm hệ ABO.

2. Sử dụng các thuốc thử có chất lượng tốt, đáng tin cậy từ niên hạn sử dụng, điều kiện bảo quản, nơi chế tạo, quy cách dùng đến quan sát màu sắc, nhãn hiệu, không để xảy ra những lầm lẫn về ghi chép.

3. Nếu vẫn còn nghi vấn, phải tiến hành thêm những bước sau đây:

- Làm lại kỹ thuật định nhóm bằng 2 lô thuốc thử khác nhau, do 2 KTV cùng làm trong cùng một điều kiện và sử dụng 2 loại kỹ thuật. Số 2 là ít nhất, nếu được có thể dùng 3 hoặc 4. Cụ thể là dùng 2 mẫu huyết thanh nghiệm do 2 nơi chế tạo khác nhau, bố trí 2 KTV thành thạo cùng định nhóm, bằng hai kỹ thuật trên tấm và trong typ. Tất nhiên là theo 2 nghiệm pháp và thống nhất kỹ thuật.

- Lấy mẫu máu mới của người cho hoặc của người bệnh làm lại từ đầu, để phòng mẫu trước đã bị ô nhiễm.

- Sử dụng các mẫu chứng như hồng cầu O, huyết thanh nhóm AB, các mẫu hồng cầu A₁, A₂B.

- Thử phản ứng tự thân (hồng cầu bản thân với huyết thanh chính mình) ở các nhiệt độ 4°C, 22°C, 37°C trong môi trường nước muối, môi trường albumin, làm nghiệm pháp Anti globulin, cao hơn nữa có thể làm kỹ thuật với hồng cầu xử lý men, nhằm phát hiện vai trò các tự kháng thể. Nếu qua những phản ứng tự thân còn nghi vấn, làm tiếp phản ứng ngưng kết như trên với những mẫu hồng cầu O của người khỏe.

HỆ Rh

I. LỊCH SỬ

Năm 1939, Levine và Stetson phát hiện một kháng thể bất thường trong huyết thanh một phụ nữ vừa sinh thai tử sản (stillborn) người này đã bị một tai biến huyết tán khi nhận máu của chồng. Lấy huyết thanh chứa kháng thể đó thử với các mẫu máu cùng nhóm hệ ABO thì 80% mẫu máu bị ngưng kết. Các tác giả ghi nhận sự có mặt loại kháng thể bất thường đó.

Năm 1940 Landsteiner và Wiener lấy máu của khỉ *Macacus rhesus* tiêm kích cho thỏ và chuột lang, tạo được trong huyết thanh các động vật này một loại kháng thể gây ngưng kết cả với các hồng cầu của khỉ, cả với 85% người cho máu bấy giờ, từ đó người ta gọi số 85% này là nhóm Rh dương tính (Rh^+), 15% còn lại thì gọi là Rh âm tính (Rh^-). Kháng thể gây ngưng kết được gọi là Anti-Rh.

Cùng năm ấy, Wiener và Peters chứng minh rằng kháng thể phát hiện được ở huyết thanh người phụ nữ nói trên và một số người khác đã qua nhiều lần nhận máu truyền cùng nhóm ABO với kháng thể Anti-Rh tạo ra được trên thỏ chống lại hồng cầu của khỉ Rhesus, là rất giống nhau về hoạt tính, không phân biệt được.

Năm 1941, Levine và cộng sự mô tả một trường hợp bệnh huyết tán sơ sinh với tên gọi bấy giờ erythroblastosis fetalis do có mâu thuẫn nhóm máu Rh giữa mẹ và thai nhi.

Thực ra, kháng thể Anti-rhesus tạo ra được ở thỏ với kháng thể phát hiện ở người sau một quá trình truyền máu hoặc thai nghén không phải là một loại mà chỉ là một sự trùng hợp ngẫu nhiên về hoạt tính. Điều này vài năm sau đó đã xác định rõ. Để giữ tính lịch sử của nguồn gốc phát hiện, người ta vẫn cứ dùng

danh từ Anti-Rh để chỉ các kháng thể của người ứng với một hệ kháng nguyên hồng cầu của người cũng mang tên hệ Rh. Còn kháng thể của tổ chống lại hồng cầu khỉ Rhesus thực thụ thì Levine đề xuất đặt tên kháng thể Anti-LW, kỷ niệm sự phát hiện của Landsteiner và Wiener. Cho đến nay chính thức dùng như vậy. Các gen hệ LW cũng được thừa kế ở người độc lập với các gen hệ Rh. Đại đa số có sự trùng hợp hoạt tính giữa 2 hệ đó, nhưng cũng có những người Rh âm nhưng lại LW dương.

Kể từ năm 1940, từ những phát hiện phong phú về hệ Rh đưa đến nhiều luận thuyết khác nhau, vì vậy có nhiều cách gọi tên khác nhau, mà 3 loại danh pháp của Fisher-Race, của Wiener, của Rosenfield là chủ yếu.

II. DANH PHÁP

1. Theo Fisher-Race

Kể từ năm 1943, lần lượt phát hiện các kháng thể Anti-D, Anti-C, Anti-c, Anti-E, Anti-e, các tác giả xác định được các kháng nguyên D, C, c, E, e thuộc hệ Rh. Fisher giả thiết rằng các kháng nguyên xếp từng cặp allele với nhau trên một locus, giả thiết này đã được chứng minh và đi đến lý thuyết sắp xếp thứ tự như sau: C và c là 1 cặp, E và e là 1 cặp, D và d là 1 cặp. Trên chromosom xuất hiện cặp Dd rồi đến Cc và Ee, do đó phức hợp gen hệ Rh phải tập hợp thành 8 cụm: Dce, DcE, DCE, dce, dcE, dCe và dEC. Vậy có 3 locus cho 3 cặp allele. Các loại này kết chặt nhau vì vậy những biến dị do crossing over (bất chéo) rất hiếm gặp. Khi di truyền cũng cả cụm, coi một phức hợp cụm 3 gen. Thí dụ 1 người DCE/DcE chỉ có thể di truyền cho con hoặc bộ ba DCE, hoặc bộ ba DcE mà thôi, không thể có một phức hợp nào khác.

Ở đây, 5 kháng nguyên là có thật D, C, c, E, e đó là sản phẩm của các gen D, C, c, E, e. Chỉ có kháng nguyên d là không có thật

vì người ta đã phát hiện, phân định hoặc chế tạo được các kháng thể đặc hiệu tương ứng Anti-D, Anti-C, Anti-c, Anti-E, Anti-e mà không có Anti-d, do đó d chỉ là allele giả thiết của D, khi viết Dd có nghĩa là D dị hợp tử vì d chỉ có nghĩa là D. Nếu viết DD thì có nghĩa là D đồng hợp tử, còn dd thì có nghĩa là D'D'. Tất cả người nào dd tức là D'D' (không có kháng nguyên D) được gọi là Rh⁻ bất kể kháng nguyên khác C và E. Nhưng ai đó có 1D' được gọi là Rh⁺ bất kể các kháng nguyên khác c hay e. Kháng nguyên D là kháng nguyên mạnh nhất và Anti-D cũng là kháng thể chủ yếu gây nên các tai biến thuộc hệ Rh.

Đối với các kháng nguyên khác như D^u, G, V, C^u cũng xếp theo nguyên tắc trên.

2. Theo Wiener

Để dễ biểu, xem bảng so sánh cách gọi của Wiener và Fisher Race dưới đây:

Bảng 2.6. So sánh cách gọi kháng nguyên hệ Rh của Fisher và Wiener

Fisher Race	Wiener
DcE	Rh ₁ (Rho rh' hr'')
DcE	Rh ₂ (Rho hr' rh'')
Dce	rh (hr' hr'')
DCe	rh' (rh' rh'')
dcE	rh'' (hr' rh'')
dCE	rh _y (rh' rh')
DCE	Rh _z (Rho rh' hr'')
Dce	Rho (Rho hr' hr'')

Theo bảng so sánh trên, Wiener gọi D của Fisher là Rh₀, C của Fisher là rh', E của Fisher là rh'', d của Fisher là rh, c của Fisher là hr', e của Fisher là hr''.

3. Theo Rosenfield

Năm 1962 Rosenfield và những người cùng trường phải đề xuất cách gọi tên bằng số, thí dụ D của Fisher gọi là Rh: 1 C của Fisher gọi bằng Rh: 2, E của Fisher gọi bằng Rh: 3, c của Fisher gọi bằng Rh: 4, v.v. (xem bảng 2.7)

Bảng 2.7. So sánh cách gọi kháng nguyên hệ Rh của Wiener, Fisher-Race; Rosenfield

Theo Wiener		Theo Fisher-Race		Theo Rosenfield
Rho	D	Rh 1
rh'	C	Rh 2
rh''	...	E	...	Rh 3
hr'	c	Rh 4
hr''	e	Rh 5
hr	...	f, ce	Rh 6
rhi	C*	...	Rh 7
rh ^{ac}	C ^w	Rh 8
rh ⁱ	C ^e	Rh 9
.....			
.....	cE		Rh 34

Mỗi cách gọi tên trên đều có ưu và nhược điểm, thí dụ cách của Fisher-Race rất dễ hiểu và thông dụng nhưng khi đọc lên không gọn, cách của Wiener tuy gọn hơn nhưng nhiều khi tối nghĩa, cách của Rosenfield thì không nói lên gì về tính di truyền, về gen, về kháng nguyên nhưng lại tiện cho máy tính, cho thống kê và cho áp dụng tự động hoá, vì vậy trên thực tế

người ta ứng dụng cả ba cách, tùy từng yêu cầu. Trên thị trường quốc tế, một số thuốc thử như Anti-D đều in trên băng nhãn chai cả 2 cách gọi theo Fisher-Race và theo Wiener thí dụ: Anti-D (Anti-Rh₀) v.v

Không thể kể cách gọi của Rosenfield (là cách gọi đánh số) 2 cách gọi của Fisher và Wiener tuy có khác nhau về quan niệm nhưng không có mâu thuẫn gì thực tế, vì vậy vẫn dùng chung cả 2 cách. Cụ thể là Fisher và Race giả thiết có 3 gen với 3 cặp allele mà Fisher gọi là pseudo allele nhưng Wiener chỉ có quan niệm có 1 gen sinh ra 1 kháng nguyên với 3 yếu tố (xem bảng 2.8). Kết quả cuối cùng áp dụng thực tế thì giống nhau nhưng nguồn gốc thì khác nhau.

Bảng 2.8. Kháng nguyên và kháng thể hệ Rh

Gen	Kháng nguyên	3 yếu tố	3 kháng thể
Wiener R ₁	Rh ₁	Rh ₀ rh' hr''	Anti-Rh ₀ Anti-rh' Anti-hr''
Fisher: Dce 3 gen	D, C, c 3 kháng nguyên		Anti-D Anti-C Anti-c
Quan niệm về nguồn gốc khác nhau		Kết quả thực tế cuối cùng giống nhau	

Trong mấy chục năm, kể từ khi phát hiện hệ Rh tới nay, quan niệm của Fisher-Race cùng với danh pháp của các tác giả được thịnh hành, thông dụng, nhưng quan niệm này có những điểm yếu cơ bản. Cùng với sự phát hiện ngày càng nhiều các kháng nguyên bộ phận, kháng nguyên kép, kháng nguyên G v.v thì điểm yếu càng lộ rõ, cụ thể là giả thiết về kháng nguyên d, allele của D không được chứng minh.

Về tính phức tạp ngày càng tăng của hệ này, xin tham khảo về luận thuyết ở các tài liệu chuyên sâu hơn, chi tiết hơn.

thí dụ tài liệu Blood Groups in Man của Race và Sanger từ lần tái bản thứ sáu trở lại đây.

Có thể tổng quát những phức tạp này dưới những dạng sau:

- Những kháng nguyên yếu như D^u , C^w , C^x , E^w v.v
- Những hoạt tính kháng nguyên kép, có thể là sản phẩm chung của các loại liên kết quá chặt, thí dụ Ce (Rh:7). CE (Rh:22), cE (Rh:27).

- Những gen thiếu hụt một phần hoặc thiếu hụt toàn bộ (short deletion, small piece of chromosome missing or complete deletion) thí dụ:

- D (C) (e) : thiếu hụt một phần kháng nguyên C và e
- D (C) (E) : thiếu hụt một phần kháng nguyên C và E.
- D - - : thiếu hẳn các sản phẩm của locus CcEe (gen câm)
- ... : thiếu hẳn toàn bộ (gen câm toàn bộ còn gọi là Rh null)
- Dc - : thiếu hẳn các sản phẩm locus Ee
- DC^w - : v.v

III. TẦN SỐ KHÁNG NGUYÊN HỆ RH Ở NGƯỜI DA TRẮNG

Kháng nguyên			Tần số	
D	(Rh _D)	..	Khoảng 85%	(Rh dương)
G	Rh _G)	..	" 85%	
e	(hr ⁺)	.	" 98%	
c	(hr ⁻)	..	" 80%	
C	(rh)	..	" 70%	
f	(ce) (hr)	..	" 64%	
E	(hr ⁺)	..	" 30%	

Kiểu di truyền phổ biến		Tần số	
DCe/dce	(R ₁ r)	Khoảng	30%
DCe/DCe	(R ₁ R ₁)	"	16% (Rh âm: Rh)
dce/dce	(rr)	"	15%
DCe/DcE	(R ₁ R ₂)	"	13%
DcE/dce	(R ₂ r)	"	12%

Như vậy, nếu chỉ tính tỷ lệ Rh' (có kháng nguyên D) và Rh(D⁻ hoặc dd) thì ở người châu Âu số người Rh⁺ chiếm 85% so người Rh⁻ chiếm 15%.

Riêng ở Việt Nam, các tác giả cho số liệu về tỷ lệ Rh⁻ (Rh âm) từ 0,01% đến 0,07%, hàng ngàn lần thấp hơn tỷ lệ ở người châu Âu. Tuy nhiên các điều tra chi tiết chưa đủ số liệu nghiên cứu. Có tác giả điều tra nhỏ trong một thôn xóm ở một gia tộc số lượng chưa đến 20 người nội ngoại đã có 3 người Rh âm (dd). Vậy nếu có điều kiện điều tra chi tiết ở thôn xóm ấy, có khả năng thu được những tài liệu đáng lưu ý về việc này.

IV. CÁC KHÁNG THỂ HỆ Rh

Tuyệt đại đa số kháng thể thuộc hệ Rh đều là IgG, kháng thể miễn dịch, sản sinh ra sau những quá trình đáp ứng miễn dịch truyền máu hoặc thai nghén. Cụ thể là nếu người D⁻ nhận máu truyền D⁺ hoặc người cc nhận máu truyền C, người ee nhận máu truyền E v.v hay trong thai nghén nếu người mẹ mang thai là D⁺ (lúc dd) mà thai nhi là D⁺ thì có khả năng những hồng cầu mang kháng nguyên D⁺, C hoặc E đó khi xâm nhập tuần hoàn của người mẹ D⁻ sẽ gây đáp ứng miễn dịch tạo ra các kháng thể Anti-D, Anti-C, Anti-E v.v

Trong các kháng thể thuộc hệ Rh, đáng kể nhất là Anti-D còn các kháng thể khác yếu hơn nhiều và mức độ gây phản ứng cũng rất ít so với Anti-D.

Anti-D là kháng thể loại liên kết, nhưng đòi hỏi những kỹ thuật nhân tạo như kỹ thuật Antiglobulin, kỹ thuật men hoặc kỹ thuật sử dụng môi trường huyền dịch hồng cầu là albumin các thuốc thử Anti-D (Anti-Rh₀) phổ cập trên thị trường, dùng để định nhóm D⁺, D⁻, thường đã được chế tạo nâng cao cường độ và hoạt tính, pha trong môi trường albumin, để khi định nhóm, không đòi hỏi phải dùng kỹ thuật Antiglobulin hoặc kỹ thuật men. Các thuốc thử như vậy gây phản ứng ngưng kết trực tiếp với hồng cầu Rh dương trên tấm (tile technique), trong ống như các thuốc thử hệ ABO chỉ khác là phải tiến hành ở nhiệt độ 37°C đến 40°C.

Do những tính chất cơ bản trên, trong phát hiện và xác định kháng thể bất thường, các kháng thể Rh, nhất là Anti-D đều là IgG, miễn dịch, nóng (hoạt động ở 37°C - 40°C, đòi hỏi kỹ thuật Antiglobulin, hoặc kỹ thuật men, hoặc sử dụng môi trường albumin, qua nhau thai, không kết hợp bổ thể, thường phát hiện được bắt đầu từ tuần thứ tám, thứ chín, sau lần gây miễn dịch đầu tiên và xuất hiện với nồng độ cao nhất vào tuần thứ 20. (Xem thêm ở mục kháng thể bất thường).

HỆ KELL

Kể từ 1946, Coombs, Mourant và Race phát hiện đầu tiên hệ này, đến nay đã trở thành ngày càng phức tạp.

Năm 1949 Levine và cộng sự phát hiện kháng thể Anti-k và Allel "k". Tới đây coi như hệ kell có hai Allel K và k.

Năm 1957 Alle và Lewis phát hiện kháng nguyên Kp^a và Kp^b.

Năm 1956, sau Giblett đến Stroup và cộng sự phát hiện hệ Sutter gồm 2 allele Js^a và Js^b gần với hệ Kell về di truyền

Gán đây còn thấy những yếu tố phụ: Mac leod và Claas.

Tóm lại hệ Kell đến bây giờ gồm những kháng nguyên sau đây với các tên gọi cũng đã thay đổi cho thống nhất:

	Tên cũ		Tên mới	Tần suất (da trắng)
K	(Kell)	K ₁	khoảng 0.05
K	(Cellano)	K ₂	khoảng 0.95
Kp ⁺	(Penney)	K ₃	khoảng 0.02
Kp ⁺	(Rautenberg)	K ₄	rất phổ biến
K ⁺	(Peltz)	K ₅	
Js ⁺	(Sutter)	K ₆	
Js ⁺	(Matthews)	K ₇	

Sự phát triển của hệ Kell những năm gần đây lên tới 18 kháng nguyên thêm nữa:

K ₈	(K ⁺)	Phát hiện năm 1956
K ₉	(Claas)	Phát hiện năm 1968
K ₁₀	(U ⁺)	Phát hiện năm 1968
K ₁₁	(K ⁺ like, Côté)	Phát hiện năm 1971
K ₁₂	...	Phát hiện năm 1973
K ₁₃	(Sgro)	Phát hiện năm 1974
K ₁₄	(San)	Phát hiện năm 1974
K ₁₅	(Kx)	Phát hiện năm 1974
K ₁₆	(Côté like)	Phát hiện năm 1974
K ₁₇	(Weeks, Wk ⁺)	Phát hiện năm 1974
K ₁₈	Phát hiện năm 1974

Ngoài ra còn khoảng 5 kháng nguyên tần số rất thấp (private), không nêu lên đây. Đáng lưu ý rằng kiểu hình McLeod cũng như K₁₆ là loại kiểu hình rất hiếm, mà trong chúng

bệnh u granulom mạn tính (chronic granulomatous disease) hồng cầu đều thuộc kiểu hình K⁰ hoặc McLeod.

Các kháng thể thuộc hệ Kell:

1. Anti-K₁ (tức Anti-K cũ)

Rất ít khi thuộc loại IgM và xuất hiện tự nhiên, thường là loại IgG và kháng thể miễn dịch, gặp khá phổ biến, chỉ đứng sau hệ ABO và Rh, thường phát hiện nhạy bằng kỹ thuật antiglobulin ở 37°C. Một số mẫu kháng thể nhạy với kỹ thuật men, thậm chí hoạt động cả trong môi trường nước muối, môi trường albumin hoặc với huyền dịch hồng cầu pha trong chính huyết thanh bản thân, nhiều khi kết hợp bổ thể. Loại kháng thể này thường là thủ phạm gây huyết tán trong truyền máu và ở trẻ sơ sinh, và cũng thường được kích thích sản xuất ra do các quá trình truyền máu hoặc thai nghén.

2. Anti-K₂ (tức Anti-k cũ)

Hiếm hơn Anti-K₁, tính chất cũng hoàn toàn giống như thế, thường là kháng thể miễn dịch, loại IgG, phát hiện chủ yếu bằng kỹ thuật Antiglobulin, luôn được kích thích sản xuất bởi những quá trình truyền máu và thai nghén, đồng thời là thủ phạm phổ biến gây ra những tai biến huyết tán trong truyền máu và với sơ sinh.

Cả hai loại kháng thể trên khiến cho hệ Kell trở thành hệ quan trọng thứ ba sau hệ ABO và Rh của hồng cầu, có ý nghĩa lâm sàng cả với truyền máu và miễn dịch thai nghén. Các tai biến thường ở mức độ đáng lưu ý, có khả năng thậm chí rất nặng, có thể dẫn tới chết người vì các kháng thể thường kết hợp bổ thể. Vì thế, việc kiểm tra về hệ nhóm này là việc tất nhiên phải làm ở mọi cơ sở truyền máu, băng máu, huyết sinh học lâm sàng.

Mặc dù tính phức tạp của hệ Kell nhưng trong thực tế thường chỉ cần hai loại kháng nguyên và 3 kiểu hình hồng cầu sau đây:

Kháng nguyên	Chứng dương	Chứng âm
K_1 (tức K cũ)	K_1K_2 (Kk)	K_2K_2 (kk)
K_2 (tức k cũ)	K_1K_2	K_1K_1 (KK)

HỆ MNSs

Năm 1927, Landseuer và Levine phát hiện 2 kháng nguyên M và N nhờ 2 kháng thể Anti-M và Anti-N. Lúc đó cho rằng hệ này gồm 2 allele M và N.

Đến năm 1947, Walsh và Montgomery tiếp đến Sanger và Race phát hiện kháng thể Anti-S và kháng nguyên S. Năm 1951, Levine và cộng sự lại tìm thấy Anti-s và 1 kháng nguyên tương ứng s.

Vấn đề không đơn giản mà ngày càng phức tạp. Năm 1960, tác giả Cleghorn đã điều tra trên 1.000 người Anh, kết quả như sau:

Anti-M	Anti-N	Anti-S	Anti-s	Tần số %	Kiểu hình	Kiểu di truyền
+	-	+	-	5,7	MS	MS/MS
•	-	+	+	14,0	MSs	MS/Ms
•	-	-	+	10,1	Ms	Ms/Ms
•	+	•	-	3,9	MNS	MS/NS
•	+	+	•	22,4	MNSs	MS/Ns hay Ms/NS
•	+	-	•	22,6	MNs	MS/Ns
•	+	•	-	0,3	NS	NS/NS
•	+	•	+	5,4	NSs	NS/Ns
•	+	-	+	15,6	Ns	Ns/Ns

Ở người da trắng, thấy sự phân bố trên các chromosom theo tỷ lệ như sau:

NS : 0,39

Ms : 0,30

MS : 0,24

NS : 0,07

Sự phân bố kết hợp gen như trên cho phép sử dụng hệ này có hiệu lực cao trong các nghiên cứu di truyền, kế thừa.

Cho đến nay, mỗi ngày càng phát hiện tính phức tạp, người ta tìm thấy kháng thể Anti-U và kháng nguyên U (Weiner). Ở người da đen lại có kháng nguyên S^U nhưng không có kháng thể Anti- S^U mà những người U+ hoặc S^U đều là S-s. Dù sao người ta cũng phải công nhận có những kiểu hình MS^U , NS^U , MU, NU chủ yếu là ở người da đen.

Ngoài ra còn Mg, M_1 , M_2 và một loạt các kháng nguyên chưa hoàn toàn sáng tỏ như M^* , M^1 , M^* , N_2 , M^* , M^* , S_2 , M^1 .

Không những thế, còn thấy có các kháng nguyên vệ tinh (satellite) của hệ này, thí dụ Mi^* , Vw, Mu, Hill. Những vệ tinh này lên tới số hàng chục và chúng tỏ một điều rằng có nhiều locus sinh ra kháng nguyên ấy đã gần chặt chẽ với các allele thuộc hệ MNSs.

Mặc dù tính phức tạp như vậy, cũng có thể kết luận rõ ràng được đối với hệ này gồm mấy điểm chính như sau:

- M, N, S, s là các allele, có các kháng thể tương ứng Anti-M, Anti-N, Anti-S, Anti-s

- Nhiều tác giả cho rằng M và N không thực chất là allele của nhau mà N là tiền chất (precursor) của M giống như H là precursor của A và B. Tuy nhiên có tác giả thấy điều đó chưa đủ chứng cứ.

- Kháng nguyên U gặp phổ biến ở người da đen, có liên quan mật thiết với hệ MNSs. Những người U+ đều là S-s. Tuy nhiên kháng nguyên U có cả trên hồng cầu và bạch cầu hạt neutrophil.

- Hệ MNSs có giá trị lớn trong nghiên cứu, điều tra về di truyền, kế thừa.

Các kháng thể thuộc hệ MN:

1. Anti-M

Thường là loại IgM, kháng thể ngưng kết mạnh, hoạt động tốt nhất ở 4°C, nhưng cũng có thể là IgG, vậy có thể vừa là tự nhiên vừa là miễn dịch, đôi khi gặp ở trẻ nhỏ dưới 1 tuổi. Ở môi trường albumin, hoạt tính tốt hơn ở môi trường muối, và ở cả 37°C cũng hoạt động, gây được cả tai biến truyền máu và huyết tán sơ sinh. Khi Anti-M yếu, chỉ dương tính với hồng cầu đóng hợp từ MM. Là loại kháng thể không kết hợp bổ thể.

2. Anti-N

Còn hiếm hơn Anti-M, tuyệt đại đa số là tự nhiên, hoạt động ở 4°C, cũng có thể gây phản ứng chéo với hồng cầu MM, không kết hợp bổ thể, rất ít gây tai biến truyền máu hoặc huyết tán sơ sinh.

3. Anti-S

Đa số thuộc loại kháng thể miễn dịch IgG. Một số ít có thể là IgG, có thể kết hợp bổ thể nhưng không thấy huyết tán invitro. Có khả năng gây tai biến truyền máu và huyết tán sơ sinh. Kháng thể này thường gặp ở người nhận truyền máu nhiều lần.

4. Anti-s

Rất hiếm gặp, thường là IgG, kháng thể miễn dịch, đa số không kết hợp bổ thể, một số ít có kết hợp, có khả năng gây tai biến huyết tán trong truyền máu và sơ sinh.

Tóm lại, trong lâm sàng, chỉ có Anti-M, Anti-S, Anti-s có khả năng gây tai biến. Anti-N hầu như không thấy gây tai biến gì. Tuy nhiên Anti-s lại cực kỳ hiếm, vậy chỉ còn lại Anti-M và Anti-S.

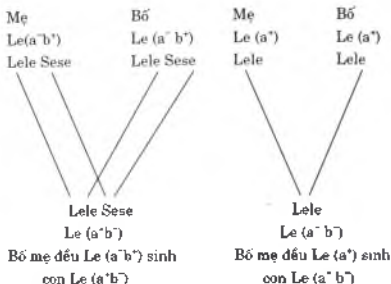
HỆ LEWIS

I. ĐẶC ĐIỂM CỦA HỆ LEWIS

1. Lewis là một hệ kháng nguyên hoà tan. Các kháng nguyên Lewis có trên bề mặt hồng cầu là do hấp thu các yếu tố Lewis từ huyết tương. Sự có mặt hay không các yếu tố Lewis trong huyết tương và nước bọt (nước miếng) là do các gen allele Le^e quyết định (không phải Le^a , Le^b). Nếu có gen Le thì yếu tố Lewis có mặt trong huyết tương và nước bọt, nếu là $lele$ thì không có.

2. Hệ Lewis có mối liên quan với hệ tiết yếu tố A.B.H (Sese) và các gen ABH, cụ thể là ở người tiết (Se) thì hồng cầu là $Le(a^+ b^-)$, ở người không tiết (sese) thì hồng cầu là $Le(a^- b^-)$ và trong huyết tương cũng như các nước bọt có yếu tố Le^e hoà tan. Để có được yếu tố Le^b , phải có mặt và tác động của các gen Se, H và Le, vì H rất cần để chuyển Le^e thành Le^b .

3. Do đặc điểm (1) mà 2 cha mẹ cùng là hồng cầu ($Le a^+$) có thể sinh con hồng cầu $Le(a^-)$ có thể sinh con có hồng cầu $Le(a^+)$.



4. Hầu hết trẻ sơ sinh đều có hồng cầu Le(a⁻b⁻). Từ tuổi thứ hai mới xuất hiện Le^a, từ tuổi thứ sáu mới xuất hiện Le^b.

Mối liên quan của 3 hệ sese, lele, ABH và nhóm hồng cầu Lewis ở người trưởng thành (thuyết của Grubb và Cappellini)

Số thứ tự	Kiểu di truyền thuộc 3 hệ	Yếu tố Lewis trong nước bọt	Yếu tố H	Hồng cầu	Tần số ở người da trắng
1	H, Se, L ^a	Le ^b , Le ^a	+	Le(a ⁻ b ⁻)	75%
2	H, sese, Le	Le ^a	-	Le(a ⁻ b ⁺)	20%
3	H, Se, lele	-	•	Le(a ⁺ b ⁻)	4%
4	H, sese, lele	-	-	Le(a ⁻ b ⁻)	1%

II. CÁC KHÁNG THỂ THUỘC HỆ LEWIS

1. Anti-Le^a

Thường là IgM, tương đối phổ biến trong huyết thanh người, chỉ gặp ở người lele, tức là hồng cầu (a⁻b⁻). Tần số người lele

chỉ khoảng 5% vì vậy độ phổ cập Anti-Le^a cũng không cao lắm. Anti-Le^a là loại kháng thể có kết hợp bổ thể nên có thể gây huyết tán in vitro khi làm kỹ thuật xét nghiệm, có thể gây nên tai biến truyền máu, nhưng không gây được bệnh huyết tán sơ sinh vì không qua nhau thai được.

2. Anti-Le^b

Có 2 thể: Anti-Le^{bl} và Anti-Le^{bH}. Cả hai đều đa số thuộc loại IgM và kết hợp bổ thể. Tuy vậy, ít thấy gây tai biến huyết tán trong truyền máu, trong kỹ thuật xét nghiệm in vitro cũng chỉ đôi khi gây huyết hồng cầu, còn với bệnh huyết tán sơ sinh thì càng không có vai trò gì.

Trong truyền máu, các kháng thể hệ Lewis được coi là những kháng thể tự nhiên, tuy không thường xuyên như các kháng thể hệ ABO, nhưng cũng có khả năng gây tai biến, nhất là lại có tính chất kết hợp bổ thể nên tai biến có thể dẫn tới huyết tán trong lòng mạch (intravascular hemolysis). Trong huyết tương có yếu tố Lewis nên cũng giúp trung hoà toàn bộ hoặc một phần kháng thể, vì vậy nếu kháng thể đủ mạnh mới gây nên được tai biến. Trong những trường hợp như thế, phải truyền máu Le (a⁻ b⁻). Nếu chủ yếu là Anti-Le^a thì có thể dùng hồng cầu Le(a⁻ b⁺). Nếu chỉ có Anti-Le^b thì có thể dùng hồng cầu Le(a⁺ b⁻).

Ở phụ nữ có thai, kháng nguyên Lewis có thể yếu đi, người có hồng cầu Le(a⁺ b⁺) có thể thành Le(a⁻ b⁻) trong thời kỳ thai nghén, do đó trong thời kỳ ấy có thể sinh ra các kháng thể Anti-Lewis. Thực vậy, các kháng thể Anti-Lewis thường được phát hiện ở phụ nữ mang thai, nhưng vì không qua nhau thai được và vì hồng cầu của thai nhi và sơ sinh còn là Le (a⁻ b⁻) nên không xảy ra tai biến huyết tán.

III. PHÁT TRIỂN CỦA HỆ LEWIS

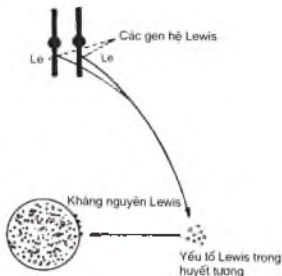
Có tới 8 kháng nguyên thuộc hệ Lewis. Ngoài Le^a , Le^b đã nói trên, còn có Le^x (phát hiện năm 1949), Le^y (phát hiện năm 1972), Le^d (phát hiện năm 1970) Magard (phát hiện năm 1958), A_1Le^b (năm 1968), Ble^b (năm 1974).

Ứng với các kháng nguyên này, tìm thấy các kháng thể tương ứng.

- Anti- Le^a ứng với yếu tố thụ cảm X (X receptor). X receptor liên quan chặt chẽ với yếu tố Le^a , không liên quan gì đến yếu tố Le^b , hoàn toàn độc lập với hệ Sese, khi yếu tố X này có mặt trên hồng cầu thì yếu tố Le^a phải có mặt trong các dịch tiết

- Anti- Le^x , Anti- Le^y , Anti-Mag, Anti- A_1Le^b và Anti- Ble^b .

Các kháng nguyên và kháng thể này cho thấy hệ Lewis là một hệ phức tạp, tuy nhiên các kháng nguyên và kháng thể này ít ý nghĩa thực tế trong truyền máu và bệnh lý huyết tán.



HỆ P

I. CÁC KHÁNG NGUYÊN THUỘC HỆ P

Landsteiner và Levine phát hiện hệ P từ 1927. Hệ P có tính di truyền trội. Trước thời kỳ đó, người ta đã phát hiện một kháng thể Anti-Tja và nghĩ rằng có kháng nguyên Tja. Từ khi tìm ra các kháng nguyên hệ P thì Sanger đã xác định cái gọi là kháng nguyên Tja đó chính là tập hợp kháng nguyên PP_1P^k thuộc hệ P. Ở đây thấy có điểm giống như hệ ABO ở chỗ hệ P gồm 3 kháng nguyên P_1 , P và P^k . Người mang kháng nguyên P_1 gọi là nhóm P_1 , người mang kháng nguyên P gọi là nhóm P_2 tương tự như người mang kháng nguyên A_1 gọi là nhóm A_1 , người mang kháng nguyên A gọi là nhóm A_2 . Người P_2 có thể có Anti- P_1 tự nhiên trong huyết thanh cũng như người A_2 có thể có Anti- A_1 tự nhiên trong huyết thanh của mình (xem bảng 2.9).

Đối chiếu hệ P với A_1A_2O (Sanger, 1955).

Bảng 2.9. Sự có mặt của các kháng nguyên và kháng thể hệ P

Kiểu hình hồng cầu	Kháng thể trong Hít thanh	Kiểu hình hồng cầu	Kháng thể trong huyết thanh
O	Luôn có Anti- $A \cdot A_1$	P	Luôn có Anti- $P \cdot P_1$
A_2	Đôi khi có Anti- A_1	P_2	Đôi khi có Anti- P_1
A_1	Không có	P_1	Không có

Bảng 2.10. Đối chiếu các thuộc tính của kháng nguyên và kháng thể hệ P

Anti-A+A ₁	Anti-P+P ₁
Sau hấp thu với hồng cầu A ₂ thì còn lại Anti-A ₁	Sau hấp thu với hồng cầu P ₂ thì còn lại Anti-P ₁
Đem tách từ hồng cầu hấp thu thì dịch tách phản ứng với hồng cầu A ₁ mạnh hơn với hồng cầu A ₂	Đem tách từ hồng cầu hấp thu thì dịch tách phản ứng với hồng cầu P ₁ mạnh hơn với hồng cầu P ₂
Đem hấp thu với hồng cầu A ₁ thì mất hết các kháng thể Anti-A ₁ là thành phần kháng thể cuối cùng bị mất đi	Đem hấp thu với hồng cầu P ₁ thì mất hết các kháng thể Anti-P ₁ là thành phần kháng thể cuối cùng bị mất đi.

Tần số gen theo Henningsen:

$$\text{Gen } P_2 = 0,4599$$

$$\text{Gen } P_1 = 0,5401$$

$$\text{Kiểu di truyền } P_1P_1 = 0,2917$$

$$\text{Kiểu di truyền } P_1P_2 = 0,4968$$

$$\text{Kiểu di truyền } P_2P_2 = 0,2115.$$

II. KHÁNG THỂ HỆ P

Trước đây những người nhóm P đã được gọi là Tja, một nhóm rất hiếm. Ở những người này trong huyết thanh đều có 1 kháng thể Anti-Tja. Không tác giả nào nêu tần số của nhóm này, vì nó quá hiếm. Có thể ở từng vùng, gặp nhiều hơn, thí dụ vùng Bắc Thụy Điển. Người ta cũng nghĩ rằng có 1 allele p ở locus của hệ P tức là locus P_1P_2 (xem bảng 2.11).

Bảng 2.11. Tần số phân bố của hệ P (theo Sanger 1955).

Kiểu hình		Ký hiệu	Kháng nguyên	Kiểu di truyền	Tần số ở châu Âu
Anti-PP ₁	Anti-P ₁				
+	+	P ₁	PP ₁	P ₁ P ₁	29%
				P ₁ P ₂	50%
				P ₁ P	0%
•	•	P ₂	P	P ₂ P ₂	21%
				P ₂ P	0%
				PP	0%

Nhóm p⁺

Cũng là một nhóm rất hiếm, mới thấy khoảng 10 người. Có thể là tiền thân (precursor) của các kháng nguyên hệ P, di truyền theo tính lặn (recession). Còn phân ra P^k₁ và P^k₂, còn nhiều điều cần bàn cãi, nhất là về di truyền chưa hoàn toàn sáng tỏ. Tuy nhiên đã xác định P^k thuộc hệ P, có thể tách ra và thu được Anti-P^k riêng và kháng thể Anti-Tja trước đây xác định là Anti-PP₁ thì từ khi công nhận nhóm P^k, người ta xác định lại Anti-Tja là Anti-PP₁P^k vì P^k là một thành phần trong tập hợp PP₁P^k.

Kháng nguyên Luke

Kháng nguyên này xuất hiện nhờ 1 kháng thể ngưng kết tìm thấy ở người Negro tên là Luke, sau đó còn thấy ở vài người nữa. Kháng nguyên Luke cũng như kháng thể Luke là một biểu hiện về sự có thật của mối liên hệ giữa quan hệ P và hệ BAO.

Những phát hiện khác

Người ta thấy có một số kháng thể phản ứng chung với I và P₁, không phản ứng với I và P₂. Vậy rất có thể có một kháng nguyên chung IP₁.

Cũng đã phát hiện một số trường hợp trong huyết thanh thì có Anti · PP₁P^k. Nhưng hồng cầu đáng lẽ ra phải được ngưng kết

với Anti - Tja và Anti - P... thì lại ngưng kết với một số kháng thể đó. Như vậy rất có thể còn nhiều allele phức tạp nữa thuộc hệ P mà ta chưa biết.

Mặt khác, thấy trong dịch của bọc nang sán (Hydatid cyst fluid) có những chất giống kháng nguyên P_1 và P^k . Các chất này phản ứng đặc hiệu với Anti - P_1 và Anti - P^k nhưng không phản ứng với Anti - P. Watkins và Morgan đã dùng dịch đó gây miễn dịch cho thỏ tạo được Anti - P_1 khá mạnh.

Prokop và Schlesinger có 1 phát hiện rằng từ giun đất (Lumbricus terrestris) cắt, phơi khô, tán nhỏ, dùng nước muối chiết xuất ra được những chất ức chế các Anti - P_1 , Anti - B và Anti - H

Các loại giun khác (kể cả giun đũa Ascaris suum) cũng chiết xuất được những chất như thế.

Từ đó các tác giả cho rằng việc sản sinh Anti - P_1 ở người P_2 hoặc sản sinh Anti - PP_1P^k ở người P có liên quan đến kết quả được gây miễn dịch từ trước bởi giun đũa hoặc các ký sinh trùng đường ruột khác.

III. CÁC KHÁNG THỂ THUỘC HỆ P

1. Anti - P_1 là 1 kháng thể tự nhiên nhưng xuất hiện không thường xuyên ở huyết thanh người P_2 . Có thể gặp ở huyết thanh nhiều loại động vật không cần quá trình gây miễn dịch. Có thể chế tạo huyết thanh Anti - P_1 rất tốt ở dê và thỏ từ dịch của nang sán (hydatid cyst fluid). Hoạt tính của Anti - P_1 là kháng thể ngưng kết lạnh, hoạt động tốt nhất ở 4°C , với huyền dịch hồng cầu trong nước muối. Nếu dùng Antiglobulin hoặc men thì hoạt tính cả ở nhiệt độ cao hơn. Henningsen thấy rằng với kỹ thuật đủ nhạy sẽ phát hiện Anti - P_1 thường xuyên ở huyết thanh người P_2 nhưng kháng thể này không đủ tiêu chuẩn dùng làm huyết thanh nghiệm như kháng thể thuộc hệ ABO, vì vậy phải chế tạo bằng gây miễn dịch ở động vật.

Anti - P_1 có thể gây tai biến truyền máu nhưng hiếm. Tuy nhiên nếu phát hiện Anti - P_1 trong máu người nhận thì nên chọn máu truyền P_1 .

Anti - P_1 không gây tai biến thai nhi và sơ sinh.

2. Anti - P có mặt ở huyết thanh của tất cả mọi người nhóm P^k và chỉ có ở người nhóm P^k thôi. Anti - P phản ứng với cả P_1 và P_2 nhưng không bị trung hoà bởi dịch nang sán (hydatid cyst fluid), hoạt tính tốt ở 22°C và 37°C.

3. Anti - P^k kháng thể này thường đi riêng không kèm thêm kháng thể nào khác thuộc hệ P. Có thể tách ra được từ một kháng thể Anti - PP_1P^k (tức Anti - Tja ngày xưa) bằng cách cho Anti - PP_1P^k hấp thụ với hồng cầu P_1 . Anti - P^k phản ứng ngang nhau với P_1^k và P_2^k . Anti - P^k cũng bị ức chế bởi dịch nang sán (hydatid cyst fluid),

4. Anti - PP_1P^k (Anti - Tja trước đây)

Là kháng thể phức hợp, rất hiếm, chỉ có ở huyết thanh người nhóm P một cách tự nhiên, chủ yếu thuộc loại IgM, số ít là IgG, nhưng dù là IgM hay IgG cũng có tính kết hợp bổ thể nên gây huyết tán mạnh cả in và vivo, cả in vitro, có thể gây tai biến truyền máu và huyết tán sơ sinh.

Một khi có mặt thì phản ứng xảy ra với 100% người da trắng, chỉ âm tính với người nhóm P, mà như trên đã nói, nhóm P cực kỳ hiếm (0%). Mặc dù tai biến rất nặng nhưng vì quá hiếm nên không đáng lo ngại.

Nếu đem Anti - PP_1P^k hấp thụ với hồng cầu P_2 sẽ còn lại

Anti - P_1 và Anti- P^k . Nếu đem hấp thụ với hồng cầu P_1 có khi còn lại Anti - P^k , có khi không.

Khi do tiếp xúc kháng thể Anti - PP_1P^k với dịch nang sán (kyste hydatique) thì chỉ có Anti - P_1 và Anti - P^k bị ức chế, còn Anti - P thì không.

Một số vấn đề đáng lưu ý là mối liên quan của kháng thể Anti - PP₁P^a với sẩy thai, đặc biệt thấy ở Bắc Thủy Điển. Điều chưa sáng tỏ là đa số kháng thể này lại là IgM, không qua nhau thai, hơn nữa tai biến lại xảy ra ở những thời kỳ đầu tiên của phát triển thai, vậy có thực sẩy thai là vai trò của Anti - PP₁P^a, hay còn tác nhân nào khác.

5. Tự kháng thể Anti-Tja

Đã tìm thấy một kháng thể giống như Anti - Tja (Anti - PP₁P^a) (Anti - Tja - Like antibody) 1/3 số phụ nữ miền đông Australia (vùng Perth) bị đe dọa sẩy thai, thường là nhóm P₁ hoặc P₂. Nhưng cũng những vùng như thế ở Canada, ở Mỹ và Hungari lại không thấy có mặt các kháng thể đó. Hoạt tính tương tự như Anti - Tja chứ không giống hoàn toàn, gây huyết tán là chủ yếu, không gây ngưng kết, không cần Antiglobulin test, không cần bổ thể, nhưng lại bị mất hoạt tính khi đặt vào 56°C.

Vas và cộng sự cho rằng các tác nhân xung quanh có tác động tới việc hình thành loại tự kháng thể này: các tác nhân miễn dịch, các virus Prokop và Schlesinger nêu vai trò kích thích tạo tự kháng thể của loại giun tròn ký sinh.

6. Tự kháng thể Anti - P trong đất huyết cầu tố lạnh kịch phát

Huyết tán tố hai pha cổ điển của Donth Landstelner là một kháng thể có đặc tính gắn vào hồng cầu ở nhiệt độ lạnh và gây huyết tán ở nhiệt độ nóng (37°C), vì vậy mang tên là 2 pha. Từ 1963 nhiều tác giả (Levine, Celano, Falkowski...) phát hiện rằng tính đặc hiệu của loại tự kháng thể này giống như Anti - P thuộc hệ P (ở người P^b). Cho đến nay, xác định rằng hai loại kháng thể này tuy giống nhau về tính đặc hiệu nhưng về cấu trúc miễn dịch thì khác.

HỆ LUTHERAN

Hệ Lutheran được phát hiện từ năm 1945, bắt đầu từ 1 kháng thể Anti - Lu^a gặp ở một người được truyền máu nhiều lần, tiếp đến 1955, 1961, 1963, cho đến nay, hệ này đã được nghiên cứu khảo sát, xác định những đặc điểm sau:

- Có thể công nhận hệ này có 2 allele $\text{Lu}^a \text{Lu}^b$

- Tuy nhiên, cũng giống một số hệ khác như Lewis, Kell, Duffy và Kidd, lại có kiểu hình $\text{Lu} (a^- b^-)$. $\text{Lu} (a^- b^-)$ rất hiếm và người nhóm $\text{Lu} (a^- b^-)$ có thể sản ra một loại kháng thể anti - $\text{Lu}^a \text{Lu}^b$ chỉ không ngưng kết HC $\text{Lu} (a^- b^-)$ thôi, còn ngưng kết hầu như tất cả các hồng cầu.

- Hệ Lutheran có mối liên quan với hệ SeSe và hệ Auberger.

- Ở người da trắng, tần số xuất hiện như sau:

$\text{Lu} (a^- b^+)$ tức là $\text{Lu}^b \text{Lu}^b$: 0,9235 (92,35%)

$\text{Lu} (a^+ b^+)$ tức là $\text{Lu}^a \text{Lu}^b$: 0,0750 (7,50%)

$\text{Lu} (a^+ b^-)$ tức là $\text{Lu}^a \text{Lu}^a$: 0,0015 (0,15%)

- Kháng thể Anti - Lu^a có thể là kháng thể tự nhiên, loại ngưng kết yếu, chỉ gây ngưng kết 1 phần. Kháng thể Anti - Lu^b rất ít gặp; nói chung, các kháng thể thuộc hệ Lutheran dù tự nhiên hay miễn dịch cũng ít quan trọng đối với lâm sàng, và truyền máu. Riêng Anti - $\text{Lu}^a \text{Lu}^b$ chủ yếu là kháng thể miễn dịch, xuất hiện ở người $\text{Lu}(a^- b^-)$ nhưng cực kỳ hiếm.

HỆ DUFFY

Hệ Duffy được phát hiện từ năm 1950. Qua năm 1951, 1955, đến nay đã xác định về hệ này như sau:

- Hệ Duffy ở người da đen (Negroes) thấy kiểu hình Fy (a⁻ b⁻) có tần số cao, trong khi đó ở người da trắng thì rất hiếm gặp (ở người da đen là 68%, còn ở người da trắng chỉ 0,09%). Gần đây nhất ở người Do thái YEMEN kiểu Fy (a⁻ b⁻) cũng rất phổ biến. Từ đó giả thiết về một allele Fy và kiểu di truyền Fy^a là điều kiện thực. Hệ Duffy không phải chỉ đơn giản có 2 allele Fy^a và Fy^b nữa.

- Theo RACE và SANGER, điều tra ở người da trắng thấy:

Fy ^a Fy ^a	0,1771	{	0,2023	Fy (a ⁺ b ⁻)
Fy ^a Fy	0,0252			
Fy ^a Fy ^b			
Fy ^b Fy ^b	0,3016	{	0,4622	Fy (a ⁺ b ⁺)
Fy ^b Fy	0,0330			
FyFy			
			0,0009	Fy (a ⁻ b ⁻)

Tỷ lệ trên chắc chắn khác với tỷ lệ trên người da đen, da vàng, vì trên người da đen tỷ lệ Fy (a⁻ b⁻) đã tới 0,68 rồi, trên người Nhật và Triều Tiên gần như 100% là Fy (a⁺).

- Locus Duffy nằm trên chromosom số một và có liên quan đến 1 thể bệnh đục nhân mắt bẩm sinh (congenital cataract).

- Các kháng thể thuộc hệ Duffy.

Có 2 kháng thể: Anti-Fy^a và Anti-Fy^b. Anti-Fy^a phổ biến hơn, Anti-Fy^b hiếm hơn nhiều. Cả hai đều là kháng thể miễn dịch, loại IgG, khi làm kỹ thuật ngưng kết, dùng kỹ thuật

Antiglobulin dương tính tốt nhất vì hoạt tính yếu, nhưng không dùng được các kỹ thuật men (Enzyme Technique) vì kỹ thuật không những không tăng cường mà còn ức chế ngưng kết.

Cả hai kháng thể trên đều có khả năng gây tai biến truyền máu và cũng có trường hợp gây tai biến huyết tán sơ sinh hoặc thai nhi nhưng rất hiếm. Anti-Fy^b càng hiếm hơn Anti-Fy^a.

HỆ KIDD

Hệ Kidd được phát hiện từ năm 1951 bởi Allen, Diamond và Niedeziela. Cho đến nay, hệ này coi như gồm 2 allele và Jk^a và Jk^b, cùng với các kháng thể tương ứng Anti-Jk^a và Anti-Jk^b.

Năm 1959, tìm thấy kiểu hình Jk (a⁻ b⁻) ở châu Á (người philippine) và Trung Quốc và một vài người Tây Ban Nha). Điều này chứng tỏ có 1 allele là Jk (allele im lặng) mà những người nói trên phải là đồng hợp tử JkJk. Người ta cho rằng kiểu hình này chỉ có ở người châu Á, ở người châu Âu không có, tuy nhiên rất có thể có kiểu dị hợp tử. Còn gì khác nhau nữa thì chưa thực rõ.

Tần số ở người da trắng, châu Âu:

Gen Jk^b là 0,48

Gen Jk^a là 0,52

Kiểu di truyền:

Jka/jka: 0,2644

Jka/Jkb: 0,4966

Jkb/jkb: 0,2360

Theo những tài liệu gần đây thì tần số kháng nguyên Jk^a ở những người Caucasians khoảng 0,67, ở người da đen châu Mỹ

tới 0,93. Những số liệu có thể rất khác nhau nếu điều tra tỉ mỉ từng chủng tộc, từng nước.

Các kháng thể thuộc hệ Kidd:

1. Anti-Jk^a

Đại đa số là IgG, có một số ít trường hợp là IgM. Tất cả đều là kháng thể miễn dịch, có kết hợp bổ thể, trong các xét nghiệm in vitro rất dễ gây huyết tán nếu liên quan đến kháng thể nồng độ cao và có huyết thanh tươi (bổ thể). Tuy nhiên cũng hiếm khi gây tai biến truyền máu và bệnh huyết tán sơ sinh.

Có đặc điểm là kháng thể này thường xuất hiện và được kích thích tăng vọt bởi truyền máu và thai nghén, rất linh hoạt, thay đổi hoạt tính vì thế hay gây ra những phản ứng muộn trong truyền máu (sau một quá trình kích thích). Xét nghiệm lần đầu không thấy gì nhưng qua đáp ứng thứ kỳ kháng thể mới xuất hiện.

2. Anti - Jk^b

Cũng là IgG hầu hết có kết hợp bổ thể, thường xuất hiện cùng với nhiều loại kháng thể miễn dịch khác nữa. Cũng giống Anti - Jk^a ở điểm được phát hiện nhạy bằng kỹ thuật Antiglobulin và kỹ thuật men, nhưng khác Anti - Jk^a ở điểm thường là thủ phạm gây tai biến huyết tán truyền máu và huyết tán sơ sinh.

Anti · Jk^aJk^b

Là kháng thể miễn dịch, xuất hiện trong huyết thanh người Jk (a⁺b⁻), không tách riêng Anti · Jk^a và Anti · Jk^b được, nhưng phản ứng với cả hai hồng cầu Jk (a⁺) và Jk (b⁺).

Do tính chất của các kháng thể trên mà hệ Kidd có ý nghĩa quan trọng trong lâm sàng cả về tai biến huyết tán truyền máu và bệnh lý huyết tán sơ sinh.

Khi tiến hành các xét nghiệm thuộc hệ Kidd, cần có các chứng (Controls) như sau:

Kháng nguyên	Chứng dương	Chứng âm
Jk^a	$Jk(a^+b^-)$	$Jk(a^-b^+)$
Jk^b	$Jk(a^-b^+)$	$Jk(a^+b^-)$

Sự phát triển của hệ Kidd

Từ lâu, hệ Kidd vẫn giữ tính chất có vẻ như đơn giản so với các hệ kháng nguyên hồng cầu khác, cụ thể là gồm các kháng nguyên Jk^a , Jk^b , và Jk^aJk^b .

Nhưng từ năm 1974, phát hiện rằng kháng nguyên Jk^aJk^b không phải chỉ có trên hồng cầu mà có cả trên bạch cầu hạt neutrophil, khác với Jk^a và Jk^b riêng biệt, là những hoạt tính kháng nguyên chỉ có trên hồng cầu. Từ đó có thể kết luận rằng kháng nguyên Jk^aJk^b không thuộc hệ Kidd nhưng có thể là cấu trúc cơ sở làm nền cho các cấu trúc riêng biệt Jk^a và Jk^b .

Chương 3

THỰC HÀNH KỸ THUẬT AN TOÀN TRUYỀN MÁU

I. XÂY DỰNG VÀ BỐ TRÍ MỘT PHÒNG XÉT NGHIỆM MIỄN DỊCH HUYẾT HỌC

Phòng xét nghiệm miễn dịch huyết học thực chất là một phòng labô kỹ thuật sinh học phục vụ cho an toàn truyền máu và bệnh lý miễn dịch huyết học. Ở nhiều nước tiên tiến, có trình độ miễn dịch và huyết học phát triển, đây là một hệ thống liên hoàn nhiều phòng labô đặt trong mối quan hệ rất khăng khít và hoạt động hợp đồng nhịp nhàng, ngoài ra còn có mối quan hệ quốc gia và quốc tế thuận tiện.

Tuy nhiên ở mỗi nước, nhất là những nước mới phát triển, cần tuỳ hoàn cảnh và điều kiện để xây dựng và hoạt động từ nhỏ đến lớn, từ thấp lên cao, theo những tiêu chuẩn rất cơ bản. Xin nêu lên đây một số nguyên tắc xây dựng và bố trí một phòng xét nghiệm như vậy:

1. Mỗi phòng xét nghiệm nên có diện tích làm việc nhỏ hoặc vừa (từ 15 đến 30m²).

2. Ở xứ nhiệt đới như nước ta, nên có điều hoà nhiệt độ để ổn định nhiệt độ trong labô, nếu không thì tường phải dày, tốt nhất là 2 lớp, thoáng khí. Cửa sổ và cửa ra vào đều rộng, đủ bảo đảm ánh sáng, tốt nhất là không làm kiểu cánh cửa mở ra, mở vào mà thiết kế đẩy lên kéo xuống hoặc đẩy ngang, không choán diện tích làm việc bên trong phòng.

3. Các bàn làm kỹ thuật bên trong phòng điều hoà là bàn men trắng, bố trí sát tường hoặc ở giữa, tuỳ theo, nhưng làm sao tiện cho công việc của các kỹ thuật viên, phía trước và trên là

các ô-ta-gie dưới mặt bàn là các quầy, tất cả vừa tầm tay để bắt các động tác chạy đi chạy lại trong labô.

4. Từng khoảng cách trên bàn, cần bố trí một ngọn hơi đốt, hoặc ít nhất cũng là những bếp điện mạnh, những ngọn đèn hàn đốt bằng cồn, để có thể uốn, hàn các ống thủy tinh ngay tại chỗ, tiết trùng bất thường một số dụng cụ.

5. Trên từng dãy bàn, cần bố trí một ngọn hơi đốt, hoặc ít nhất cũng là những bếp điện mạnh, những ngọn đèn hàn đốt bằng cồn, để có thể uốn, hàn các ống thủy tinh ngay tại chỗ, tiết trùng bất thường một số dụng cụ.

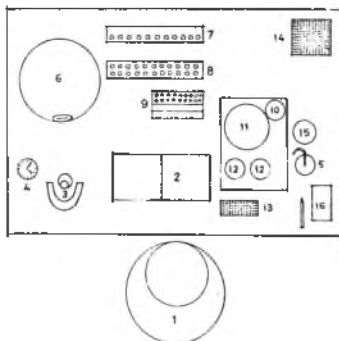
6. Mắc điện 220 V, 380 V. Ở mỗi vị trí của 1 KTV cần một bảng gỗ với những ổ cắm điện, không kể những ổ cố định cho các máy lớn chạy liên tục như tủ lạnh, tủ băng, ly tâm lạnh, ly tâm lớn, v.v.

Tuỳ tính năng của từng labô mà phân công từng vị trí cho từng kỹ thuật viên phụ trách (xem hình 3.1) chỉ những thiết bị lớn có thể và cần sử dụng chung, còn hầu hết trang thiết bị kỹ thuật nên phân riêng, chịu trách nhiệm từng người.

8. Tuỳ tính năng của từng labô mà bố trí các máy móc trang thiết bị cần thiết, thí dụ nếu là labô chuyên việc định nhóm và tìm kháng thể bất thường thì các máy ly tâm để bàn, kính hiển vi dọc ngưng kết, tủ ấm 37°C, cách thủy 56°C, tủ lạnh 4°C là những thiết bị không thể thiếu, hoạt động gần như thường xuyên, liên tục. Nếu là labô chuyên về hoá miễn dịch thì các máy điện di các loại, máy quang kế, đo pH, sắc ký, siêu ly tâm lại là thiết yếu. Sự sắp đặt hài hoà tối đa là một điều kiện bảo đảm cho hoạt động thuận lợi của labô.

Những điểm nêu trên chỉ là một số nguyên tắc chung mà trong hoàn cảnh nào, điều kiện nào cũng có thể vận dụng được, và cần vận dụng. Đó là những yêu cầu tối thiểu. Chưa nói tới những loại xét nghiệm chuyên sâu, thí dụ xét nghiệm miễn dịch

huỳnh quang đòi hỏi máy cắt lạnh (cryostat), buồng tối huỳnh quang, hoặc những thiết bị tự động đã và đang phổ cập trên thế giới. Cũng không kể tới các thiết bị quá phổ thông mà bất cứ phòng xét nghiệm nào cũng cần, thí dụ: các máy lắc, máy khuấy, thiết bị báo thời gian, báo phút, báo giây tự động, các máy hút, các thiết bị cất nước tự động trong labô.v.v.



Hình 3.1. Mẫu bố trí 1

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. Ghế ngồi | 9. Giá ống nghiệm |
| 2. Tấm men (toplin) | 10. Lọ nước muối sinh lý |
| 3. Kính hiển vi | 11. Chậu rửa |
| 4. Đồng hồ báo phút | 12. Cốc becher (1 để rửa ống hút, 1 để tráng sạch) |
| 5. Bình bơm | 13. Gạc thấm |
| 6. Máy tiệt trùng | 14. Gạch thấm dư trừ |
| 7. Thuốc thử | 15. Các ống hút cần thiết |
| 8. Các mẫu máu để xét nghiệm | 16. Vỏ và bút ghi kết quả |

II. MỘT SỐ THIẾT BỊ NHỎ DÙNG TRONG XÁC ĐỊNH NHÓM MÁU VÀ KHÁNG THỂ NHÓM MÁU

Ngoài máy móc và những trang thiết bị lớn, bao gồm cả những thiết bị tự động hiện đại, công việc kỹ thuật đầu tay dùng trong xác định nhóm hồng cầu và kháng thể đơn giản, không tốn kém lắm nhưng dùng chuyên và đồng bộ, chính quy, tiêu chuẩn hoá, tóm tắt sau đây.

1. Các pipett Pasteur dùng chung

Các pipett này là loại dụng cụ hàng đầu, rất cơ bản của người làm kỹ thuật định nhóm. Có thể mua sẵn hoặc tự làm lấy từ một ống thủy tinh. Khi cần đến chính xác cao, tất nhiên người ta sử dụng các pipett chia độ bao gồm cả các pipett tự động, nhưng trong kỹ thuật thông dụng, những pipett Pasteur cỡ giọt là 20giọt/ml (1 giọt = 0.05ml) là đủ. Có thể chia nhiều loại pipett Pasteur: loại dùng để rửa các vật phẩm như hống cầu, bạch cầu v.v không cần kích thước chuẩn lắm, loại pipett để dân máu, để đọc qua kính hiển vi, để phân bố các vật phẩm sinh học và các dung dịch. Có những loại pipett rất nhỏ để dùng cho các thuốc thử quý hiếm, có loại dành riêng cho thuốc thử Antiglobulin. Dưới đây là một mẫu pipett phổ thông nhất.

Pipett Pasteur thông dụng là loại dài 15 đến 16cm có phần đầu nhỏ khoảng 1/3 (5 - 6cm). Cả hai đầu bằng và không sắc cạnh, đầu trên lắp 1 quả bóp cao su thật khít (xem hình vẽ 3.2).

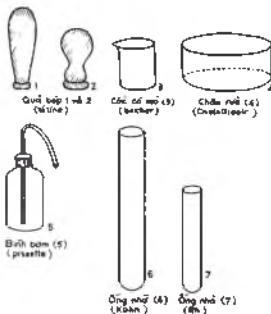
Thao tác điều khiển các pipett Pasteur là việc làm đầu tay của kỹ thuật viên chuyên khoa, vì dù có những thiết bị rất hiện đại, chính xác và tự động cũng không thể thay thế hoàn toàn được các pipett Pasteur này (xem hình 3.3).



Hình 3.2. Pipett Pasteur và quả bóp cao



Hình 3.3. Cách cầm pipett Pasteur



Hình 3.4. Các dụng cụ khác và các dụng cụ thường sử dụng trong phòng xét nghiệm

Các quả bơm cao su thật tốt, lắp vào đầu trên của pipett Pasteur, phải đạt yêu cầu vừa khít chặt, vừa căng và chun giãn, vừa mềm, vừa bền, vừa đúng kích thước để hút dịch tối đa là 2/3 dung tích của pipett.

- Cốc có mô loại 100ml
- Chậu rửa, gạc thấm, bình bơm bằng chất dẻo.

- Ống nghiệm Kahn: trên thế giới các typ kahn đã được tiêu chuẩn hoá đồng bộ như sau: dài 75mm, đường kính trong 10mm, có thể bằng chất dẻo, có thể bằng thủy tinh nhưng bề dày đủ chịu đựng lực ly tâm với 6.000 vòng phút hoặc cao hơn nữa. Đây là loại typ rất thông dụng.

- Ống nghiệm nhỏ (microtyp) dài 50mm, đường kính trong 5mm, còn gọi là typ Rh. Dùng cho các phản ứng dọc vi thể.

- Tấm Opalin kích thước 15 x 15cm và 15 x 30cm. Nếu không có loại chuyên biệt, mỏng nhẹ, thì có thể lắp 2 viên gạch vuông men trắng thành một tấm 15 x 30, hoặc dùng riêng 1 viên 15 x 15cm. Các tấm này dùng trong các định nhóm trên tấm.

- Các giá ống nghiệm tiêu chuẩn, bằng chất dẻo dùng typ Kahn và typ nhỏ, sao cho khi đặt các typ vào rất khít, giữ các typ thật thẳng để phân bố vật phẩm và dung dịch được dễ dàng.

- Các lam kính 10 x 2,5cm dùng cho việc dàn vật phẩm dọc ngưng kết dưới kính hiển vi.

2. Thuốc thử chủ yếu

- Các huyết thanh nghiệm (serum - test) hệ ABO, và các hệ khác.

- Các hồng cầu nghiệm hệ ABO và các hồng cầu nghiệm thuộc các Panel hồng cầu khác nhau (xem Chương 2 và 4).

- Các loại Antiglobulin đa giá, đơn giá đặc hiệu.
- Các men papain, trypsin, bromelin, ficin.
- Bỏ thể (C)

III. PHẢN ỨNG KHÁNG NGUYÊN KHÁNG THỂ VÀ CÁC THỂ HIỆN IN VITRO

Mọi kỹ thuật miễn dịch - huyết học đều là hoà trộn 1 lượng nhỏ kháng thể với 1 lượng tương đương kháng nguyên rồi quan sát, đánh giá hiện tượng xảy ra xem có phản ứng hay không. Nếu có thì là kết quả dương tính, nếu không thì là kết quả âm tính.

Nếu huyết thanh chứa kháng thể được biết trước, dùng làm thuốc thử để tìm và xác định kháng nguyên hồng cầu chưa biết thì huyết thanh đó gọi là *huyết thanh nghiệm* và phản ứng nói trên dùng để phát hiện và xác định kháng thể hoà tan trong huyết thanh.

Tóm lại, dùng cái đã biết rồi để tìm và xác định cái chưa biết dựa trên tính chất đặc hiệu của phản ứng miễn dịch giữa kháng nguyên hồng cầu và kháng thể hoà tan.

Những cái đã biết khi sử dụng làm thuốc thử phải được tiêu chuẩn hoá để bảo đảm chất lượng, theo những quy định quốc gia hoặc quốc tế. Cụ thể là các huyết thanh nghiệm (serum test) dùng trong kỹ thuật định nhóm đều phải hội đủ các tiêu chuẩn quy định.

Tuy nhiên, sự kết hợp kháng nguyên/ kháng thể có 2 đặc tính cơ bản là đặc hiệu và thuận nghịch. Tính đặc hiệu như đã biết còn tính thuận nghịch có nghĩa là tính phục hồi, đã kết hợp rồi lại rời nhau ra. Cụ thể như sau:

1. Đặc hiệu

Kháng thể nào ứng với kháng nguyên ấy. Đó là sự tương ứng (correspondent). Nhờ đặc tính này mà sử dụng kỹ thuật phản ứng hai chiều, biết kháng nguyên thì tìm được kháng thể, biết kháng thể thì tìm được kháng nguyên. Đó là nguyên lý kỹ thuật của định nhóm bằng hai nghiệm pháp (hồng cầu và huyết thanh), để phát hiện và xác định kháng thể bất thường.

2. Thuận nghịch

Phản ứng kháng nguyên/ kháng thể được tác động bởi cân bằng lý hoá. Nếu đặt vào những điều kiện phá vỡ cân bằng ấy như không thích hợp pH, lực ion, nhiệt độ người ta sẽ tạo cho phản ứng chạy theo chiều nghịch chứ không thuận cụ thể là tách rời kháng thể ra khỏi kháng nguyên sau khi đã kết hợp thành phức hợp kháng nguyên/kháng thể, rồi thu lại kháng thể. Như thế gọi là kỹ thuật tách.

Nói chung khi phức hợp kháng nguyên/kháng thể càng chặt và phức tạp thì càng khó tách, thí dụ các kháng thể kết hợp bổ thể khó thu lại hơn, so với những kháng thể không kết hợp bổ thể. Lấy một dẫn chứng của Mollison: Nếu hồng cầu Le^{a+b} gắn với 1 Anti - Le^a có dùng EDTA ngăn sự kết hợp bổ thể thì từ phức hợp đó sẽ tách được 1 lượng Anti - Le^a nhiều hơn khi tách từ 1 phức hợp hồng cầu Le^{a+b} Anti - Le^a không dùng EDTA.

A. KỸ THUẬT "GẮN" HAY HẤP THỤ (ABSORPTION)

Điều kiện để gắn khác nhau với từng loại kháng thể. Điều kiện đầu tiên là nhiệt độ, thí dụ với Anti - A, Anti - B là 4°C, với kháng thể Anti - Rh là 37°C. Thời gian ủ thường là 1 giờ. Ủ xong đem ly tâm để có dịch nổi, bỏ phần dịch nổi đi lần thứ nhất, làm tiếp lần thứ hai, lần thứ ba, cho đến khi dịch nổi thử không còn kháng thể nữa. Phổ biến thường lấy thể tích huyết thanh bằng thể tích khối lắng hồng cầu, khối lắng này cũng đã qua 3 lần rửa bằng nước muối sinh lý (NaCl 9‰).

Mục đích kỹ thuật gắn nhằm:

- Xác định có phải một kháng thể nào đó có mặt trong một phức hợp kháng nguyên/kháng thể, hoặc một phức hợp mà mình nghi vấn.
- Loại trừ một hoặc nhiều kháng thể không cần thiết khỏi một chế phẩm (thuốc thử chẳng hạn).

- Kiểm tra, hoặc xác định các giả thiết về tính đặc hiệu của hỗn hợp, thí dụ trường hợp nghi có cả 2 kháng thể Anti - Fy^a và Anti - Jk^a trong hỗn hợp. Cần xác định giả thiết này bằng cách dùng hồng cầu Fy^{a+} đã biết gắn với hỗn hợp nói trên. Sau gắn, nếu thử lại chỉ còn lại Anti - Jk^a, mất hết Anti - Fy^a là giả thiết đúng. Chú ý khi chọn hồng cầu Jk^{a+} phải đồng thời có Jk^b. Cũng có thể chọn hồng cầu Jk^{a+} Fy^{a+} để gắn và loại Anu - Jk^a, lần này nếu chỉ còn lại duy nhất Anti - Fy^a là giả thiết đúng.

Ngoài kỹ thuật nhiệt độ thường dùng nói trên, có thể dùng hai kỹ thuật đặc biệt:

- Hấp thụ với hồng cầu formol
- Hấp thụ với stroma của hồng cầu (huỷ hồng cầu, bỏ huyết sắc tố, chỉ giữ lại màng đệm).

1. Kỹ thuật hấp thụ với hồng cầu formol

- Thu lấy khối lắng hồng cầu, rửa 3 lần bằng nước muối đem hoá thành huyền dịch khoảng 30% trong nước muối 0,9%, để vào nồi hấp ướt (autoclave) 30 phút (nhiệt độ 120°C), lấy ra để nguội rồi đem rửa hồng cầu với nước cất.

- Chuẩn bị dung dịch formol dùng ngay sau khi pha: thể tích formalin loại p.a 36% HCOH với 29 thể tích nước cất.

- Cho dung dịch formol vào khối lượng hồng cầu nói trên với tỷ lệ 2/1, cụ thể là nếu từ đầu dùng 100ml hồng cầu thì cho 200ml formol, lắc đều rồi đặt vào 37°C trong 30 phút.

- Sau 30 phút, lấy hết formol đi, rửa hồng cầu 3 lần với thật nhiều nước cất cho sạch formol. Hồng cầu như vậy không bị huyết tán nữa. Lần rửa cuối, ly tâm 20 phút để kiệt sạch nước rửa

- Tiến hành kỹ thuật: Lấy 1 thể tích hồng cầu formol và 1 thể tích huyết thanh cần hấp thụ, trộn đều, để 2 giờ ở 4°C, ly tâm, kiểm tra kết quả.

2. Kỹ thuật hấp thụ với “stroma” (chất đệm) của hồng cầu

Như đã biết, hồng cầu hình đĩa tròn, 2 mặt lõm, trong chứa huyết sắc tố, ngoài được bọc bằng 1 màng 3 lớp, lớp trong cùng và lớp ngoài cùng có tính hảo nước (hydrophilic), lớp giữa có tính kỵ nước (hydrophobic). Màng hồng cầu giữ bên trong huyết sắc tố, nước, glucose và muối khoáng, các chất đó làm cho hồng cầu căng tròn có màu hồng khi nhìn máu tươi. Nếu màng đó bị hở, bị rách hoặc bị tổn thương, tất cả các chất chứa bên trong sẽ thoát hết ra ngoài, đó là hiện tượng huyết tán hay huỷ hồng cầu (hemolysis), khi ấy còn lại chất đệm (stroma) bao gồm các màng hồng cầu trong đó có các kháng nguyên thuộc các hệ nhóm máu vốn nằm giữa các lớp của màng. Vì vậy có thể gây huỷ hồng cầu, thu lấy stroma. Stroma này mang đầy đủ các kháng nguyên của hồng cầu, có thể dùng kỹ thuật hấp thụ. Kỹ thuật tiến hành như sau:

- Lấy máu chống đông bằng citrat Na hoặc dung dịch ACD.
- Loại bỏ huyết tương

- Rửa bằng nước cất cho đến khi thu được một chất màu trắng. Nếu dùng khối máu đủ để thu được khoảng 1/2 dung tích typ Kahn (10 x 75mm) khối lắng hồng cầu, nghĩa phải lấy khoảng 10ml máu toàn phần. Cho thêm 1 thể tích tương đương nước vào đầy typ Kahn, lắc đều, ly tâm 15 phút, bỏ hết dịch nổi lẫn đầu rất đỏ vì toàn là huyết sắc tố, lại cho đầy nước cất, dùng pipett trộn đều, ly tâm như trên, làm như thế cho đến khi dịch nổi hết màu hồng mới thôi.

- Rửa 2 lần cuối bằng nước 0,9%, stroma của hồng cầu màu trắng giữ ở 4°C được nhiều ngày.
- Khi hấp thụ, dùng tỷ lệ 1 thể tích stroma hồng cầu với 6-9 thể tích huyết thanh cần hấp thụ.

Thông thường cứ 100ml khối lắng hồng cầu thì được 1 typ Kahn đầy stroma hồng cầu.

Ý nghĩa và giá trị của việc dùng stroma hồng cầu để hấp thụ là ít pha loãng huyết thanh cần hấp thụ và tránh mọi huyết tán có thể xảy ra trong quá trình làm kỹ thuật.

B. KỸ THUẬT TÁCH (ELUTION)

Có thể tách rời kháng thể khỏi kháng nguyên mà nó đã gắn vào bằng pha loãng, bằng nhiệt độ, bằng toan hoá môi trường, bằng ether, bằng cồn. Thông dụng nhất là phương pháp dùng nhiệt độ hoặc ether. Các kháng thể tách ra, có thể thu lại trong môi trường muối, dung dịch đệm phosphat pH 7.2 hoặc huyết thanh người.

1. Tách bằng nhiệt độ

Dựa trên nguyên lý gắn của các kháng thể với kháng nguyên hồng cầu, thường ở nhiệt độ thấp hơn hoặc bằng 37°C và phản ứng kháng nguyên/kháng thể là thuận nghịch, người ta nâng nhiệt độ lên cao tới 56°C thì mọi phức hợp kháng nguyên/kháng thể đều rời ra mà chưa bị hỏng, như vậy có thể thu lại cả kháng nguyên, kháng thể, nhất là kháng thể. Lấy thí dụ: Từ phức hợp các hồng cầu A₁, A₂, A_m, A_{el}, A_{end}, tức là các nhóm máu A yếu đã gắn với kháng thể Anti-A, đã tách được Anti-A khi ủ ở nhiệt độ 56°C, thu lấy từ dịch nổi sau ly tâm. Kỹ thuật tiến hành như sau:

- Lấy 1 thể tích khối lắng hồng cầu nghi là A yếu cần xác định (đã rửa kỹ 3 lần), cho thêm vào 2 thể tích Anti-A nồng độ thật cao, trộn đều, đem ủ ở nhiệt độ 4°C từ 2 đến 16 giờ tùy theo, đó là thì gắn

- Sau đó rửa hồng cầu 6 lần bằng nước muối 0,9% lạnh ở 4°C. Sau lần rửa cuối, cho vào 1 thể tích tương đương dung dịch đệm phosphat, trộn đều tạo thành một huyền dịch rồi đặt vào cách thủy 56°C trong 10 phút.

- Sau 10 phút, lấy ra ly tám thật nhanh trong 5 phút tốc độ 3.000 vòng/phút

- Hút nhanh dịch nổi, đem dịch này thử với các hồng cầu nghiệm A, B, O ở 4°C, 22°C trong 2 giờ, đọc kết quả dưới kính hiển vi. Có thể song song làm hiệu giá, so sánh với Anti-A lúc trước khi gán và tách.

Đáng chú ý đây là phản ứng dùng nhiệt độ, nếu sơ xuất dễ sai lầm kết quả, vậy để đảm bảo kỹ thuật, chắc chắn không có khâu nào sai sót cần song song làm kỹ thuật gán tách với hồng cầu O làm đối chứng. Sau thì gán, rửa hồng cầu 6 lần, phải xác định dịch rửa lần cuối thực sự sạch hết kháng thể, để sau khi tách nếu thu lại được kháng thể Anti-A thì đúng là Anti-A đã gán vào hồng cầu và được tách ra, không phải Anti-A lúc đầu còn sót lại.

2. Tách bằng ether (VOS)

Có thể dùng 2 cách:

• Cách cơ bản của VOS và KELSSLL 1956 thường dùng trong trường hợp lấy 1 Anti-Rh ra khỏi hỗn hợp nhiều kháng thể.

- Chọn hồng cầu thích hợp, ứng với kháng thể cần gán và kháng thể cần để lại, thí dụ với một hỗn hợp Anti-D, Anti-Fy^a, Anti-Jk^a mà muốn lấy riêng Anti-D thì phải chọn hồng cầu D⁺, Fy^a-, Jk^a-. Rửa hồng cầu 3 lần để có khối lắng hồng cầu, bỏ dịch nổi đi.

- Hoà 1 thể tích khối lắng hồng cầu trên, với 1 đến 2 thể tích huyết thanh cần xử trí, để 1 giờ ở 37°C là nhiệt độ thuận lợi nhất cho việc gán Anti-D. Sau đó ly tâm lấy huyết thanh ra, hồng cầu còn lại rửa 4 lần bằng nước muối sinh lý, bỏ hết dịch nổi, giữ lại khối lắng hồng cầu.

- Dùng nước cất gây huỷ hồng cầu: cứ 2ml khối lắng hồng cầu thì cho 8ml nước cất, để 15 phút ở nhiệt độ từ 22°C đến 30°C, sau đó nhỏ tiếp từng giọt HCl N/10 đến khi thấy xuất hiện tối đa các stroma hồng cầu.

- Ly tâm 10 phút (3.000 vòng/phút), bỏ hết dịch nổi màu đỏ xẫm (vì huyết sắc tố hòa tan), rửa stroma còn lại bằng nước muối sinh lý, ly tâm lần cuối, giữ lại stroma hồng cầu, bỏ dịch nổi.

- Cứ 1 thể tích stroma đỏ cho thêm 1 thể tích huyết thanh AB và 1 thể tích ether. Bịt tub lại, lắc mạnh cho đến khi lên bóng các stromas. Ly tâm 3.000 vòng/phút trong 10 phút, hút bỏ 2 lớp phía trên gồm ether và stroma, chỉ giữ lại lớp dưới chứa huyết thanh AB và kháng thể đã tách ra. Làm bay hơi nốt ether còn lại bằng cách để typ vào cách thủy 37°C 20 phút, có thêm quạt gió càng tốt. Ly tâm lần cuối 20 phút x 3.000 vòng/phút, loại bỏ nốt chút phần tử nào sót lại. Kháng thể có mặt trong huyết thanh AB được kiểm tra xác minh như thường lệ.

♦ *Cách đơn giản của Rubin năm 1963:* Cách này thường dùng trong trường hợp cần tách tự kháng thể loại IgG Anti-Rh khỏi hồng cầu trong huyết tán tự miễn: Tiến hành cụ thể như sau:

- Cho lần lượt vào một typ Kahn, 1 thể tích khối lắng hồng cầu người bệnh đã rửa 6 lần, 1 thể tích nước muối sinh lý hoặc huyết thanh AB càng tốt, 2 thể tích ether. Bịt typ lại, lắc mạnh 1 phút.

- Ly tâm 3.000 vòng/phút trong 10 phút, kết quả được 3 lớp: ether, stroma hồng cầu bị hoá giàng, 1 môi trường giàu huyết sắc tố với kháng thể đã được tách ra.

- Thủ dịch tách (eluate) với kháng nguyên tương ứng. Nếu cần giữ lâu hơn thì hấp cách thủy 37°C trong 15 phút để bay hơi nốt ether còn lại.

Cách làm này nhanh và giản đơn hơn nhưng có trở ngại là lẫn huyết sắc tố, do đó khi thử lại dịch tách với hồng cầu chì nên dùng kỹ thuật enzyme (hồng cầu xử lý men), không dùng Antiglobulin test.

Lợi ích của kỹ thuật tách

1. Dùng để xác định các kháng nguyên yếu. Các kháng nguyên yếu chỉ đủ gắn được với kháng thể, nói cách khác, chỉ đủ để được cảm thụ, không tạo nên hiện tượng ngưng kết quan sát được. Thì gắn là thì gây cảm thụ đặc hiệu. Thì tách là thì thu lại kháng thể, xác định sự có mặt của kháng thể trong dịch tách, tức là xác định kháng nguyên yếu nào đó tương ứng trên hồng cầu, thí dụ các A₂D⁺ yếu v.v

2. Để tách 1 kháng thể ra khỏi 1 hỗn hợp nhiều kháng thể.

3. Dùng trong chẩn đoán bệnh huyết tán sơ sinh. Có ý nghĩa quan trọng trong bệnh huyết tán sơ sinh hệ ABO.

4. Dùng trong chẩn đoán những tai biến truyền máu do không hoà hợp nhóm máu. Thí dụ người nhóm máu O nhận máu A. Trong những giờ sau tai biến, định nhóm máu có thể thấy một hình ảnh 2 dân số, tức là có 2 loại hồng cầu A và O. Nếu tách được Anti-A từ hồng cầu A1 thì đó là chứng cứ hồng cầu A đã bị gắn kháng thể Anti-A của người O.

5. Dùng trong nghiên cứu các tự kháng thể gây cảm thụ hồng cầu trong các chứng huyết tán miễn dịch hậu phát. Dem dịch tách được thử với những hồng cầu trong các Panel Rh và xác định kháng thể có trong dịch tách đó.

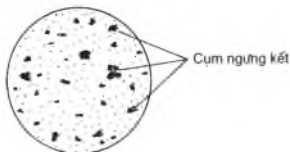
6. Dùng để loại trừ 1 kháng thể gắn trên hồng cầu khi có gặp khó khăn trong việc xác định nhóm máu.

C. KỸ THUẬT NGƯNG KẾT

Rất thông dụng trong huyết học - miễn dịch nói chung và trong các băng máu nói riêng.

- Cơ chế ngưng kết

Như ở chương một đã nói, các phản ứng kháng nguyên/kháng thể do các đặc tính lý-hoá chi phối. Ngưng kết miễn dịch là hiện tượng các tế bào lưu hành (chủ yếu trong máu tuần hoàn) được cảm thụ với kháng nguyên đặc hiệu rồi chụm lại thành đám, thành cụm, gọi là cụm ngưng kết (agglutination). (hình 3.5)



Hình 3.5. Hiện tượng ngưng kết

Bình thường, các tế bào máu như hồng cầu, bạch cầu bị các lực đẩy làm cho không dính lại với nhau mà tách rời nhau mặc dù ở những mao quản, những xoang mạch và những nơi tập trung, các tế bào lưu hành rất sát nhau, chen nhau, ép vào nhau. Nhưng khi tế bào cảm thụ kháng thể, kháng thể gắn lên kháng nguyên nằm trong màng tế bào làm thay đổi điện tích khiến cho lực hút giữa các tế bào cao hơn lực đẩy, khi ấy xảy ra hiện tượng ngưng kết. Vậy ngưng kết có được là do tác dụng của kháng thể đặc hiệu và điều kiện của môi trường. Cụ thể:

- Khi kháng thể đủ mạnh thì dù trong môi trường nước muối sinh lý trung tính, cũng có thể gây ngưng kết tế bào lưu động, thí dụ hồng cầu, không cần sự hỗ trợ của yếu tố nhân tạo can thiệp vào.

- Khi kháng thể yếu, phải có những tác động khác của môi trường hoặc đưa thêm vào một yếu tố trung gian mới gây được hiện tượng ngưng kết, nếu không chỉ dừng ở mức độ cảm thụ

kháng nguyên/kháng thể mà thôi. Khi phải tạo ra những tác động của môi trường hoặc đưa thêm vào một yếu tố trung gian nào đó để gây ngưng kết, người ta gọi là các biện pháp kỹ thuật ngưng kết nhân tạo hoặc tạo ra, thí dụ các kỹ thuật men (Enzyme techniques), các kỹ thuật dùng môi trường albumin (Albumin techniques).

- Ứng dụng cơ chế ngưng kết nói trên, có thể hiểu những trường hợp ngưng kết ngoài miễn dịch nghĩa là không do phản ứng kháng nguyên/kháng thể, mà trong miễn dịch huyết học ngưng kết là ngưng kết giả. Gọi như thế chỉ vì nó làm ta lầm tưởng có phản ứng kháng nguyên/kháng thể mà ta đang muốn phát hiện và xác định.

- *Phản ứng ngưng kết và cách đọc*

Có hai kiểu tiến hành phản ứng miễn dịch huyết học: Tiến hành trên tấm (Tile Method) và tiến hành trong ống nhỏ (Tube technique).

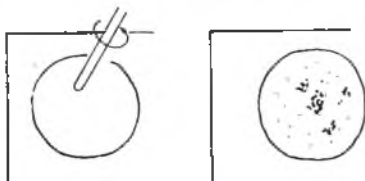
1. Trên tấm (Tile method)

Dùng một tấm men trắng (Opalin) làm nền, không nên dùng lame kính vì chỉ có trên một nền trắng và mịn mới dễ dàng quan sát hiện tượng ngưng kết và không ngưng kết, ngưng kết toàn bộ hoặc chỉ một phần, mạnh hay yếu, nhanh hay chậm.

Khi một kháng thể mạnh và nhạy, đủ sức gây ngưng kết hồng cầu ở nhiệt độ labô (22°C đến 30°C) ngay trên tấm men opalin trắng, với huyền dịch hồng cầu pha trong nước muối sinh lý, không cần một sự can thiệp thêm, thì thông dụng là phương pháp tiến hành phản ứng ngưng kết trên tấm (Tile method). Đó là trường hợp đối với những kháng thể ngưng kết có nồng độ cao, hoạt tính mạnh, độ nhạy nhanh, cụ thể là trường hợp của các kháng thể, kháng nguyên thuộc hệ ABO (A_1 , A_2 , B, H). Phương pháp như sau:

- Lấy mẫu hồng cầu cần định nhóm rửa 3 lần bằng nước muối sinh lý pha thành huyền dịch 5 đến 10% cũng trong nước muối như thế. Lấy 1 giọt huyết thanh nghiệm (chứa kháng thể đã biết sẵn) đặt lên 1 vị trí của tấm men, đặt 1 giọt huyền dịch hồng cầu nói trên ngay sát cạnh giọt huyết thanh (hồng cầu mang kháng nguyên chưa biết).

- Lấy 1 đĩa thủy tinh hoặc 1 vật tương tự trộn đều 2 thứ bằng cách khuấy tròn, đường kính 2 - 3cm. Cắm tấm men lên, đảo nhẹ cho đều và quan sát (hình 3.6).



Hình 3.6. Đảo nhẹ bằng 1 đĩa thủy tinh theo cách khuấy tròn để quan sát hiện tượng ngưng kết

- Nếu phản ứng dương tính, những cụm ngưng kết sẽ xuất hiện sau vài giây, chậm nhất cũng trước 1 phút. Độ ngưng kết được đánh giá, từ đó xác định nhóm của hồng cầu dựa trên kháng thể đã biết trong huyết thanh nghiệm.

- Nếu cần xác định kháng thể trong huyết thanh bằng hồng cầu nghiệm, trường hợp này kháng thể là yếu tố chưa biết, còn kháng nguyên hồng cầu là yếu tố đã biết sẵn, ta cũng làm như trên chỉ khác khi xác định kết quả thì từ kháng nguyên hồng cầu nghiệm, xác định được kháng thể trong huyết thanh (hình 3.7).

Anti. A	Anti. B	Anti. A+B	Hc.A	Hc.B	Kết luận
					nhóm A
					" B
					" O
					" AB

Hình 3.7. Đọc kết quả ngưng kết trên tấm

2. Trong typ (Typ technique)

Để có độ chính xác cao hơn, nhất là đối với những trường hợp kháng thể yếu, kháng nguyên yếu hoặc phản ứng kháng nguyên/kháng thể không đủ mạnh để dễ quan sát trên tấm, cần ly tâm, ủ ở nhiệt độ thích hợp, rửa hồng cầu nhiều lần, phải dùng kỹ thuật trong ống (typ). Cách làm như sau:

- Có thể dùng typ Kahn hoặc typ nhỏ (microtube) tùy theo.

- Đặt 1 - 2 giọt huyết thanh nghiệm và 1 - 2 giọt huyền dịch hồng cầu cần định nhóm (2 - 5%) vào 1 typ, lắc đều rồi ly tâm khoảng 1800 vòng/phút, trong 1 phút. Nếu không phải để định nhóm hồng cầu mà là kháng thể trong huyết thanh thì cũng làm như trên, chỉ khác là lần này dùng hồng cầu nghiệm và huyết thanh cần thử.

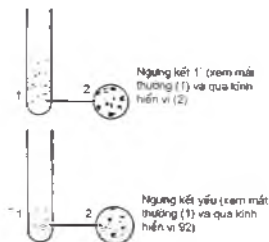
- Nếu kỹ thuật tiến hành trong typ nhỏ (microtube) thì sau khi lắc đều, không ly tâm mà đặt trong nhiệt độ thích hợp tùy theo yêu cầu và mục đích (4°C, 18°C, 22°C, 30°C, 37°C...) 1 đến 2 giờ.

- Đọc kết quả bằng cách gõ nhẹ đáy ống trên 1 nền cứng cho phân hồng cầu lắng ở đáy ống bong ra, hoà đều lại. Nếu phản ứng dương tính thì lấy các cụm ngưng kết (agglutination) to hoặc nhỏ không bong ra và hoà lại thành huyền dịch mà tồn đọng ở đáy ống. Nếu phản ứng âm tính thì không thấy các cụm ngưng kết dù rất nhỏ và hoà lại thành huyền dịch màu hồng.

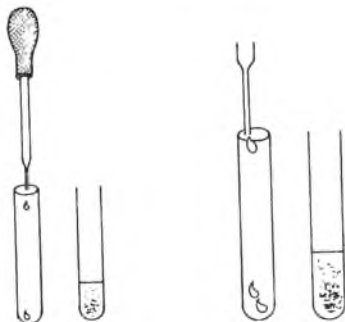
Nên đọc kết quả ngưng kết bằng một gương lồi hoặc dùng một nguồn sáng để thấy rõ những cụm ngưng kết quá nhỏ, khó nhận.

- Khi phân ứng làm trong các ống nhỏ (microtubes) thì phản ứng dùng pipett Pasteur hút nhẹ lấy hết hồng cầu lắng ở đáy ống ra, dần lên lam kính, xem và đọc kết quả dưới kính hiển vi.

- Cả khi làm kỹ thuật trên tấm hoặc trong tỳp Kahn, nếu thấy nghi vấn, chưa rõ ràng, nên hút lấy vật phẩm đặt lên lam kính xem dưới kính hiển vi (hình 3.8 và 3.9).



Hình 3.8. Kết quả xem mắt thường và qua kính hiển vi



Hình 3.9. Ngưng kết 2+ trong ống nhỏ (Rh) và ống nhỏ (Kahn)

Cách nhỏ giọt, cầm pipett thẳng đứng, không chạm vào thành ống

3. Lựa chọn cách làm

Thông thường, đối với những trường hợp phản ứng không mạnh, những kháng thể vừa và yếu, những kháng nguyên có hoạt tính thấp, những kháng thể bất thường, những trường hợp tinh tế, phát hiện khó khăn đều dùng kỹ thuật trong typ, nhất là typ nhỏ và đọc kết quả dưới kính hiển vi. Làm trên tấm opalin chỉ trong những trường hợp định nhóm ABO phổ thông, những trường hợp biết chắc rằng kháng thể, kháng nguyên đều mạnh, phản ứng rõ ràng. Nhiều kỹ thuật mer tuy làm phản ứng trong typ, nhưng khi đọc kết quả lại đọc trên tấm. Tuy vậy,

khi thấy có chút gì phân vân, chưa thoả mãn thì chuyển sang kỹ thuật typ, thí dụ khi định nhóm ABO trên tấm thấy hiện tượng ngưng kết không trọn vẹn, vẫn còn thấy dịch màu hồng làm cho nền trắng của tấm men không lộ ra hoàn toàn. Điều này chứng tỏ bên cạnh những hồng cầu bị ngưng kết còn một số khác không bị ngưng kết, không nên dừng lại ở đây. Lấy pipett Pasteur hút lấy vật phẩm đặt lên lam kính, xem kỹ dưới kính hiển vi. Hiện tượng này khá quan trọng, có thể do kháng thể yếu, phản ứng yếu, cũng có thể có 2 dân số hồng cầu (double population).

Chưa nói tới trong tài liệu này về các kỹ thuật tự động, mà tới nay nhiều nước đã dùng rộng rãi, rất nhiều triển vọng, chuẩn lợi và chính xác.

4. Đánh giá độ ngưng kết

Phổ cập nhất là dùng 2 chỉ tiêu: Hiệu giá kháng thể và mức ngưng kết.

a. Hiệu giá kháng thể

Thường dùng nước muối 9/1.000, nhưng có thể dùng dung môi khác tùy theo yêu cầu của từng loại kháng thể, thí dụ dung môi albumin Pha loãng gấp đôi phần huyết thanh cần hiệu giá. Để riêng huyết thanh nguyên chất ra 1 bên, lấy từ typ đầu số (số 1) pha loãng 1/2, tiếp đó là 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, kết hợp từng bộ pha loãng nói trên, kể từ ống số 1 cho đến ống cuối cùng (5, 10 ống typ tùy theo).

b. Định mức độ ngưng kết

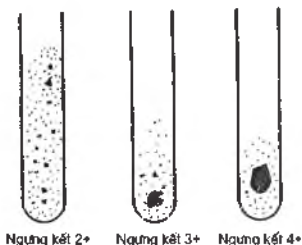
+++ : Những cụm ngưng kết lớn khi gõ đáy ống bong ra.

++ : Những cụm ngưng kết vừa

+ : Những cụm ngưng kết nhỏ

(±) : Những cụm ngưng kết rất nhỏ, tản mạn, nhưng không còn hồng cầu tự do, không còn dịch hồng cầu.

— Khi gõ đáy ống vào một nền cứng, huyền dịch được lập lại một màu đồng nhất, không thấy ngưng kết (hình 3.10).



Hình 3.10. Định mức độ ngưng kết trong ống nghiệm

Thí dụ:

1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/204
+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	(+)	-

Cho điểm: +++ là 10 điểm, ++ là 8 điểm, + là 5 điểm; (+) là 2. Theo quy ước điểm trên, huyết thanh được thử có giá trị như sau:

1. Hiệu giá 512
2. Điểm giá trị ngưng kết là 73.

Có thể cho điểm so sánh với đơn vị quốc tế. Muốn vậy phải hiệu giá và định mức độ ngưng kết song song với mẫu huyết thanh quốc tế lấy làm chuẩn. Theo quy ước, hiệu giá 1 huyết

thanh quốc tế chuẩn là 256. Nếu khi làm song song mà mẫu quốc tế đạt (+) ở độ pha loãng 1/512 thì huyết thanh trên có hiệu giá là 256 (tính so với mẫu quốc tế). Nếu mẫu quốc tế đạt (+) ở độ pha loãng 1/128 thì huyết thanh có hiệu giá tối 1024 (tính so với mẫu quốc tế).

c. Ngưng kết tạo ra hay nhân tạo

Có những kháng thể yếu, hoặc kháng nguyên yếu khiến cho phản ứng miễn dịch chỉ dừng lại ở hiện tượng cảm thụ hồng cầu (tức là gắn kháng thể vào kháng nguyên của màng hồng cầu). Muốn quan sát và đánh giá được phản ứng miễn dịch đó, cần sử dụng nhiều phương pháp kỹ thuật bổ sung những yếu tố làm cho phản ứng gắn (cảm thụ) trở thành nhìn thấy, bằng mắt thường cũng như qua kính hiển vi, hoặc có thể định tính, định lượng được. Trong số các phương pháp kỹ thuật bổ sung những yếu tố như vậy, có những kỹ thuật gọi là ngưng kết nhân tạo. Đó là những phương pháp kỹ thuật được dùng rất phổ biến từ xưa đến nay, nhằm biến những phản ứng cảm thụ hồng cầu không ngưng kết thành những hiện tượng ngưng kết. Có 4 loại kỹ thuật như thế:

- Dùng môi trường cao phân tử cho tiến hành phản ứng, như môi trường albumin, dextran v.v(Albumin technique)
- Xử lý hồng cầu trước bằng men tiêu protein như papain, trypsin, bromelin, ficin (Enzyme technique).
- Dùng trung gian là các Antiglobulin(Antiglobulin technique hay Coombs test).

Dùng các thiết bị phân tích tự động (Autoanalyser).

1. Các môi trường cao phân tử

Thường gọi là Diamond test, dùng rộng rãi trong định nhóm và kháng thể thuộc hệ Rh.

Các cao phân tử gồm dextran, subtosan, albumin bò huyết thanh người (nhóm AB). Trong đó, albumin bò là thông dụng nhất. Đa số các kháng huyết thanh Anti-Rh trên thị trường đều dùng loại albumin này. Nhiều trường hợp dùng huyết thanh người, tốt và tiện hơn albumin bò, thì dù đối với các kháng nguyên và kháng thể hệ Kell. Kỹ thuật phát hiện các Anti - A, Anti - B miễn dịch cũng hay dùng môi trường huyết thanh người (huyết thanh AB).

Gần đây có xu hướng dùng rộng rãi kỹ thuật men vi nhậy hơn, dễ sử dụng. Tuy nhiên với phương pháp tự động (auto analyser) thì môi trường cao phân tử là tiện lợi nhất. Vì những môi trường này gây ngưng kết hồng cầu đối với hầu hết các kháng thể khi các kháng thể ấy mới chỉ gắn lên hồng cầu. Nồng độ thường dùng từ 15 đến 30%.

a. Tiến hành kỹ thuật

- Nếu là kháng huyết thanh đã đông khô thì hoà tan lại theo quy định bằng môi trường cao phân tử. Nếu làm phản ứng trong typ thì pha 5%, nếu làm phản ứng trên tấm opalin thì pha từ 20% đến 50%. Môi trường cao phân tử thường dùng hỗn hợp:

- Albumin bò 30% 1 thể tích.
- Huyết thanh người (AB) 1 thể tích.

Gần đây nhiều tác giả, nhiều balô có xu hướng ít dùng albumin bò mà dùng thuần túy huyết thanh AB, vì albumin bò dễ nhiễm khuẩn, dễ tạo ngưng kết giả, không bảo quản ở âm 20°C được, chỉ để ở 4°C nên không giữ được lâu.

* Làm phản ứng trên tấm đã hâm nóng trước 40°C (tấm opalin hoặc tấm kính mờ đã đặt 30 phút trước vào tủ ấm 40°C) hoặc dùng thiết bị riêng bằng tấm kính mờ được hơi nóng liên tục trong khi làm phản ứng có bóng đèn phía dưới để đạt nhiệt độ từ 37°C đến 40°C. Đặt trên tấm:

- 2 giọt huyết thanh hoặc kháng huyết thanh.
- 1 giọt huyền dịch hồng cầu 20-25%.

Khuấy đều, đọc kết quả bằng mắt thường hoặc qua kính lúp. Phản ứng phải nhận định trong vòng 2 phút.

* Làm phản ứng trong typ:

Cho vào typ:

- 1 giọt huyết thanh hoặc kháng huyết thanh
- 1 giọt huyền dịch hồng cầu 5%.
- Lắc đều, để vào 37°C x 2 giờ.
- Hút nhẹ toàn bộ khối lắng hồng cầu dưới đáy ống, dần lam, đọc kết quả qua kính hiển vi.

b. Hiệu giá

Cũng tiến hành như thường, chỉ khác là dùng môi trường cao phân tử làm dung môi pha loãng và pha huyền dịch hồng cầu.

c. Kỹ thuật đơn giản

Có thể đưa môi trường albumin vào phản ứng bằng cách đơn giản dùng để pha loãng huyết thanh hoặc kháng huyết thanh vì thông thường các huyết thanh và kháng huyết thanh, nhất là thuốc thử không dùng nguyên chất mà phải pha tới nồng độ thích hợp. Song song, pha huyền dịch hồng cầu cũng bằng môi trường albumin. Cụ thể cho vào 1 typ:

- 1 giọt huyết thanh cần thử hoặc kháng huyết thanh.
- 1 giọt hồng cầu đã rửa sạch và pha huyền dịch 5% trong môi trường albumin.

Lắc đều, đặt 2 giờ ở 37°C, hút nhẹ lấy hết khối lắng ở đáy ống, dần lam, đọc qua kính hiển vi. Có thể hoàn toàn dùng huyết thanh người (huyết thanh AB) làm môi trường albumin, không albumin bò

2. Kỹ thuật men (Enzyme technique)

Có 4 loại men thông dụng, được gọi là các men tiêu protein (proteolytic enzyme): trypsin, papain, bromelin, ficin. Ficin ít dùng hơn cả, tuy rất nhạy, vì đòi hỏi sử dụng rất cẩn thận do tác dụng gây viêm bì và nhất là viêm giác mạc, viêm kết mạc mắt. Trong tài liệu này chỉ đề cập đến 3 loại men: trypsin, papain và bromelin.

• *Trypsin*

Men này có tác dụng thuỷ phân những liên kết peptid mang những nhóm carboxyl của lysin hoặc arginin, chiết xuất từ tụy động vật. Điều chủ yếu là phải dùng loại trypsin tinh thể, không làm huỷ hoại các kháng nguyên hồng cầu, còn loại trypsin thô sẽ huỷ hoại tất cả kháng nguyên nói trên. Tuy nhiên, trypsin tinh thể cũng phá huỷ vài loại kháng nguyên hồng cầu, chủ yếu là M và N (hệ MNSs) vì vậy với hệ này không dùng kỹ thuật men trypsin cũng không dùng kỹ thuật "thí", vì trong huyết thanh thường có sẵn các chất ức chế trypsin sẽ làm trypsin mất hết hoạt tính.

Trên thị trường, thường cung cấp trypsin DIFCO. Khi dùng pha thành dung dịch 1/1.000 trong nước muối 9/1.000, đệm ở pH 7,2.

• *Papain*

Nguồn gốc thảo mộc, rất khó đạt tinh khiết, từng hãng chế tạo đưa ra thị trường những chế phẩm khác nhau có thể phối hợp các chất kích hoạt như Na cyanide hoặc L cysteine cholorhydrate.

Trong huyết thanh người cũng có những chất ức chế papain nhưng các chất này thường yếu, không đủ sức làm mất hoạt tính của men nên với papain có thể áp dụng kỹ thuật 1 thí (Papain Low), pH có thể thay đổi tuỳ theo từng chế phẩm, tuỳ theo đã được hoạt hoá hay chưa, tuy nhiên thường là 5,5. Kỹ thuật đơn giản nên nhiều labo sử dụng.

- *Bromelin*

Chiết xuất từ dứa (*Ananas*, *Bromeliaceae*), không ở dạng tinh thể. Có thể áp dụng kỹ thuật 1 thí như trường hợp papain. Thường dùng dung dịch pha 0,5%, đệm ở pH 5,5, tiến hành giống như với trypsin.

- *Ficin*

Lấy từ nhựa cây nhiệt đới giống *Ficus*.

Ficin có hoạt tính mạnh và nhạy gấp nhiều lần so với papain, lại không gây những hiện tượng tự ngưng kết giả nhưng khó sử dụng vì độc tính như trên đã nói.

Ứng dụng

Kỹ thuật men là một trong số các kỹ thuật nhạy nhất để phát hiện các kháng thể hồng cầu, nhất là các kháng thể thuộc hệ Rh. Tuy nhiên với riêng từng loại kháng thể, hiệu quả khác nhau (xem bảng 3.1) thậm chí có trường hợp còn ức chế phản ứng như với các kháng thể thuộc hệ MNS.

Bảng 3.1. Kỹ thuật ngưng kết hồng cầu bằng men

Kháng nguyên	Trypsin	Papain	Bromelin	Ficin
Rh	+	+	•	•
P	•	+	•	•
Jk ^a	(+)	(+)	(+)	+
Jk ^b	+	+	+	+
S	-	-	-	-
S	+	-	+	-
Fy ^a	-	-	-	-
Kell (K ₁)	+	+	+	•
K (K ₂)	•	+	+	+

M và N	-	-	-	-
I	+	+	+	+
Le ^a	+	+	++	+
Le ^b	+	+	+	+
Lu ^a	+	+	+	+

Ghi chú:

Ký hiệu: (+) là nghi ngờ

Ký hiệu + có thể âm, có thể dương.

Bảng trên chỉ nêu một số thí dụ. Các chế phẩm men còn tùy theo nơi chế tạo, khi làm cần theo đúng chỉ dẫn, thí dụ với Anti-Fy^a, thông thường không dương tính khi dùng kỹ thuật men trừ ở balô của Van Loghem.

Đặc biệt, các kỹ thuật men rất nhạy khi dùng phát hiện các Anti-Rh, Anti-I trong thiếu máu huyết tán tự nhiên.

Để tăng độ nhạy, như trường hợp phát hiện các kháng thể hệ Kidd, thường phối hợp kỹ thuật Antiglobulin và kỹ thuật men (trypsin).

a. Kỹ thuật hồng cầu, papain

- Pha chế dung dịch papain.

+ Dung dịch 1:

Papain pha với nước muối 0,9% thành dung dịch 1%

Hoà tan đều rồi ly tâm, bỏ cặn, hút lấy dịch nổi, trong, dùng ngay hoặc cần giữ lâu thì để vào (-20°C), bảo quản được rất lâu.

+ Dung dịch 2: Dung dịch phosphat đệm:

3,6 gam Na₂HPO₄ pha với 100ml nước cất.

+ Dung dịch 3: Cytain chlorhydrat pha 2% trong nước muối 0,9%, hoà tan, dùng ngay hoặc để vào -20°C giữ được rất lâu.

- Hống cầu, rửa 3 lần với nước muối 0,9%, thu lấy khối lắng cặn sau lần rửa cuối.

Cho vào typ: - 2 thể tích khối lắng hống cầu, thí dụ 2ml

- 0,5 thể tích dung dịch 1 thí dụ 0,5 ml

- 1 thể tích dung dịch 3 thí dụ 1 ml

- 0,5 thể tích dung dịch 1 thí dụ 0,5 ml

Lắc đều rồi đặt vào cách thủy 37°C , 7 đến 8 phút (không để lâu hơn, kết quả sẽ sai lệch), lấy ra đem rửa kỹ 3 lần bằng nước muối 0,9%, thu lấy khối lắng hống cầu, từ khối lắng này pha huyền dịch tùy theo yêu cầu để làm phản ứng ngưng kết trên tấm hoặc trong typ như với hống cầu thường, xem kết quả trên tấm (dại thể) hoặc qua kính hiển vi (vi thể) tùy theo.

- Kỹ thuật papain chậm (Papain Low)

Chuẩn bị các dung dịch:

Dung dịch A: 9,08 KH_2PO_4 1.000ml nước cất.

Dung dịch B: 9,47 Na_2HPO_4 1.000ml nước cất.

Pha dung dịch đệm Sorensen.

Dung dịch A: 9,64 ml
Dung dịch B: 3,6 ml

pH 5,4

Lấy 2 gam papain pha trong 100 ml dung dịch sorenson hoà tan hết rồi lọc.

Cho thêm 0,878 gam cystein chlorohydarat để đạt 8,78% tức là 0,5M.

Cho dung dịch đệm sorenson vào vừa đủ 200 ml.

Ủ 1 giờ ở 37°C sau khi lắc đều.

Cần giữ lâu thì chia thành từng lượng nhỏ để ở âm 20°C .

Sử dụng:

Pha loãng huyết thanh hoặc kháng huyết thanh 0,50 bằng dung dịch men nói trên.

Pha huyền dịch hồng cầu 3% trong nước muối 0,9%.

Lấy 1 giọt huyết thanh 50% trong men + 1 giọt huyền dịch hồng cầu cho vào typ ù 1 giờ ở 37°C, lấy ra, hút khô lấy khối lắng, dàn lam đọc qua kính hiển vi.

b. Kỹ thuật hồng cầu trypsin

Pha chế dung dịch trypsin:

0,01 gam trypsin pha trong 10 ml nước muối 0,9%, lắc đều, để ở 4°C, 18 giờ cho tan hết.

Lấy ra, cho thêm.

2 ml dung dịch Na_2HPO_4 M/15 tức 9,4g/1000, 0,5 ml dung dịch KH_2PO_4 M/15 tức là 9,055g/1000 (2 dung dịch này hợp thành đệm sorensen pH 7,3).

Trộn đều, có thể giữ lâu dài ở âm 20°C.

Xử lý hồng cầu trypsin:

1 thể tích khối lắng hồng cầu rửa 3 lần bằng nước muối 0,9% hoà với 1½ thể tích dung dịch trypsin trong đệm sorensen.

- Ủ ở tủ ấm 37°C trong 20 phút, vừa ù vừa lắc.

- Ly tâm.

- Rửa 3 lần bằng nước muối 0,9%

- Lấy hồng cầu từ khối lắng pha huyền dịch trong nước muối 0,9% hoặc trong môi trường albumin tùy theo kỹ thuật. Từ huyền dịch này, có thể tiến hành thêm nghiệm pháp Antiglobulin nếu cần thiết. Kỹ thuật phối hợp này thường được

gọi tắt là kỹ thuật Coombs-trypsin (xem thêm mục 3, nghiệm pháp Antiglobulin).

Có thể dùng kỹ thuật hồng cầu xử lý trypsin trong định nhóm, nhưng chủ yếu thường dùng kỹ thuật này trong phát hiện và xác định kháng thể bất thường. Dù trường hợp nào, nội dung kỹ thuật cũng là cho tiếp xúc giữa hồng cầu đã xử lý trypsin với huyết thanh chứa kháng thể đã biết (huyết thanh nghiệm dùng định nhóm) hoặc huyết thanh nghi vấn chứa kháng thể bất thường (huyết thanh cần thử). Cụ thể là:

- Lấy 1 giọt huyền dịch hồng cầu trypsin pha 2 · 5% trong nước muối, cho vào 1 typ nhỏ (microtyp).

- Cho tiếp 1 - 2 giọt kháng huyết thanh hoặc huyết thanh cần thử, lắc đều.

- Đặt vào nhiệt độ 4°C, 22°C, 37°C, 30 phút đến 1 giờ tùy theo mục đích và phương tiện (thí dụ nếu mục đích nhằm vào kháng thể nóng thì dùng nhiệt độ 37°C, nhằm vào kháng thể lạnh thì dùng nhiệt độ 4°C, thiết bị nhiệt độ cách thủy có thể chỉ cần 30 phút, thiết bị tủ ẩm khô thì cần 1 giờ).

- Dù thời gian ủ, lấy ra, dùng pipett Pasteur hút nhẹ tay lấy hết hồng cầu ở đáy ống, dần lên lam kính đưa lên bàn kính hiển vi đọc kết quả ngưng kết.

c. Kỹ thuật hồng cầu bromelin

- Pha dung dịch bromelin (2,5/1.000)

- Lấy 0,025g bromelin.

- Lấy 10ml dung dịch sau:

8,8 ml	0,15 M KH_2PO_4	} \text{ pH 5,5}
1,2 ml	0,15 M Na_2HPO_4	

- Hoà tan 0,025 g bromelin trong 10 ml dung dịch trên ở 4°C trong 18 giờ.

- Lọc, muốn để lâu thì giữ ở âm 20°C.

* Xử lý hồng cầu bằng bromelin:

- Lấy 1 thể tích khối lắng hồng cầu sau khi đã rửa 3 lần vào 1 typ Kahn, cho vào tiếp 1½ thể tích dung dịch bromelin đã pha như trên.

Đặt vào 37°C 15 phút, lắc liên tục.

- Rửa 3 lần bằng nước muối.

- Ly tâm, lấy hết dịch nổi, lấy khối lắng hồng cầu để pha huyền dịch trong nước muối theo yêu cầu kỹ thuật.

* Kỹ thuật sử dụng hồng cầu bromelin:

- Lấy 1 đến 2 giọt huyền dịch hồng cầu bromelin 2% - 5% cho vào 1 typ.

- Cho thêm 1 đến 2 giọt huyết thanh nghiệm định nhóm hoặc huyết thanh cần thử, lắc đều đặt vào nhiệt độ 4°C, 22°C, 37°C từ 30 phút đến 1 giờ tùy yêu cầu.

- Lấy ra, dùng pipett Pasteur hút thật nhẹ toàn bộ hồng cầu lắng dưới đáy typ, dần lên tấm Opalin xem kết quả ngưng kết bằng mắt thường hoặc dần lên lam kính đọc kết quả ngưng kết dưới kính hiển vi.

d. Kỹ thuật hồng cầu ficin

* Pha dung dịch đệm pH 7,3 - 7,5 như sau:

- 0,51g NaH_2PO_4 trong 100ml nước cất, hoà tan cho hết.

- 0,445g Na_2HPO_4 trong 100ml nước cất, hoà cho tan hết.

- Hoà lẫn 20ml dung dịch NaH_2PO_4 với 80ml dung dịch Na_2HPO_4 để đạt 1 hỗn hợp có pH từ 7,3 đến 7,5.

* Pha dung dịch ficin 1%:

- Lấy 250mg bột ficin pha với 25 ml dung dịch hỗn hợp trên (còn gọi là Hendry's buffer) 1%.

- Hoà đều, không lọc, nếu giữ lâu thì đặt vào âm 20°C dùng dần.

* Xử lý hồng cầu:

- Rửa hồng cầu, pha huyền dịch 2% trong nước muối 0,9%. Lấy 9 thể tích huyền dịch này hoà với 1 thể tích dung dịch ficin nói trên.

- Lắc đều, ủ cách thuỷ 37°C 15 phút.

- Rửa, lấy khối lắng hồng cầu, pha lại huyền dịch 2% với nước muối để làm kỹ thuật phản ứng ngưng kết.

* Tiến hành kỹ thuật phản ứng ngưng kết:

- Cho vào tốp 1 giọt hồng cầu ficin (huyền dịch 2%) và 1 giọt huyết thanh nghiệm hoặc huyết thanh cần thử, lắc đều.

- Ủ ở 37°C từ 15 đến 60 phút tuỳ theo.

- Đọc kết quả qua kính hiển vi.

3. Nghiệm pháp Antiglobulin (Coombs test)

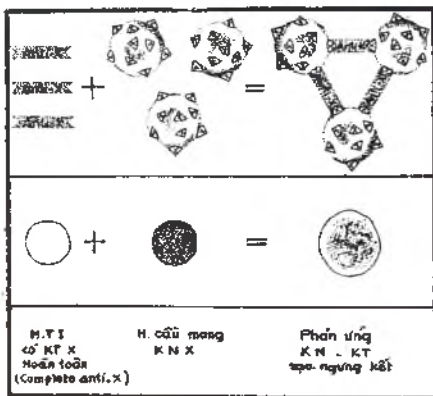
Nghiệm pháp này là một kỹ thuật phản ứng cổ điển nhất trong số các kỹ thuật ngưng kết nhân tạo, đồng thời là một kỹ thuật giá trị nhất. Nhờ kỹ thuật này, các tác giả đã phát hiện và xác định rất nhiều hệ kháng nguyên nhóm hồng cầu từ 1945 đến 1950. Cho đến nay, mặc dù nhiều tiến bộ kỹ thuật, bao gồm cả những kỹ thuật tự động, nhưng kỹ thuật Antiglobulin (Coombs) vẫn giữ giá trị của nó. Về cơ chế tác dụng của Antiglobulin cũng được giải thích ngày càng rõ và đầy đủ hơn.

a. Một số thuật ngữ

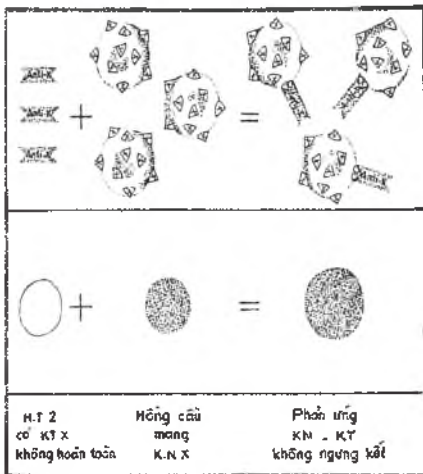
Từ trước tới nay, để giải thích về cơ chế tác dụng của những biện pháp kỹ thuật ngưng kết nhân tạo, trong đó chủ yếu là kỹ thuật Antiglobulin, người ta đã từng dùng nhiều danh từ hoặc thuật ngữ để chỉ các kháng thể và phản ứng kháng nguyên/kháng thể như: kháng thể toàn vẹn và không toàn vẹn (complet, incomplet); kháng thể đơn hoá trị và hai hoá trị (monovalent, bivalent); kháng thể ngưng kết và không ngưng kết (agglutinative, no-agglutinative hay agglutinant, non-agglutinant). Trong số các thuật ngữ trên, có thuật ngữ dùng từ ban đầu, đã trở thành quá cũ và không đủ nghĩa, không đúng thực chất như kháng thể toàn vẹn, kháng thể không toàn vẹn có tác giả còn gọi là kháng thể đủ, kháng thể thiếu. Danh từ một hoá trị, hai hoá trị tiến bộ hơn nhưng mang ý nghĩa máy móc đơn giản. Gọi là kháng thể ngưng kết hoặc không ngưng kết là đúng nhất nhưng vẫn không đủ và dễ gây lẫn lộn, vì rằng tất cả các kháng thể đang nói trong phản ứng ngưng kết đều thuộc loại kháng thể ngưng kết cả, không lẽ lại phân ra những kháng thể ngưng kết gây ngưng kết và những kháng thể ngưng kết không ngưng kết.

Để phù hợp với thực tế, người ta giải thích cơ chế tác dụng của kỹ thuật Antiglobulin dựa trên cấu trúc phân tử và chức năng từng đoạn (Fab, Fc) từng vị trí kháng thể và tính đặc hiệu kháng nguyên, cố định hay linh hoạt, phân tử đơn phân tử đa phân tử (monomer, polymer) của loại kháng thể. Từ đó khái quát chung rằng những kháng thể trước gọi là không toàn vẹn, là thiếu, là một hoá trị, là không ngưng kết, nay hiểu là kháng thể đó có quá ít vị trí kết hợp trên phần linh hoạt (V) của đoạn Fab. Vì vậy tính năng gắn với kháng nguyên rất yếu, chỉ đủ để gắn lên kháng nguyên hồng cầu mà tự mình không đủ kéo hai hoặc nhiều hồng cầu thành một cụm ngưng kết (xem hình 3.11). Các kháng thể như vậy gắn lên kháng nguyên hồng cầu ở vị trí kháng thể trên đoạn Fab. Phần Fc là đoạn mang tính kháng

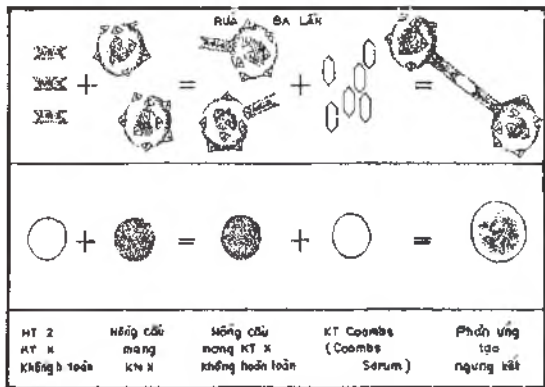
nguyên đặc hiệu của phân tử globulin miễn dịch (Ig) thì tự do, bao giờ cũng hướng phía ngoài. Antiglobulin là loại kháng thể mạnh, chế tạo từ thỏ hoặc ngựa, đã làm mất hết tính dị loại, có đặc tính kết hợp với những đoạn Fc của tất cả các loại globulin miễn dịch (Ig) ở những vị trí kháng nguyên đặc hiệu trên đoạn này, đóng vai trò trung gian để tạo nên hiện tượng ngưng kết hồng cầu (xem hình 3.12).



Hình 3.11. Phản ứng giữa kháng nguyên X và kháng thể X hoàn toàn



Hình 3.12. Phản ứng giữa kháng nguyên X và kháng thể X không hoàn toàn



Hình 3.13. Phản ứng Coombs gián tiếp

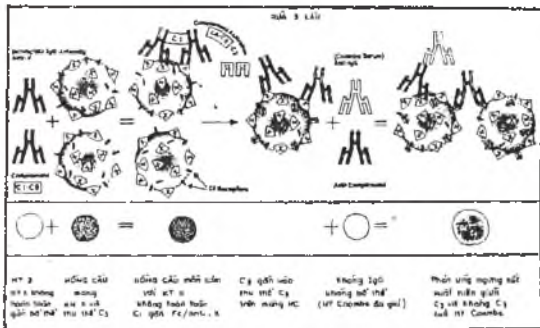
Tóm lại, với kỹ thuật Antiglobulin, diễn biến phản ứng cơ bản như sau: vẫn thường gọi là nghiệm pháp Coombs gián tiếp (hình 3.1.3).

Tiến hành kỹ thuật:

- Lấy 2 giọt (hoặc 1 giọt) hồng cầu đã rửa kỹ và pha huyền dịch 2 đến 5%, cho vào 1 typ Kahn
- Cho tiếp 2 (hoặc 1) giọt kháng huyết thanh hoặc huyết thanh cần thử.
- Lắc đều, đặt vào nhiệt độ 4°C, 22°C hoặc 37°C tùy yêu cầu chỉ định, thời gian 1 giờ.
- Lấy ra rửa 3 lần bằng nước muối 9/0,9%
- Hút kiệt dịch rửa, cho vào khối hồng cầu lắng còn lại 1 hoặc 2 giọt Antiglobulin. Cần chú ý pipett hút Antiglobulin phải là pipett riêng, chỉ dành dùng với Antiglobulin, không chung với hồng cầu và huyết thanh hoặc sinh phẩm khác, vì chỉ một vết globulin cũng đủ trung hoà hết hoạt tính của Antiglobulin.
- Đặt typ vào nhiệt độ 4°C, 22°C, 37°C tùy yêu cầu. Thông thường, tiến hành ở 37°C, nhưng đối với những kháng thể lạnh, vẫn có thể tiến hành ở 4°C. Thời gian 1 giờ, sau đó lấy ra rửa sạch bằng nước muối, hút thật nhẹ tay lấy giọt hồng cầu dưới đáy ống, dàn lam kính đọc kết quả ngưng kết dưới kính hiển vi.

Tại sao lại có thuật ngữ: nghiệm pháp Coombs gián tiếp?

- Thực ra đây chỉ là một quy ước: gián tiếp có nghĩa là trước thì Antiglobulin tham gia, phải có một thí ủ hồng cầu với huyết thanh để gây cảm thụ hồng cầu với kháng thể. Nếu trong máu, hồng cầu đã cảm thụ sẵn với kháng thể, kháng thể đã gắn sẵn trên hồng cầu, không cần phải tiến hành thí ủ hồng cầu với huyết thanh nữa, làm ngay thì cho Antiglobulin tham gia, như thế quen được gọi là *kỹ thuật Coombs trực tiếp*. Nói cách khác, kỹ thuật Antiglobulin chỉ có một nguyên lý chung. *Gián tiếp* hay *trực tiếp* chỉ là các quy ước để gọi cho tiện. Thường *kỹ thuật trực tiếp* chỉ hay dùng trong những trường hợp thiếu máu huyết tán tự miễn (tự kháng thể đã gắn trên hồng cầu người bệnh, ngay trong cơ thể người bệnh, ở nhiệt độ của thân nhiệt 37°C). Vì vậy về cơ bản vẫn là kỹ thuật *gián tiếp*. (hình 3.14).



Hình 3.14. Phản ứng kháng globulin gián tiếp chỉ xảy ra khi cho huyết thanh kháng globulin người có kháng C₃,

b. Tính phong phú của sử dụng kỹ thuật Antiglobulin

Việc ứng dụng kỹ thuật Antiglobulin rất phong phú, vì vậy giá trị của kỹ thuật này ngày càng tăng. Cụ thể là:

- Có thể kết hợp kỹ thuật Antiglobulin với kỹ thuật men trypsin làm tăng độ nhạy kỹ thuật lên nhiều lần để phát hiện các kháng thể yếu và rất yếu: Trước khi pha huyền dịch hồng cầu để làm nghiệm pháp Antiglobulin, người ta tiến hành xử lý hồng cầu bằng men trypsin như kỹ thuật sử dụng hồng cầu trypsin.

- Có thể dùng loại Antiglobulin đa giá (Broad spectrum Antiglobulin) để phát hiện bất cứ 1 kháng thể thuộc bản chất IgG, IgM, anti - C v. v Có thể dùng loại Antiglobulin đơn giá đặc hiệu Anti -IgG, Anti -IgM v.v.. để phát hiện những kháng thể thuộc IgG hoặc IgM...

- Có thể dùng kỹ thuật Antiglobulin huỳnh quang để chẩn đoán các tự kháng thể (phương pháp miễn dịch huỳnh quang).

- Có thể dùng kỹ thuật Antiglobulin trong xác định các nhóm huyết thanh (Gm, Inv, Isf). Các kỹ thuật này chỉ là những dạng phát triển của nghiệm pháp Coombs (Antiglobulin) kinh điển mà thôi.

- Có thể phát triển thành phương pháp kỹ thuật tiêu thụ Antiglobulin, dựa trên đặc tính lượng Antiglobulin bị tiêu thụ tỷ lệ thuận với lượng kháng thể gắn trên hồng cầu. Cụ thể là khi cho tiếp xúc những hồng cầu với 1 huyết thanh, rồi sau đó cho Antiglobulin vào mà lượng Antiglobulin bị tiêu thụ, có nghĩa là hồng cầu đó đã gắn với kháng thể đặc hiệu. Bằng kỹ thuật này, có thể định lượng bằng cách so sánh độ hiệu giá trước và sau hấp thụ, tùy mức độ tiêu thụ nhiều ít mà đánh giá hoạt tính và nồng độ kháng thể.

c. Những điều kiện kỹ thuật mà nghiệm pháp Antiglobulin đòi hỏi

Nghiệm pháp Antiglobulin rất có giá trị, nhưng đòi hỏi điều kiện kỹ thuật tinh tế như trên đã nói. Vì vậy sử dụng kỹ thuật này phải có hiểu biết thấu đáo, thành thạo tay nghề, kinh nghiệm xử lý khi có khó khăn. Có thể tóm lại những điều kiện chính sau đây:

- Pha loãng tối đa thuốc thử Antiglobulin, nhất là đối với loại Anti IgG. Điều này thường ghi rõ trong chỉ dẫn đối với từng loại Antiglobulin, do hãng chế tạo kèm theo thuốc thử, nhưng cũng nhiều khi người sử dụng tự dò tìm lấy khi tiến hành với từng loại kháng thể khác nhau. Thí dụ để phát hiện Anti -Jk so với phát hiện Anti -D, độ pha loãng tối ưu không giống nhau. Những KTV mới vào nghề thường có xu hướng dùng nồng độ thuốc thử đặc, sợ pha loãng, vì chưa có nhận thức đầy đủ về hiện tượng tiến vùng, về mối tương quan kháng nguyên/kháng thể.

- Bảo quản ở nhiệt độ âm 20°C

Nhiệt độ -20°C hoặc thấp hơn nữa (-30°C, -40°C, -80°C) là nhiệt độ tạo ra do các tủ băng dùng máy nén khí chạy điện, đủ bảo đảm giữ các kháng thể lâu dài. Nên chia nhỏ trước khi đặt vào nhiệt độ -20°C để mỗi lần dùng không hết thì vứt bỏ, không đông băng và khử băng nhiều lần liên tiếp. Thuốc thử một khi đã pha loãng để sử dụng, hoặc dùng dở không để vào nhiệt độ -20°C nữa.

- Các thuốc thử Antiglobulin rất dễ bị trung hoà bởi globulin, dù chỉ là vết. Vì vậy hồng cầu phải được rửa thật sạch để không còn một chút protein người. Sử dụng pipett để hút Antiglobulin cũng phải dùng riêng một chiếc thật sạch, thật khô, đảm bảo không dính protein, nếu không rất dễ tạo nên những kết quả âm tính giả.

- Các Antiglobulin đều có nguồn gốc dị loại do đó phải kiểm tra đảm bảo hấp thụ hết yếu tố dị loại (bằng các hồng cầu A,B đã xử lý men), nếu không có thể cho kết quả dương tính giả.

- Thường xuyên kiểm tra chất lượng của Antiglobulin. Khi làm xét nghiệm, tốt nhất là đồng thời với nhiều loại, nhiều lô khác nhau, ít nhất là 2.

- Luôn luôn có chứng âm, chứng dương, thí dụ hồng cầu Rh⁺, hồng cầu Rh⁻ (khi liên quan đến hệ Rh); hồng cầu Fy (a⁺) (khi liên quan đến hệ Duffy)v.v và các kháng thể tương ứng Anti-D (hệ Rh), Anti-Fy^a (hệ Duffy).

d. Vấn đề thuốc thử Antiglobulin

Về nguyên lý chế tạo xem chương sáu. Ở mục này chỉ đề cập đến sử dụng. Cần phân biệt 2 loại: đa giá và đơn giá đặc hiệu. Loại đa giá dùng để phát hiện vì nó phản ứng với mọi loại kháng thể loại IgG, IgM và kết hợp C. Loại đơn giá đặc hiệu có thể là Anti-IgG, Anti-IgM, Anti-C 3, C 4, rất có giá trị trong chẩn đoán thiếu máu huyết tán miễn dịch. Loại đơn giá đặc hiệu có thể nhạy cảm chuyên biệt với từng kháng thể, thí dụ Anti-Fy^a, Anti-Jk^a. Điều này rất quý. Các cơ sở chế tạo và cung cấp sẽ cho những chỉ dẫn với mỗi loại Antiglobulin như thế, giúp người sử dụng chỉ định chọn lựa cho những trường hợp cần thiết. Tính phong phú và giá trị của kỹ thuật Antiglobulin một phần lớn là nhờ chất lượng vừa rộng, vừa sâu, vừa đa dạng của các loại thuốc thử Antiglobulin.

Chương 4

CÁC KHÁNG THỂ BẤT THƯỜNG VÀ AN TOÀN TRUYỀN MÁU

I. ĐẠI CƯƠNG

Công việc truyền máu càng phát triển, số lượng và số lần truyền máu càng nhiều, số người nhận truyền máu không chỉ một vài lần mà nhiều lần ngày càng tăng lên, thì các kháng thể bất thường càng có vai trò quan trọng đối với an toàn truyền máu.

Kháng thể bất thường (Irregular Antibodies) viết tắt là lab, là những kháng thể không có mặt thường xuyên và đều đặn ở huyết thanh như các kháng thể tự nhiên Anti-A, Anti-B thuộc hệ ABO (như đã nói ở chương hai). Sự có mặt của các Anti-A, Anti-B mang hai tính: Tự nhiên và thường xuyên (natural and regular). Có một số ít kháng thể bất thường cũng mang tính tự nhiên nhưng thiếu tính thường xuyên, nghĩa là khi có mặt, khi không. Thí dụ kháng thể Anti-A₁ trong huyết thanh người nhóm A₂ (ò người da trắng, Âu Mỹ), hoặc kháng thể Anti-Le^a có mặt trong huyết thanh những người thuộc nhóm tiết ABH, hồng cầu kiểu hiện Le (a⁺ b⁺) nhưng không phải có trong tất cả những người như thế, mà chỉ là 20% số người Le(a⁺ b⁺), có nghĩa là không có mặt thường xuyên mà là bất thường (Jordal, 1956, điều tra trên 121 người da trắng Le(a⁺ b⁺)).

Đại đa số kháng thể bất thường không mang tính có mặt tự nhiên mà đều là kháng thể miễn dịch, nghĩa là phải qua một quá trình gây miễn dịch và sinh miễn dịch từ những kháng nguyên lạ xâm nhập cơ thể thiếu những kháng nguyên ấy. Thí dụ điển hình là Anti-A miễn dịch xuất hiện trong huyết thanh người nhóm O, sau 1 thời gian kháng nguyên A đưa vào cơ thể.

hoặc Anti-D miễn dịch xuất hiện trong huyết thanh người Rh⁺ (dd) sau một thời gian đưa kháng nguyên D(Rh⁺) vào cơ thể.

Đại đa số các kháng thể thuộc các hệ nhóm máu ngoài ABO đều là bất thường và miễn dịch. Vì vậy nếu truyền máu nhiều lần cho một người thì đến một lúc nào đó sẽ xuất hiện kháng thể bất thường ứng với các kháng nguyên thuộc các hệ nhóm máu khác ngoài hệ ABO do một quá trình gây miễn dịch ngẫu nhiên, vô tình đối với người đó.

Những kháng thể bất thường như thế nhất định sẽ gây trở ngại cho việc truyền máu tiếp, có khi xảy ra những tai biến không hoà hợp nghiêm trọng thuộc loại huyết lãn, ít nhất thì cũng gây sự cố truyền máu ít hiệu quả hoặc không hiệu quả, thậm chí còn xấu hơn không truyền. Để khắc phục hậu quả này, phải phát hiện và xác định được các kháng thể bất thường để từ đó lựa chọn những mẫu máu hoà hợp nhất về miễn dịch, kể cả với những hệ nhóm máu ngoài ABO. Ở những cơ sở hoặc Trung tâm truyền máu, những băng máu đủ trình độ và khả năng kỹ thuật, cần tiến hành công việc này qua các bước.

1. Làm các xét nghiệm hoà hợp (Compatibility tests).
2. Làm các xét nghiệm thử chéo (Cross-matching tests).
3. Làm các xét nghiệm tầm dò phát hiện (Screening test).
4. Phát hiện và xác định tính đặc hiệu của kháng thể bất thường (Detection and identification of IABs).
5. Phân lập và thu lấy kháng thể bất thường (Isolation and Accumulation of IABs).

Các bước (1), (2), (3) xem chương ba thực hành kỹ thuật. Bước (5) chủ yếu nhằm chế tạo các thuốc thử sinh học để định nhóm (Anti-serum).

Phần dưới đây chủ yếu đề cập đến bước (4) là bước kỹ thuật cơ bản nhất, gồm những nguyên tắc chủ yếu trong việc xây dựng và thiết lập các Panel hồng cầu sử dụng các Panel ấy cùng với những phương pháp kỹ thuật nêu ở chương ba để phát hiện và phân định rõ ràng tính đặc hiệu của kháng thể.

II. THIẾT LẬP PANEL HỒNG CẦU (RED CELL PANEL)

1. Định nghĩa

Panel nghĩa là bảng, là danh sách. Panel hồng cầu có nghĩa là bảng tập hợp các hồng cầu nghiệm dùng để phát hiện và xác định đặc điểm của các kháng thể bất thường. Trong phạm vi hệ ABO, cũng dùng đến những hồng cầu nghiệm (globule test) là hồng cầu A₁, A₂, B, O, nhưng số lượng ít nên không gọi là Panel. Ở Việt Nam, HC A₂ rất ít, chủ yếu là hồng cầu A, B và O. Ngoài hệ ABO còn tới 15 hệ nhóm hồng cầu nữa trong đó 8 hệ được coi là phổ cập (Rh, MNSs, Lewis, P, Kell, Duffy, Kidd, Lutheran). Mỗi hệ nhóm gồm ít nhất 2 mẫu hồng cầu mang 2 kháng nguyên allele. Thi dụ với hệ Duffy là hồng cầu Fy^a và hồng cầu Fy^b, với hệ Kidd là hồng cầu Jk^a và hồng cầu Jk^b. Có hệ gồm tới 6 kiểu hồng cầu mang những tính kháng nguyên khác nhau như hệ Rh (hồng cầu D⁺, hay Rh⁺, hồng cầu D hay Rh (dd), hồng cầu C, hồng cầu c, hồng cầu E, hồng cầu e. Với hệ Lewis có 3 kiểu hồng cầu là Le (a⁺ b⁻), Le(a⁻ b⁺), Le(a⁻ b⁻) v.v những mẫu hồng cầu đã xác định rõ các tính kháng nguyên thuộc đủ các hệ nhóm nói trên, thực chất là những hồng cầu nghiệm, tập hợp lại thành những Panel. Dịch qua tiếng Việt có tác giả dịch là bảng, là danh sách, là gam, là dàn hồng cầu, chưa thống nhất. Trong tài liệu này chúng tôi để nguyên vì khi phiên âm cũng dễ đọc, tương tự một số danh từ khác thuộc di truyền học. Tế bào học như "clon, soma, gen" v.v

2. Nguyên tắc thiết lập các Panel hồng cầu

a. Xác định kháng nguyên

Thực chất, đây là việc định nhóm thuộc hệ kháng nguyên hồng cầu. Bằng những kháng huyết thanh đủ tiêu chuẩn (như các huyết thanh nghiệm Anti-A, Anti-B thuộc hệ ABO), tiến hành định nhóm hồng cầu thuộc các hệ ngoài ABO (cụ thể là các hồng cầu O). Càng có đầy đủ kháng huyết thanh các loại bao nhiêu, càng định nhóm được phong phú bấy nhiêu. Càng có số lượng kháng huyết thanh lớn bao nhiêu, càng tiến hành được trên nhiều mẫu hồng cầu và từ đó khi chọn lựa các mẫu hồng cầu, thiết lập Panel, càng thuận lợi bấy nhiêu.

b. Thành lập Panel

Một Panel càng có nhiều mẫu hồng cầu khác nhau càng có giá trị cao. Tuy nhiên không thể quá nhiều vì khả năng không cho phép. Vì sự phức tạp và công kênh khi tiến hành kỹ thuật, người ta thấy rằng một Panel 5 mẫu hồng cầu là tối thiểu, đủ cho đa số trường hợp. Một Panel tốt, sử dụng ở các trung tâm lớn là Panel 10 mẫu hồng cầu; chỉ những trường hợp khó khăn, phức tạp mới sử dụng đến một Panel 20 mẫu hồng cầu. Dưới đây là thí dụ 1 Panel 5 mẫu hồng cầu, 1 Panel 10 mẫu hồng cầu. Lựa chọn và sắp xếp sao cho với Panel ấy có hiệu xuất xác định kháng thể bất thường là cao nhất (xem bảng 4.1).

c. Phân loại các Panel

Như trên đã nói, người ta không thể tập hợp quá nhiều mẫu hồng cầu thuộc quá nhiều hệ kháng nguyên trong 1 Panel, vừa công kênh, phức tạp, khó làm kỹ thuật, khó thực hiện, vừa tốn kém, mà phân ra nhiều loại Panel như Panel hệ li, Panel hệ Rh, Panel hệ MNSSs v.v để sử dụng theo những hướng riêng. Khi cần thiết thì kết hợp tiến hành kỹ thuật với nhiều loại Panel như thế, khi không cần thiết thì làm riêng với từng loại Panel, gọn nhẹ hơn. Thí dụ khi hướng nghi vấn chủ yếu là các kháng thể

bất thường hệ Rh thì chỉ dùng Panel Rh, khi hướng nghi vấn là các kháng thể huyết tán tự miễn thì dùng Panel hệ li và Panel hệ Rh. Chỉ khi nào chưa có hướng cụ thể mới dùng Panel tổng hợp (xem bảng 4.2).

3. Nguyên lý tiến hành kỹ thuật phát hiện và xác định kháng thể bất thường

- Sử dụng 1 hoặc nhiều Panel hồng cầu thích hợp.
- Sử dụng các kỹ thuật ngưng kết xem ở chương 3, mục III, phần C, cụ thể là các kỹ thuật trong môi trường albumin, các kỹ thuật men, kỹ thuật Antiglobulin v.v cho tiếp xúc huyết thanh cần thử với những hồng cầu trong Panel theo đúng yêu cầu kỹ thuật, rồi đọc kết quả bằng kính hiển vi.
- Phân tích các kết quả, nếu thoả đáng thì kết luận, nếu thấy chưa thoả đáng thì làm tiếp với 1 Panel hồng cầu khác, hoặc bổ sung các kỹ thuật tách và gắn (mục I và II chương ba).

Theo P.L. Mollison và C.Sammlon, thông thường khi cần xác định một kháng thể bất thường, trong một trung tâm truyền máu người ta dùng 1 panel hồng cầu tổng hợp, gồm 10 mẫu hồng cầu nghiệm với 8 hệ kháng nguyên hồng cầu ngoài hệ ABO, sử dụng đồng loạt 7 kỹ thuật ngưng kết.

- Trong môi trường muối 9/0.9%
- Trong môi trường albumin.
- Kỹ thuật Antiglobulin, môi trường muối.
- Kỹ thuật với hồng cầu xử lý men trypsin.
- Kỹ thuật với hồng cầu xử lý men bromelin.
- Kỹ thuật men trypsin trong môi trường Antiglobulin.
- Kết hợp kỹ thuật men trypsin và kỹ thuật Antiglobulin.

Tiến hành đầy đủ như trên, các tác giả thấy rằng khó bỏ sót 1 loại kháng thể bất thường nào hay xảy ra.

Bảng 4.1. Một Panel hồng cầu

Số hầu		Phân bố "rh" và "hr" của																				Nghiệm pháp với						
		Mức <u>mức sinh</u> 16																Mức										
		D	C	K	e	e	M	N	S	a	P ₁	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	Lu ^a	Lu ^b	40°C	22°C	37°C	AGT	37°C	AGT	
1		-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	++	-	+
2		+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	++	++	+	+	-	-	-
3		-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4		-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	++	+	++	-	-	-	-
5		+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	++	+	++	-	-	-	-
6		+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	++	-	+	
7		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	++	+	-	+	
8		-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	++	+	++	+	-	+	
9		+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	++	++	+	++	-	-	-	
10		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+	++	-	+	+	
Panel																												
Auto+		-	+	+	+	+	-	+						-								-	-	-	-	-	-	

AGT = nghiệm pháp (Agglutination test)

Bảng 4.2. Panel hổng cấu

1.	O	MNS ₀	P ₁	Coddw	$K-k+Kp(a-b+)$	$La(a-b+)$	$Fy(a-b+)$	$Jk(a+)$	$Lu(a-)$
2.	O	MNas	P ₂	ccddEe	$K-k+Kp(a-b+)$	$La(a-b+)$	$Fy(a+b+)$	$Jk(a-)$	$Lu(a-)$
3.	O	NS ₀	P ₁	CC ⁿ Dee	$K-k+Kp(a-b+)$	$La(a-l-)$	$Fy(a+)$	$Jk(a+)$	$Lu(a-)$
4.	O	Mns	P ₁	ccddw	$K+k+Kp(a-b+)$	$La(a-b+)$	$Fy(a+b+)$	$Jk(a+)$	$Lu(a-)$
5.	O	MNS ₀	P ₂	ccdde	$K-k+Kp(a-b+)$	$La(a+b-)$	$Fy(a+)$	$Jk(a+)$	$Lu(a-)$
6.	O	Mns	P ₁	CcDEe	$K-k+Kp(a+b+)$	$La(a-b+)$	$Fy(a-)$	$Jk(a+b+)$	$Lu(a+b+)$
7.	O	MSS	P ₁	ccDee	$K-k+Kp(a-b+)$	$La(a+b-)$	$Fy(a+)$	$Jk(a+b+)$	$Lu(a-)$
8.	O	NS ₀	P ₁	coddw	$K-k+Kp(a-b+)$	$La(a-l-)$	$Fy(a-)$	$Jk(a+)$	$Lu(a-)$
9.	O	MNas	P ₂	ccDEE	$K-k+Kp(a-b+)$	$La(a-b+)$	$Fy(a+b-)$	$Jk(a+)$	$Lu(a-)$
10.	O	MNS ₀	P ₂	CCDee	$K+k+Kp(a-b+)$	$La(a-b+)$	$Fy(a-)$	$Jk(a-)$	$Lu(a-)$

4. Chế tạo hồng cầu nghiệm cho các Panel, cách bảo quản

Việc chế tạo các hồng cầu nghiệm này thường làm ở những trung tâm truyền máu lớn của Quốc gia hoặc của khu vực (Pháp, Hà Lan, Nhật). Ở nhiều nước còn có các hãng chuyên chế tạo và sản xuất sinh phẩm, đảm nhận luôn việc chế tạo và thiết lập sẵn các Panel này, bán định kỳ cho các labô của những cơ sở truyền máu và băng máu, thí dụ như hãng Ortho Diagnostic System.

Với các hãng sản xuất và cung cấp theo tính chất thương mại, thường các hồng cầu được bảo quản trong glycerol, trong nito lỏng, khi dùng có kỹ thuật hồi phục. Các cách bảo quản này giữ được các kháng nguyên đặc hiệu của hồng cầu rất lâu bền và vận chuyển đi xa dễ dàng trong một quốc gia và giữa các quốc gia.

Với các trung tâm truyền máu lớn của quốc gia hay khu vực, thí dụ CNTS (Centre national de Transfusion sanguine) ở Pháp, CDTs quận Seine Paris (Centre departemental de Transfusion sanguine Seine, Paris) hoặc Viện Đại học Nijmegen (Hà Lan) thường chế tạo và bảo quản các hồng cầu nghiệm cho Panel đơn giản, tự nhiên, không khác gì các hồng cầu nghiệm hệ thuộc ABO. Với đội ngũ và mạng lưới người cho máu đông đảo, rộng khắp, rất dễ dàng quản lý và huy động những kiểu hiện hồng cầu phenotyp theo ý muốn, theo yêu cầu. Từ nguồn này, các trung tâm liên tục, thường xuyên và đều đặn thu lấy những mẫu hồng cầu nghiệm cần thiết, xây dựng những Panel, cung cấp cho các cơ sở sinh học và labô kỹ thuật theo yêu cầu định kỳ, đồng thời chế tạo các huyết thanh nghiệm từ những nguồn kháng thể bất thường đã phát hiện và xác định được. Như vậy, các hồng cầu nghiệm bảo quản ở 4°C, cứ 20 ngày thay 1 lần, mỗi cơ sở labô kỹ thuật luôn có trong tủ lạnh 10 mẫu hồng cầu thuộc 1 Panel, sau 20 ngày đổi 10 mẫu mới.

Chương 5

NHỮNG TAI BIẾN VÀ SỰ CỐ TRONG TRUYỀN MÁU

Có thể xem xét những tai biến và sự cố trong truyền máu dưới nhiều góc độ. Để tiện cho việc chỉ định xử trí, nên phân các phản ứng biến cố này làm hai loại: những phản ứng huyết tán và những phản ứng không huyết tán.

I. NHỮNG PHẢN ỨNG KHÔNG HUYẾT TÁN

Trong phạm vi các phản ứng loại này, người ta xếp chung tất cả các phản ứng của cơ thể người nhận máu truyền trong suốt quá trình truyền máu, ngoài những phản ứng thuộc không hoà hợp miễn dịch hệ nhóm hồng cầu. Những tai biến do không hoà hợp nhóm hồng cầu, tất nhiên được coi là nghiêm trọng nhất, có thể dẫn tới tử vong, nếu không thì cũng đòi hỏi xử trí các hậu quả và tổn thương quá công phu, phức tạp, và khó khăn, sẽ nói ở mục (II) dưới đây. Những tai biến không huyết tán thường nhẹ hơn, dễ xử trí nhưng đôi khi cũng có thể gây hậu quả nghiêm trọng, thậm chí chết người. Một số trường hợp khác gây hậu quả lây bệnh lâu dài, không kém phần nặng nề và nguy hiểm cho người bệnh. Những nhận thức lệch lạc dẫn tới những thái độ và biện pháp phòng chống, xử trí sai lầm, tác hại cho bệnh nhân.

Những biến cố loại này gồm: Phản ứng sốt, rét run, nhiễm khuẩn, dị ứng, gây miễn dịch cho cơ thể nhận máu, lây truyền bệnh do máu truyền đưa mầm bệnh vào.

1. Phản ứng sốt

Phản ứng sốt có nguyên nhân do chí nhiệt tố (Pyrogen) còn gọi là các chất gây sốt, có nguyên nhân do các kháng thể thuộc dòng bạch cầu.

a. Do chỉ nhiệt tố

Thường xảy ra sau khi dùng những dụng dịch, hoá chất, dụng cụ, thiết bị chứa máu, truyền máu chưa bảo đảm khử hết chỉ nhiệt tố, nhất là những nơi tự pha chế lấy các dụng dịch chống đông (ACD, CPD...), các dụng dịch NaCl dùng rửa máu hoặc pha máu truyền, tự tiệt trùng các chai và dây truyền, mà không có điều kiện đủ tin cậy khử hết Pyrogens.

Chỉ nhiệt tố (Pyrogens) của vi khuẩn, rất dễ nhiễm vào các hoá chất, thuốc, dụng dịch, bình chứa phải đủ nhiệt độ cao, đủ thời gian, dùng quy cách tiệt khuẩn mới khử được hết. Nếu chất gây sốt truyền vào cơ thể sẽ gây những phản ứng sốt, rét run, tăng huyết áp, buồn nôn, nhức đầu, đau lưng, thường phải ngưng truyền máu. Pyrogens là sản phẩm của vi khuẩn nên khi đã có phản ứng nghi vấn, không nên cố truyền máu. Cách để phòng duy nhất loại tai biến này là sử dụng các nguyên vật liệu đảm bảo không có chỉ nhiệt tố trong suốt mọi khâu từ dầu đến cuối, nghĩa là từ pha chế, chứa máu, xử lý máu và truyền vào cơ thể. Khi đã xảy ra, cần chẩn đoán nhanh để ngưng truyền. Hầu hết trường hợp, ngưng truyền kịp thời, tình hình sẽ được cải thiện, mọi biến cố sẽ qua khỏi không cần xử trí gì khác.

b. Do các kháng thể dòng bạch cầu

Vai trò của các kháng thể kháng bạch cầu chỉ xảy ra và rất dễ hiểu ở những người đã nhận truyền máu nhiều lần. Dấu hiệu thường là rét run, sốt, ho khan, mạch nhanh, khó thở. Triệu chứng có thể nhẹ hoặc rất nhẹ như ớn lạnh, hơi tăng nhiệt độ ($37^{\circ}\text{C} - 38^{\circ}\text{C}$), mạch hơi nhanh, khiến người nhận máu có thể chịu đựng suốt thời gian truyền, nhưng cũng có khi phản ứng mãnh liệt đến mức không chịu nổi. Những trường hợp như vậy cần nhanh chóng chẩn đoán phân biệt với phản ứng do chỉ nhiệt tố nói ở mục (a) đồng thời ngưng truyền máu.

Cách dễ phòng tốt nhất đối với người đã nhận máu truyền nhiều lần là nên chỉ định dùng khối hồng cầu rửa hoặc khối hồng cầu nghèo bạch cầu (leucocyte-poor blood).

Nhiều người dùng "Cocktail lytique" cho người nhận máu trước mỗi lần truyền, với mục đích làm giảm nhẹ các phản ứng loại này để cơ thể nhận máu một cách tương đối dễ chịu, nhưng nhất thiết không được coi chỉ định này như một việc làm thường quy, vô hại mà chỉ được sử dụng cá biệt sau khi đã nắm thật vững, cân nhắc thật kỹ lợi hại vì "Cocktail lytique" làm mờ đi những phản ứng nghiêm trọng khiến người theo dõi không phát hiện được, nhất là những phản ứng do không hoà hợp nhóm máu hoặc phản ứng máu nhiễm khuẩn. Một bằng lâm sàng yên ổn giả tạo có thể gây nguy hiểm cho tính mạng người bệnh.

2. Phản ứng dị ứng (Allergic Reactions)

Phản ứng kiểu này rất hay gặp trong truyền máu. Thường là thể vừa và nhẹ, nổi mẩn sau hoặc ngay trong khi truyền máu, do đó còn có tên là phản ứng nổi mẩn, có thể nổi khắp người, nổi trên một diện tích lớn của cơ thể, hoặc chỉ rải rác. Do đó còn có tên: "Uricarial reaction". Các tác giả phân hai loại nhẹ và nặng. Hạn hữu có những thể rất nặng như phù nề thanh quản, co thắt phế quản, phải xử trí cấp cứu.

Tuy nhiên đa số trường hợp là nhẹ và vừa, không nghiêm trọng lắm và sẽ qua khỏi không có di chứng.

Đối với những người có tiền sử dị ứng, buộc phải truyền máu thì cho truyền trước các kháng histamin, hoặc làm các biện pháp giải mẫn cảm khác như truyền huyết tương của người cho máu, truyền máu lượng ít một, cách quãng 7 đến 14 ngày. Khi đã xảy ra phản ứng sẽ dùng các Anti-histamin.

Với máu người cho thường ít khi có tác nhân thù phạm, mà hầu hết lý do là ở cơ thể người nhận máu đã có sẵn Anti-IgA tương ứng với IgA đã có trong máu truyền vào (do người cho máu

đang ở trạng thái dị ứng), rồi lần truyền tiếp sau, Anti-IgA ấy mới gây nên phản ứng, điều này nói lên rằng các Ngân hàng máu phải loại được những người cho máu đang ở trạng thái dị ứng.

Thường những tai biến loại này ít khi nghiêm trọng nhưng cũng rất phiền hà cho việc truyền máu khi cần thiết.

3. Phản ứng nhiễm khuẩn

Đây là loại phản ứng nghiêm trọng thể hiện bằng sốt, đau lưng, đau xương, hạ huyết áp, sốc, có thể tử vong. Nhiễm khuẩn chỉ xảy ra trong những trường hợp:

- Giữ máu không tốt, không đủ nhiệt độ thấp, nơi giữ bị ô nhiễm, thời hạn giữ máu đã quá quy định.

- Túi hoặc chai chứa máu bị hở.

- Khi lấy túi từ người cho, không đảm bảo vô khuẩn, từ da người cho máu đến dụng cụ, môi trường hoặc ngay trong máu người cho lúc đó đã có mầm bệnh vì khi khám nghiệm đã không phát hiện.

- Quá trình chế tạo các thành phần máu như khối hồng cầu, hồng cầu rửa, huyết tương, khối tiểu cầu, bạch cầu, yếu tố VIII, PPSB v.v quá trình pha chế dung dịch chống đông, xử lý chai, nút, dây truyền v.v không đảm bảo vô khuẩn, tiệt khuẩn.

Tất cả những nguyên nhân trên đều không phải là khách quan mà đều do sai sót về kỹ thuật, về chế độ làm việc trong cơ sở thu phát máu, trên đường vận chuyển máu, nơi giữ máu trước khi truyền. Có cả trách nhiệm của người chỉ định truyền và tiến hành truyền chai máu đó, theo dõi truyền máu vì nếu nghi ngờ chai máu bị nhiễm khuẩn được phát hiện sớm thì phải loại bỏ, trả lại cơ sở phát máu, không để xảy ra tai biến.

Tới nay, ở nhiều nước, nhiều cơ sở truyền máu hiện đại đã sử dụng đồng bộ những thiết bị chế tạo sẵn, từ túi chứa, dây

truyền, chất chống đông, kim chích, cả những bộ 1 túi, 2 túi, 3 túi để tách huyết tương, tách tiểu cầu với độ tin cậy gần như tuyệt đối, không để một khe hở nào gây ô nhiễm máu và các chế phẩm, chỉ còn lại khâu kỹ thuật lấy máu, vận chuyển và bảo quản của những cơ sở băng máu mà thôi.

Ở những nơi còn dùng chai, tự pha chế, tự tiệt khuẩn thì mọi khâu kỹ thuật đều phải được đảm bảo, thường là kiểm nghiệm thật chặt chẽ không để những tai biến do nhiễm khuẩn nói trên. Nếu chẳng may xảy ra, ngoài việc gửi chai máu đi khám nghiệm theo những quy chế Pháp y, việc xử trí theo những nguyên tắc chung với mọi trường hợp nhiễm khuẩn huyết thuộc quyền người thầy thuốc lâm sàng, không nói trong tài liệu này.

4. Tai biến lây bệnh

Ba loại bệnh rất dễ lây từ chai máu của người cho sang người nhận: Giang mai, sốt rét, viêm gan B. Nay, còn một bệnh thứ 4 cực kỳ nguy hiểm đó là bệnh SIDA.

Đây là những tai biến loại muộn, nghĩa là không xảy ra ngay sau khi truyền, mà xảy ra sau ít hoặc nhiều ngày. Tuy vậy xét về hậu quả lâu dài, không kém phần nghiêm trọng, không nên để xảy ra rồi điều trị (có những bệnh không điều trị nổi hoặc rất khó khăn) mà phải phòng trước lây truyền bằng các biện pháp đảm bảo an toàn máu truyền không có những mầm bệnh nói trên. cụ thể là phải loại trừ được máu có ký sinh trùng sốt rét, máu có phản ứng huyết thanh giang mai dương tính, máu có kháng nguyên HbsAg v.v Những kỹ thuật sinh học để chẩn đoán như điện di khuếch tán miễn dịch, huỳnh quang miễn dịch, ELISA, RIA, xét nghiệm hiện đại với kỹ sinh trùng sốt rét, với giang mai, với SIDA cần được phổ cập.

5. Tai biến gây miễn dịch (alloimmunisation) cho người nhận máu

Loại tai biến này chỉ xảy ra ở những người nhận truyền máu nhiều lần. Sau nhận máu nhiều lần như vậy mà thấy hiệu quả truyền máu ngày càng kém so với những lần trước mặc dù đảm bảo hoà hợp nhóm hệ ABO rất tốt, thấy hiện tượng hồng cầu truyền vào bị rút ngắn đời sống, thì nhiều khả năng đã có quá trình gây và đáp ứng miễn dịch của cơ thể người nhận máu, tạo ra các kháng thể đồng chủng (allo-antibodies), ứng với những kháng nguyên hồng cầu ngoài hệ ABO. Đến một lúc nào đó, phải chọn chai máu truyền phù hợp cả về kháng nguyên thuộc các hệ nhóm ngoài ABO, sao cho hồng cầu truyền vào không mang những kháng nguyên tương ứng với những kháng thể miễn dịch đồng chủng (allo antibodies) phát hiện được trong huyết thanh của người nhận (xem chương 3 về phát hiện và xác định các kháng thể bất thường).

II. NHỮNG PHẢN ỨNG HUYẾT TÁN

Phản ứng huyết tán trong truyền máu có thể do hai loại nguyên nhân: nguyên nhân miễn dịch và nguyên nhân ngoài miễn dịch. Phản nguyên nhân miễn dịch bao gồm mọi trường hợp không hoà hợp miễn dịch giữa kháng nguyên và kháng thể thuộc hệ nhóm hồng cầu.

A. NGUYÊN NHÂN MIỄN DỊCH

1. Cơ chế sinh bệnh

Khi truyền máu, phải đảm bảo sự hoà hợp về miễn dịch đối với các kháng nguyên và kháng thể thuộc hệ nhóm hồng cầu. Nếu xảy ra không hoà hợp sẽ gây phản ứng kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể tương ứng trong tuần hoàn người nhận máu truyền dẫn tới tiêu huỷ hồng cầu (hemolysis) vẫn quen gọi là huyết tán.

Phản ứng có thể xảy ra giữa kháng thể có mặt trong huyết thanh người nhận với kháng nguyên hồng cầu truyền vào như trường hợp truyền lầm nhóm thuộc hệ ABO (truyền A cho B hoặc O, truyền B cho A hoặc O, truyền AB cho A, B hoặc O) hoặc trường hợp đối với hệ Rh (truyền hồng cầu Rh⁺, tức hồng cầu mang kháng nguyên D, cho người Rh⁻ đã có sẵn kháng thể Anti-D từ trước trong huyết thanh).

Phản ứng có thể xảy ra giữa kháng thể có trong huyết thanh của máu truyền vào, với kháng nguyên hồng cầu người nhận, như trường hợp truyền loại máu O nguy hiểm cho người nhóm A, kháng thể miễn dịch bất thường Anti-A có trong huyết thanh của máu O, phản ứng với hồng cầu A của người nhận, gây nên tai biến.

Tai biến có thể xảy ra ngay lập tức trong lòng mạch (intravascular hemolysis) nếu phản ứng kháng nguyên - kháng thể có kết hợp bổ thể. Thí dụ các tai biến thuộc hệ ABO mà các kháng thể là IgM + C' hoặc đó là IgG như trường hợp Anti-A miễn dịch thì cũng là IgG + C'.

Tai biến có thể xảy ra ngoài lòng mạch (extravascular hemolysis) nếu phản ứng không có bổ thể tham gia. Các kháng thể chỉ gắn vào hồng cầu hoặc gây ngưng kết hồng cầu rồi những cụm ngưng kết đó bị huỷ ở lách do thực bào, thí dụ trường hợp kháng thể Anti-D với hồng cầu D⁺ (Rh⁺).

2. Triệu chứng và mức độ

Nếu tai biến nhẹ như những trường hợp phản ứng kháng nguyên - kháng thể ngoài hệ ABO, các triệu chứng có thể xuất hiện muộn, từ từ hoặc rất kín đáo

Nếu tai biến nặng như trường hợp những phản ứng thuộc hệ ABO, các triệu chứng xuất hiện ngay sau những ml máu đầu tiên truyền vào, ở những phút đầu tiên: cảm giác nóng rát dọc

theo tĩnh mạch truyền máu vào, mặt đỏ bừng, sốt, nhức đầu, đau thắt vùng ngực, cảm giác tức ngực, sốc. Cuối cùng là thiếu niệu, vô niệu, suy thận, càng làm sốc nặng hơn. Thường có xu hướng chảy máu vì hồng cầu bị huỷ nhiều, sẽ giải phóng thromboplastin gây nên trạng thái đông máu rải rác trong lòng mạch (DIC), giảm fibrinogen trong máu. Dấu hiệu chảy máu rất đáng lưu ý ở người bệnh đang gây mê hoặc bị sốc, bị hôn mê, vì trong những trạng thái ấy, người bệnh không hoặc rất ít thể hiện những dấu hiệu lâm sàng như kể trên, chỉ có dấu hiệu chảy máu là báo động có tai biến huyết tán nặng. Nếu không sáng suốt, có thể lầm lẫn chẩn đoán giữa sốc, hôn mê, chảy máu vì nguyên nhân khác với tai biến huyết tán gây chảy máu, khiến cho xử trí chậm, xử trí sai, hậu quả rất nặng nề, người bệnh có thể chết sau vài giờ, vài ngày vì suy thận cấp không phục hồi được. Dù có thoát khỏi tử vong, cũng phải xử trí suy thận, tổn thương thận hàng tuần, 10 ngày hoặc hơn nữa.

B NGUYÊN NHÂN NGOÀI MIỄN DỊCH

Bao gồm nhiều yếu tố không liên quan đến hoà hợp miễn dịch như:

1. Điều kiện giữ máu không đảm bảo

Khi không đảm bảo nhiệt độ 4°C (vượt quá 10°C), hồng cầu sẽ nhanh chóng bị huỷ (trước hạn định) ngay trong chai máu, nếu truyền vào tuần hoàn người nhận, các sản phẩm huyết tán này gây tai biến ngay lập tức. Điều này thường xảy ra khi tủ lạnh giữ máu bị hỏng, hoặc bị mất điện bất thường không biết, hoặc khi vận chuyển trên đường không đủ nước đá giữ nhiệt độ xung quanh 4°C trong các hộp hay túi. Theo Mollison, nếu vì lẽ gì máu bị hâm nóng tới 50°C mà đem truyền vào, sẽ gây nên huyết tán lớn ngay trong lòng mạch. Tủ lạnh giữ máu không có quạt để điều hoà nhiệt trong tủ, để nơi giữ máu xuống dưới 2°C , máu sẽ bị đông, do đó sẽ huyết tán ngay trong chai hoặc túi

Một màu hồng quan sát thấy ở ranh giới giữa khối lắng hồng cầu và huyết tương bên trên là dấu hiệu báo huyết tán đã xảy ra do máu bị đông băng ở nhiệt độ dưới 2°C.

Máu còn bị huyết tán nếu dung dịch giữ máu không đủ nồng độ đường dextrose. Cũng theo Mollison thì trong dung dịch dextrose 5 đến 10%, để 1 đến 3 giờ hồng cầu bị tương lên, nếu đem hồng cầu này truyền cho người nhận, đời sống hồng cầu ấy sẽ bị giảm rõ rệt. Vậy các dung dịch chống đông giữ máu phải được pha chế đúng nồng độ và pH quy định. Như phần trên đã nói, ở các nước tiên tiến việc pha chế các loại dung dịch này (ACD, CBD v.v) cũng như các túi chứa, chai chứa, dây truyền đều được chế tạo và cung cấp từ những trung tâm, những hãng sản xuất có đầy đủ trình độ, khả năng mọi mặt, quyền hạn và trách nhiệm đồng bộ để không xảy ra những sai sót loại này.

2. Các lý do khác

Máu có thể bị huỷ khi bị một áp lực truyền quá cao, thí dụ khi truyền qua kim quá nhỏ với tốc độ nhanh.

Máu có thể bị huỷ vì người nhận máu truyền, bị những bệnh thiếu men, thí dụ thiếu G6-PD hoặc bị những trạng thái có myoglobin máu, niệu từ trước.

III. THÁI ĐỘ PHÒNG, CHỐNG VÀ XỬ TRÍ

Việc đề phòng, ngăn ngừa các tai biến và sự cố do truyền máu bao gồm toàn bộ Tổ chức và kỹ thuật an toàn truyền máu. Mục này chỉ nêu những điều cần thực hiện trong phạm vi lâm sàng cạnh giường bệnh.

1. Chẩn đoán

Người nhận máu truyền cần được theo dõi cẩn thận, ít nhất trong khi truyền 10ml đầu tiên ở 10 phút đầu tiên, truyền chậm, với tốc độ 20 giọt/phút (tức là xấp xỉ 1ml/phút), theo dõi

các phản ứng của người bệnh qua mạch, nhiệt độ, thái độ và tình trạng toàn thân. Nếu người bệnh đã có sốt nhẹ trước khi truyền máu thì có thể vẫn giữ như thế suốt quá trình truyền và sau truyền. Đáng quan sát, đáng lưu ý là những diễn biến khác thường đột ngột, thí dụ tứ trạng thái bình thường bỗng thấy ón lạnh, rét run, sốt, đỏ bừng mặt, đau thắt lưng, đau thắt ngực, hốt hoảng, vật vã, các dấu hiệu của sốc. Việc phát hiện sớm những dấu hiệu này ngay từ những ml, những phút đầu cần có trình độ và kinh nghiệm. Nếu có huyết tán, các dấu hiệu đó xuất hiện ngay từ những ml và những phút đầu tiên, nếu lấy máu xét nghiệm đúng thời điểm này đã thấy có huyết sắc tố tự do trong huyết thanh hoặc thấy nghiệm pháp Antiglobulin cho kết quả dương tính. Các xét nghiệm chi tiết khác như định lượng huyết sắc tố, bilirubin, haptoglobins, methemalbumin, tìm các kháng thể bất thường trong huyết thanh đều cần làm trình tự tùy theo yêu cầu chẩn đoán, nhưng không phải chờ kết quả các xét nghiệm ấy mới chẩn đoán mà phải dựa vào những thể hiện rất sớm trên lâm sàng để quyết định kịp thời. Việc truy tìm nguyên nhân, thủ phạm lâm sau

2. Xử trí

Về nguyên tắc, một khi nghi có huyết tán phải ngưng ngay truyền máu, vì độ nặng của tai biến bao giờ cũng tỷ lệ thuận với lượng hồng cầu không hoà hợp miễn dịch truyền vào tuần hoàn người nhận. Không chờ kết quả xét nghiệm (việc này rất cần nhưng làm song song hoặc sau), thậm chí không chờ các triệu chứng lâm sàng rõ rệt, việc ngưng sớm truyền máu cốt nhằm ngăn chặn hoặc hạn chế tối đa tổn thương ống thận do các sản phẩm huyết tán.

Giảm lượng máu ở thận là điều rất nguy hiểm ở thời kỳ này vì vậy phải tạo được di tiểu nhiều, mannitol phải được dùng sớm. Có thể dùng dung dịch từ 5% đến 20% tùy theo nhưng trung bình là 10% dùng cho đến khi thử không thấy huyết sắc tố trong huyết thanh (khi huyết sắc tố khoảng 200mg/100ml thì mắt thường không thấy nữa).

Khi đã có tối thiểu niệu hoặc vô niệu, việc xử trí trở thành rất tế nhị, phức tạp, khó khăn, đòi hỏi rất khôn ngoan trong điều chỉnh nước và điện giải, nhiều khi phải nhờ đến kỹ thuật thẩm phân hoặc thận nhân tạo. Với những người bệnh này, chế độ dinh dưỡng cần nhiều calo, thấp protein, hạn chế nước, luôn theo dõi kiểm tra độ tăng kali máu. Nếu cần truyền máu, phải dùng máu mới (hạn dưới 1 tuần) để tránh nồng độ kali tăng quá cao. Ngoài kali, còn cần lưu ý mức tăng ure và toan hóa máu, những tư liệu này là cơ sở để tiên lượng, cân nhắc và xử lý.

Khi đã tiểu được thì theo dõi điện giải để phòng mất natri và kali, để bổ sung đúng và kịp thời. Tiểu được là hồi phục nhưng vẫn giữ chế độ hạn chế protein cho đến khi ure máu giảm xuống mức bình thường.

Có thể tóm lại theo trình tự xử trí như sau:

- Ngưng ngay truyền máu nếu nghi có huyết tán.
- Truyền tĩnh mạch 500 - 1.000ml mannitol 10%.
- Truyền tiếp theo, 500 - 1.000ml dung dịch NaCl 9/0,9% hoặc dung dịch ringer
- Nếu thấy người bệnh tiểu được thì tiếp một đợt thứ hai như trên (Mannitol 1.000ml dung dịch 10% rồi dung dịch NaCl 0,9% x 1.000ml), cho đến khi thấy hết huyết sắc tố trong huyết thanh.
- Nếu người bệnh chưa đi tiểu được, sau những xử trí như trên, nghi vẫn có thể có hoại tử ống thận, cần hạn chế nước vào.
- Không dùng các thuốc tăng huyết áp, co mạch ngoại biên.

Tai biến huyết tán là loại tai biến nặng hoặc rất nặng, cả đối với cấp cứu tình mạng trước mắt, cả đối với hậu quả lâu dài, tổn thương các ống thận. Vì vậy mọi quy tắc an toàn truyền máu phải được đặt lên hàng đầu trong toàn bộ công việc thuộc lĩnh vực truyền máu ở tuyến trước hay tuyến sau, dù ở đã ngoại hay trong các cơ sở y tế hậu phương.

Chương 6

CHẾ TẠO VÀ BỮ CÁC SINH VẬT PHẨM DÙNG TRONG TRUYỀN MÁU

Trong công việc truyền máu, một yếu tố quan trọng có ý nghĩa quyết định chất lượng và quy mô của công việc, là giữ được máu và các sinh vật phẩm dùng cho truyền máu trong một thời hạn càng dài càng tốt. Chương này, được để cập hai nội dung giữ và chế tạo.

I. GIỮ MÁU VÀ CÁC SINH VẬT PHẨM

1. Với các thành phần cấu trúc của tế bào

Khi giữ lâu, tính phản ứng của kháng nguyên giảm đi, hoạt tính của kháng thể trong huyết thanh cũng giảm. Mỗi kháng nguyên hoặc kháng thể giảm khác nhau, có yếu tố giảm rất nhanh có yếu tố tương đối bền vững, thí dụ kháng nguyên D, c (hệ Rh), kháng nguyên Jk^{*} (hệ Kidd), kháng nguyên P₁ (hệ P), kháng nguyên S (hệ MNSS), kháng nguyên Le^{*} (hệ Lewiss) giữ ở 4°C trong dung dịch ACD chỉ sau tuần thứ nhất đã giảm 12% hoạt tính, sau tuần thứ hai giảm 15%, trong khi đó, kháng nguyên thuộc hệ Kell và Duffy thì ít giảm hơn.

Các dung dịch chống đông ACD, CPD. Alsever đều có tác dụng bảo quản tương tự nhau, hơn kém không đáng kể.

Nếu giữ máu dưới dạng cục máu đông (Blood clot) thì hoạt tính kháng nguyên còn giảm nhanh hơn (sau 2 tuần giảm tới 40%).

Bạch cầu và tiểu cầu bị hư hại nhanh hơn hồng cầu. Trong dung dịch ACD hoặc CPD hoặc CPD ở 4°C sau 24 giờ tiểu cầu đã rất nghèo. Bạch cầu thì chỉ 96 giờ sau đã mất hết hoạt tính thực bào.

Các hồng cầu dùng làm hồng cầu nghiệm như hồng cầu O,A, B, AB (thuộc hệ ABO) hoặc các hồng cầu trong các Panel ngoài hệ ABO, thường được giữ trong dung dịch Alsever cải tiến ở 4°C được từ 3 đến 4 tuần. Tuy nhiên từ tuần thứ hai đã phải thường xuyên kiểm tra chất lượng hoạt tính, đặc biệt ở những hoàn cảnh khó đảm bảo nhiệt độ 4°C hoặc dung dịch bảo quản không chuẩn, không thể yên tâm với các dấu hiệu bề ngoài như chưa thấy dấu hiệu nhiễm khuẩn hoặc huyết tán mà phải kiểm tra hoạt tính, nhất là đối với những kháng nguyên yếu, các kháng thể nhạy cảm, cần đủ hoạt tính và độ nhạy để cho kết quả thử nghiệm đáng tin cậy.

2. Các tế bào đóng băng

Chính vì như trên đã nói, hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu (chủ yếu là hồng cầu) không giữ nguyên được hoạt tính kháng nguyên quá 4 tuần ở nhiệt độ 4°C cho nên đối với những hồng cầu mang kháng nguyên hiếm, cần thiết cho các xét nghiệm hoà hợp miễn dịch an toàn truyền máu, phải giữ ở nhiệt độ thấp của nitơ lỏng hoặc trong glycerol. Nếu đảm bảo nhiệt độ âm 30°C trở xuống hàng định, hoạt tính kháng nguyên sẽ giữ được hàng năm hoặc lâu hơn.

3. Các kháng huyết thanh

Ở 4°C, các kháng thể chứa trong huyết thanh giữ được hoạt tính lâu dài, các huyết thanh nghiệm dùng định nhóm hồng cầu cũng vậy. Nói chung các kháng thể loại IgM kém bền so với loại IgG.

Trước khi đặt vào nhiệt độ 4°C để bảo quản, phải hoà trộn vào huyết thanh hoặc dung dịch sinh vật phẩm một chất bảo quản "kìm vi khuẩn" (bacteriostatic) như dung dịch 1% sodium azid. Các chất kìm vi khuẩn này chỉ nên dùng ở nồng độ đúng và đủ, không nên dùng ở nồng độ cao hơn vì sẽ có ảnh hưởng xấu đến hiệu giá kháng thể và độ điện di của huyết thanh một khi cần đến phân tích các thành phần protein của huyết thanh đó bằng điện di.

Nếu giữ các kháng thể ở nhiệt độ âm 20°C trở xuống thì khỏi cần chất bacteriostatic nhưng cần bảo đảm nhiệt độ thấp hằng định. Khi đông bằng rồi khử băng xen kẽ, hoặc khi nhiệt độ không ổn định, lúc là -30°C , lúc là -15°C , lúc là -5°C chẳng hạn, nhất là khi điện thất thường khiến có lúc lên tới $+4^{\circ}\text{C}$ rồi lại tụt xuống thì hiệu giá kháng thể bị tụt rất nhanh. Khi bị mất điện trên 30 phút là phải chuyển các sinh vật phẩm đông băng qua các bình nitơ lỏng.

Riêng về các sinh vật phẩm (kháng thể) buộc phải giữ trong môi trường albumin nồng độ cao thì chỉ nên giữ ở 4°C vì nhiệt độ từ -20°C trở xuống làm hoá giáng albumin.

Khi để ở đông băng (20°C trở xuống), các kháng thể dần dần tập trung ở phần bình thấp của bình chứa (chai, lọ, ống tiêm) vì vậy khi khử băng (hoá lỏng) để dùng, cần lộn lên lộn xuống cho đều. Cũng có khi cần kháng thể ở nồng độ cao, người ta có thể hy sinh hút bỏ phần dịch phía trên chỉ sử dụng phần dưới, ở đó kháng thể được cô đặc hơn.

II. CHẾ TẠO CÁC SINH VẬT PHẨM

Các sinh vật phẩm dùng trong miễn dịch huyết học, phục vụ công tác truyền máu, gồm chủ yếu là các huyết thanh nghiệm hệ ABO, hệ Rh, các kháng huyết thanh thuộc các hệ khác, huyết thanh Antiglobulin đa giá và đơn giá. Ở nhiều nước, việc chế tạo các sinh vật phẩm như trên thường tiến hành ở các cơ sở tập trung, có đầy đủ điều kiện, khả năng và thẩm quyền, đáng tin cậy, sản xuất đồng bộ và tiêu chuẩn hoá, bán ra thị trường với độ đảm bảo cao. Tuy nhiên ở một số nước khác, chậm phát triển hơn, việc chế tạo này vẫn tiến hành ở từng cơ sở huyết học truyền máu hoặc miễn dịch, vì vậy cần theo đúng những tiêu chuẩn quốc tế đã quy định. Đây là cơ sở chính thức đối với các kháng huyết thanh dùng làm thuốc thử sinh học trong miễn dịch huyết học và truyền máu.

1. Tiêu chuẩn chế tạo Anti-A, Anti-B, Anti-A+B

a. *Nguồn*: Tốt nhất là lấy từ huyết thanh người. Huyết thanh này lại được chế tạo từ huyết tương lấy từ máu chống đông bằng ACD, CPD, hoặc EDTA. Thông thường, bằng phương pháp tách huyết tương trả lại hồng cầu (plasmapheresis), người ta thu lấy huyết tương rồi phục hồi calci huyết tương đó bằng dung dịch calci clorua sao cho hạt nồng độ cuối cùng là 0,013M. Hoà đều, ở 37°C, 1 giờ rồi để tiếp ở 4°C khoảng 10 đến 12 giờ (cho cục đông fibrin co lại tối đa). Ly tâm 3 000 vòng phút trong 30 phút, loại bỏ cục fibrin, thu lấy huyết thanh.

b. *Các tiêu chuẩn của huyết thanh nghiệm thuộc hệ A, B, O*

• *Độ nhạy (Avidity)*

Độ nhạy được tính bằng thời gian kể từ lúc hoà trộn huyết thanh nghiệm với huyền dịch hồng cầu đến lúc xuất hiện ngưng kết. Có thể công nhận đạt tiêu chuẩn quy định quốc tế như sau:

- Với Anti-A: 8 giây với hồng cầu nghiệm A₁
12 giây với hồng cầu nghiệm A₂
- Với Anti-B: 8 giây với hồng cầu nghiệm B.
- Với Anti-A+B: 8 giây với hồng cầu nghiệm AB.

(Kỹ thuật ngưng kết trên tấm).

• *Cường độ (Potency)*

Cường độ ngưng kết được đánh giá bằng kỹ thuật ngưng kết trong ống (xem chương 3 mục III). Sau ly tâm 1.800 vòng/phút x 01 phút phải đạt từ (3+) trở lên.

• *Hiệu giá (Titre)*

Hiệu giá được tính bằng mẫu số của tỷ lệ pha loãng cao nhất với một huyết thanh nghiệm mà vẫn cho kết quả ngưng kết hồng cầu mạng kháng nguyên tương ứng. Thi dụ:

Kháng huyết thanh Anti-A pha loãng đến 1/128 vẫn gây ngưng kết hồng cầu A rõ rệt thì hiệu giá của kháng huyết thanh Anti-A đó là 128. Thông thường, để định hiệu giá kháng huyết thanh, người ta pha loãng theo cách gấp đôi dần mẫu kháng huyết thanh cần thử rồi cho phản ứng ngưng kết với hồng cầu mang kháng nguyên thích hợp.

• *Một mẫu thí dụ hiệu giá kháng huyết thanh Anti-A*

Bố trí 10 typ pha loãng kháng huyết thanh Anti-A từ nguyên chất (1/1) đến (1/512). Từ các độ loãng kháng huyết thanh trên, làm phản ứng ngưng kết với hồng cầu nghiệm A hoặc A₁, ghi kết quả, thí dụ như sau:

Số thứ tự	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Độ loãng	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Ngưng kết	+++	++	+	+	+	+	+	+	±	-

Kết quả ngưng kết dương tính đến độ loãng 1/128. Vậy hiệu giá của kháng huyết thanh Anti-A này là 128

Nhiều tác giả còn dùng cách so sánh với hiệu giá của một mẫu quốc tế. Thí dụ cùng làm song song, cùng các điều kiện, hoàn cảnh, cùng người làm với mẫu huyết thanh quốc tế (hoặc quốc gia) cùng làm chuẩn (quy ước là hiệu giá 256) dương tính + đến ống thứ 9 thì hiệu giá của kháng huyết thanh Anti-A trên sẽ là 128. Nếu mẫu huyết thanh quốc tế dương tính (+) đến ống thứ 10 thì hiệu giá của kháng huyết thanh Anti-A trên chỉ là 256. Nếu mẫu huyết thanh quốc tế dương tính (+) đến ống thứ 8 thì hiệu giá của kháng huyết thanh Anti-A đó sẽ là 64.

• *Cho điểm (Score)*

Từ cường độ ngưng kết, có thể cho điểm. Thường cho 10 điểm đối với độ ngưng kết (++++) cho 8 điểm đối với độ ngưng kết

(++), cho 5 điểm đối với độ ngưng kết (+). Với thí dụ trên ta có 5 ống ngưng kết (+++), được 50 điểm; 2 ống ngưng kết (++) , được 16 điểm. 1 ống ngưng kết (+), được 5 điểm. 1 ống ngưng kết (\pm), được 2 điểm. Tổng cộng là 73 điểm.

Quy định tiêu chuẩn quốc tế cho 1 kháng huyết thanh đạt yêu cầu dùng làm huyết thanh nghiệm hệ ABO là:

- Cường độ ngưng kết ở nguyên chất và 1/2 là (+++)
- Độ nhạy 8 giây trở xuống.
- Hiệu giá 64.
- Điểm trên 50 điểm.
- ♦ *Tính đặc hiệu (Specificity)*

Là tính chất cơ bản của mỗi kháng huyết thanh được dùng làm huyết thanh nghiệm thuộc hệ ABO cũng như các hệ khác. Tính đặc hiệu cao bảo đảm cho mỗi huyết thanh nghiệm tránh được gây những dương tính giả, những phản ứng chéo khi làm xét nghiệm, có thể dẫn tới những lầm lẫn nguy hiểm. Muốn đạt tiêu chuẩn này, mọi kháng huyết thanh sử dụng làm huyết thanh nghiệm phải được kiểm tra với nhiều mẫu hồng cầu mang kháng nguyên tương ứng, thí dụ quy định Anti-A thử với ít nhất 10 mẫu hồng cầu (5mẫu hồng cầu B, 5 mẫu hồng cầu O) kết quả âm tính tuyệt đối. Anti-B thử với ít nhất 10 mẫu hồng cầu gồm A_1 , A_2 , O, kết quả âm tính tuyệt đối. Anti-AB thử với 10 mẫu hồng cầu O, kết quả âm tính tuyệt đối.

Đối với mọi kháng huyết thanh, khi sử dụng phải tuân theo nghiêm ngặt các quy định trong chỉ dẫn của hãng hoặc cơ sở chế tạo như độ pha loãng, kỹ thuật sử dụng, dùng môi trường gì, v.v cũng là nhằm đảm bảo tính đặc hiệu của kháng thể trong kháng huyết thanh.

2. Tiêu chuẩn chế tạo thuốc thử Antiglobulin người sử dụng trong miễn dịch - huyết học (Anti Human Globulin: AHG)

Như ở mục (3) chương ba, đã nói về kỹ thuật Antiglobulin trong miễn dịch huyết học, có giá trị lớn từ kinh điển cho tới nay đối với cả định nhóm và định kháng thể bất thường bao gồm các kháng thể đồng loại (alloantibodies) và tự thân (autoantibodies). Để làm kỹ thuật này cần có thuốc thử Antiglobulin đa giá, đơn giá, do các hãng chế tạo và bán ra thị trường, hoặc do các cơ sở sinh học tự chế, theo những nguyên lý cơ bản sau:

- ***Động vật dùng để gây miễn dịch***

Antiglobulin là kháng thể dị loại kháng các thành phần globulin của huyết thanh người, có thể tạo ra từ động vật như thỏ, dê, cừu, ngựa. Mỗi động vật có những ưu và nhược điểm, thí dụ ngựa cho nhiều huyết thanh nhưng là động vật lớn khó chăn nuôi, thường chỉ thích hợp với những Viện sản xuất lớn. Ở những cơ sở chế tạo thông thường, thỏ là tốt nhất. Nên chọn cỡ 3kg cân nặng. Nơi chăn nuôi thỏ phải riêng, tẩy vệ sạch sẽ, ăn uống vệ sinh, giữ cho thỏ không bị ghẻ, lở, các bệnh đường ruột vì thỏ hay mắc các chứng bệnh này và khi mắc rất khó chữa lành, hay chết giữa chừng.

- ***Kháng nguyên dùng làm nguyên liệu gây miễn dịch***

Tùy theo việc chế tạo, có thể dùng nguyên liệu huyết thanh O toàn phần để chế tạo loại Antiglobulin đa giá (Broad spectrum serum), có thể dùng những thành phẩm IgG, IgA, IgM thu được bằng các phương pháp kết tủa, hấp thụ vào hồng cầu, có thể dùng các thành phần bổ thể v.v để chế tạo những loại Antiglobulin đơn giá đặc hiệu.

- ***Đường đưa vào cơ thể động vật, thời hạn gây miễn dịch, phương pháp gây miễn dịch***

Đây là vấn đề phức tạp và phong phú nhất. Nhiều tác giả sử dụng và công bố các phương pháp khác như phương pháp Proom

dùng huyết thanh người đã tủa bằng Alun (phèn) phương pháp Slavin dùng huyết thanh người trộn lẫn với Sodium Alginat. Đa số tác giả dùng huyết thanh người trộn với tá chất Freund (Freund's adjuvant).

Đường tiêm và cách tiêm càng đa dạng, có tác giả dùng đường tĩnh mạch, có tác giả dùng đường phúc mạc, có tác giả dùng đường tiêm bắp, có tác giả xen kẽ tiêm phúc mạc với tiêm bắp hoặc tiêm tĩnh mạch, có tác giả sử dụng những phác đồ phức tạp. Thí dụ Dausset giới thiệu (1956) một phác đồ như sau: dùng 2ml huyết thanh người tiêm tĩnh mạch 2 ngày 1 lần trong 10 ngày, nghỉ 1 tuần, tiêm tiếp 1 đợt nữa 5 mũi, mũi đầu tiêm phúc mạc hoặc dưới da, 24 giờ sau tiêm mũi thứ hai, mũi thứ ba, thứ tư, thứ năm, mỗi mũi cách nhau 2 ngày. Lại nghỉ 1 tuần, sau tiếp đợt thứ ba như đợt thứ hai, 4 ngày sau mũi tiêm cuối của đợt ba, lấy huyết thanh thử để thử hoặc lấy hết máu.

Proom thì tiêm 1 mũi duy nhất 5ml dung dịch kháng nguyên vào bắp thịt, 30 ngày sau mới tiêm 1 mũi thứ hai cũng như trên. 12 ngày sau lấy huyết thanh để thử.

Lacaz thì tiêm 10ml vào phúc mạc. 14 ngày sau, tiêm 1 mũi thứ hai như thế, 14 ngày sau tiếp 1 mũi thứ ba cũng như vậy. 14 ngày sau, lấy huyết thanh để thử.

Càng gần đây, người ta có xu hướng dùng những phác đồ đơn giản hơn, tất nhiên hiệu lực vẫn bảo đảm. Đối với chế tạo và sản xuất, phải cân nhắc tính toán cả chất lượng, cả giá thành bao gồm công sức, tổn kém và thời hạn hoàn thành.

Nguyên lý chung:

- Sử dụng động vật, cần chọn loại động vật có đáp ứng miễn dịch mạnh. Thỏ là động vật đạt yêu cầu. Tuy nhiên từng con lại đáp ứng yếu mạnh khác nhau, vì vậy không nên chỉ gây mỗi lần 1 con mà nên mỗi lần vài con (từ 4 đến 6).

- Trong quá trình gây miễn dịch cần lưu ý đến cả 2 kiểu đáp ứng: Tế bào và dịch thể. Ta cần đáp ứng dịch thể mạnh để có được các kháng thể theo mục đích đặt ra, nhưng đồng thời phải hạn chế đáp ứng miễn dịch kiểu tế bào có thể dẫn tới các hậu quả miễn dịch bệnh lý, đặc biệt là khi sử dụng trợ chất toàn phần (Freund's adjuvant) vì các hậu quả này gây nên cho thỏ gây yếu, sút cân, có thể nhiễm khuẩn, hoại tử chỗ tiêm, có thể chết.

- Cách tiêm dưới da hoặc bắp thịt làm cho việc xâm nhập của kháng nguyên chậm. Dưới da là chậm nhất, tiêm bắp là vừa phải. Tiêm vào phúc mạc tương tự như tiêm bắp vì cũng tiếp xúc nhanh với các mạch máu. Tiêm tĩnh mạch thì quá nhanh, kháng nguyên được tiếp xúc nhanh với hệ miễn dịch nhưng cũng đào thải nhanh. Những lần tiêm nhắc nhở thì tiêm tĩnh mạch có thể gây nên sự hấp thụ kháng thể lưu hành trong huyết thanh. Tuỳ cách tiêm, đường tiêm mà ấn định thời hạn lấy máu thử. Khi đưa kháng nguyên vào chậm và từ từ, đáp ứng miễn dịch cũng sẽ chậm, từ từ nhưng vững chắc, bền lâu.

Việc phối hợp với các trợ chất là nhằm mục đích kích thích tính đáp ứng miễn dịch, làm tăng sản xuất kháng thể

- Lấy huyết thanh thử và lấy hết huyết thanh, tuỳ theo thời hạn đáp ứng miễn dịch của động vật đối với từng cách gây miễn dịch, mỗi con vật có thể đáp ứng nhanh chậm chút ít, cần thăm dò đúng thời điểm đáp ứng tối đa để lấy hết huyết thanh. Để thăm dò, nên lấy huyết thanh thử từng thời kỳ. Khi đã dò được thời điểm đáp ứng tối đa, đạt yêu cầu thì có thể lấy hết máu để thu huyết thanh toàn bộ, hoặc lấy một mức độ vừa đủ để duy trì đời sống cho động vật, tiêm nhắc nhở tiếp để thỏ tiếp tục sản xuất kháng thể.

- Sau khi đã tách được huyết thanh, tiến hành khâu hấp thụ những yếu tố dị loại trong huyết thanh thử với hồng cầu người (A, B, O), và ức chế bổ thể ở 56°C. Tất cả những khâu này đều làm trong điều kiện vô trùng. Huyết thanh thu được pha

thêm chất bảo quản (Sodium azid), đóng ống, giữ ở âm 20°C trở xuống hoặc nếu cường độ kháng thể cao, hiệu giá tốt thì có thể đông khô.

Dưới đây, giới thiệu 3 kiểu phác đồ đơn giản và dễ phổ cập để vận dụng trong từng cơ sở có điều kiện:

PHÁC ĐỒ CHẾ TẠO ANTIGLOBULIN ĐA GIÁ

(Broad spectrum serum)

(Theo J.V.DACIE và S.M.LEWIS, Practical Haematology)

Lấy 10 mẫu huyết thanh người nhóm máu O, trộn lẫn rồi dùng 1ml hỗn hợp này hoà đều thật nhuyễn với 1ml trợ chất Freund, sao cho thành 1 nhũ tương quánh, đem tiêm vào bắp thịt mỏng thớ, mỗi bên 1ml. Sau 6 đến 8 tuần, tiêm 1ml huyết thanh O vào bắp (mũi tiêm nhắc nhở) lần tiêm này không cần hoà với Freund. 10 đến 14 ngày sau lấy máu tách huyết thanh thử. Từ đó trở đi cứ 2 tháng 1 lần nhắc nhở bằng 1ml huyết thanh O và sau 10 đến 14 ngày thì lấy máu tách huyết thanh.

Phác đồ này đơn giản, dễ thực hiện. Tuy nhiên khâu quan trọng nhất trong phác đồ này là tạo nhũ tương tốt huyết thanh O và trợ chất Freund để tiêm lần đầu tiên. Trợ chất Freund là một trợ chất toàn phần (Freund complete adjuvant) có tác dụng kích thích đáp ứng miễn dịch rất mạnh. Nên dùng chế phẩm của một số hãng đáng tin cậy, thí dụ của Bacto, Difco Ltd.

Sau khi thử thấy đạt rồi, lấy hết huyết thanh đem hấp thụ và hiệu giá, bảo quản, hoàn thành toàn bộ quá trình chế tạo, cụ thể như sau:

- Thường lấy máu của thỏ từ các tĩnh mạch tai, nhưng cũng có thể từ tĩnh mạch cổ. Máu để qua đêm ở 4°C cho cục. Hút lấy huyết thanh, pha loãng một loạt theo cách gấp đôi dần (doubling dilution) bằng dung dịch đệm muối. Dùng các độ pha loãng ấy làm phản ứng ngưng kết trên tấm với hai loại hồng

cầu: đã cảm thụ với IgG và không cảm thụ. Hồng cầu này của cùng người nhóm O. So sánh kết quả ngưng kết với hai loại hồng cầu ấy sau 5 phút. Hiệu giá ngưng kết đối với hồng cầu cảm thụ 16 lần, nếu không, phải gây miễn dịch tiếp, dưới 16 lần không đủ chỉ tiêu để chế tạo tiếp. Nếu trên 16 lần, tiến hành tiếp các bước khử bổ thể và hấp thụ yếu tố dị loại.

- Để khử bổ thể, đem đặt huyết thanh vào cách thủy 56°C trong 30 phút. Sau đó, để hấp thụ các yếu tố dị loại đem hấp thụ huyết thanh với các hồng cầu người A, B và O, mỗi lần hấp thụ 2 giờ ở 4°C, thể tích huyết thanh và hồng cầu ngang nhau. Điều quan trọng nhất trong khâu hấp thụ là rửa hồng cầu thật sạch, thường phải ít nhất 6 lần, rửa với lượng nước muối 0.9% đầy đủ, làm sao không còn sót 1 chút nào globulin huyết thanh người trên hồng cầu. Dịch rửa lần cuối cần kiểm tra lại với acid sulphosalicylic 25% xem còn hay hết các vết protein, nếu còn, phải rửa tiếp. Hấp thụ xong, thử lại với các mẫu hồng cầu A, B, O để chắc chắn kết quả hoàn toàn âm tính. Nếu không, phải hấp thụ lại rồi thử lại khi hấp thụ đã đạt, đem hiệu giá huyết thanh.

- Các phẩm chế Antiglobulin đa giá thông dụng đều chứa cả kháng thể kháng globulin miễn dịch (Ig) người, chủ yếu là IgG và các kháng thể kháng các thành phần bổ thể, gọi chung là các Anti-C. Trong quá trình gây miễn dịch thỏ, sẽ gặp những trường hợp huyết thanh thu được chỉ đủ cường độ kháng thể Anti-IgG, không đủ cường độ Anti-C hoặc ngược lại. Đây là thêm một lý do tại sao cần gây miễn dịch đồng thời vài con thỏ (4 đến 6), để nếu gặp trường hợp vừa nói, có thể hoà trộn nhiều mẫu huyết thanh thu được để đạt 1 mẫu thuốc thử toàn vẹn, đủ tiêu chuẩn. (Bảng 6.1).

**Bảng 6.1. Xác định độ pha loãng tối ưu của thuốc thử:
Huyết thanh kháng globulin đa giá**

Độ pha loãng của H.T kháng globulin	H.C đã miễn cảm anti - D ở độ pha loãng					H.C đã miễn cảm anti - Fy ^a ở độ pha loãng				
	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16
1	+++ +	+++ +	+++ +	++	-	+++	++	++	-	.
2	+++ +	+++ +	+++ +	++	(+)	+++	+++	++ +	+	.
4	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+	+++	+++	++ +	+	.
8	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+	+++	+++	++ +	+	.
16	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+	+++	+++	++ +	+	.
32	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+	+++	+++	+	+	-
64	+++ +	+++ +	+++ +	++	(+)	+++	++	-	-	-
120	+++ +	+++ +	++	+	-	++	(+)	-	-	.
256	+++ +	+++	(+)	-	-	++	-	-	-	.
512	+	(+)

Thường xảy ra những trường hợp nồng độ kháng thể Anti-globulin và Anti-C không đều nhau, mặc dù đã hoà trộn nhiều mẫu huyết thanh chế tạo được, thí dụ hiệu giá Anti-IgG tối ưu là 64, còn hiệu giá tối ưu đối với Anti-C lại là một trong khi đó nếu cùng độ nguyên chất (1/1) thì tác dụng của Anti-IgG rất thấp (hiện tượng vùng), hoặc nếu dùng độ loãng 1/64 để có hiệu giá tối ưu với Anti-IgG thì nồng độ của Anti-C lại quá thấp. Để dung hoà, đảm bảo cả chất lượng Anti-IgG và Anti-C, người chế tạo có thể chọn 1 độ pha loãng phù hợp nhất, thí dụ 1/32 với trường hợp trên, ấn định trong chỉ dẫn cho người sử dụng. Người sử dụng phải tuân thủ chỉ dẫn này nghiêm ngặt.

PHÁC ĐỒ CHẾ TẠO ANTI GLOBULIN ĐƠN GIÁ Anti-IgG

Nguyên lý: Dùng một vật phẩm IgG người sơ bộ thuần khiết (semi-purified). Định dùng con thỏ nào để gây miễn dịch thì lấy hồng cầu của chính nó để hấp thu kháng thể loại IgG tự nhiên, kháng hồng cầu thỏ có sẵn trong huyết thanh người, rồi sau đó truyền lại hồng cầu ấy cho bản thân nó. Như vậy có thể thu được kháng thể Anti-IgG với độ thuần khiết cao. (Bảng 6.2).

Bảng 6.2. Thử hoạt tính kháng IgG với hồng cầu đã miễn cảm

Độ pha loãng của Anti-D	Độ pha loãng của kháng globulin							
	1	2	4	8	16	32	64	128
1	+++	++++	++++	++++	+++	+++	+	(+)
2	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+	(+)
4	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	(+)
8	+++	+++	+++	++	++	(+)	-	-
16	+	(+)	+	-	-	-	-	-

Cụ thể

Lấy từ tĩnh mạch tai thỏ khoảng 3ml máu, chống đông ACD. Rửa hồng cầu 3 lần bằng nước muối như thường lệ. Khối lắng hồng cầu thỏ thu được sau lần rửa cuối, lấy ra 1ml vào 1 tub, cho thêm 10ml huyết thanh chứa IgG người nồng độ khoảng 0,5/100ml (sơ bộ thuần khiết), trộn đều, ủ ở 37°C 1 giờ. Rửa 10 lần bằng nước muối sao cho sạch các vết protein quanh hồng cầu, cuối cùng tạo huyền dịch thể tích 2ml truyền lại vào phúc mạc thỏ, sau 2 ngày làm lại lần nữa như thế, rồi từ đó tiêm mỗi tuần 2 lần trong 2 tuần liền, những ngày này truyền vào tĩnh mạch. Sau lần truyền cuối 2 lần thì lấy máu thử. Nếu những lần truyền tĩnh mạch không gây được đáp ứng thỏa đáng thì thay bằng tiêm phúc mạc.

Việc lấy máu thỏ, có thể lấy 1 lần đủ số lượng cho cả quá trình, giữ trong ACD ở 4°C, như thế tránh việc lấy đi lấy lại nhiều lần. Tất nhiên, phải đảm bảo vô trùng từ đầu đến cuối.

PHÁC ĐỒ CHẾ TẠO HUYẾT THANH KHÁNG BỔ THỂ (Anti-C)

Nguyên lý: Các thành phần bổ thể được hấp thụ vào Zymosan rồi đem tiêm cho thỏ cùng với trợ chất Freund.

Cụ thể:

Lấy 10ml huyết thanh người, rất tươi. Cho thêm vào 50mg zymosan, hoà trộn đều rồi để 1 giờ ở 37°C, thường xuyên hoà trộn. Bổ thể sẽ gắn vào zymosan thành 1 phức hợp. Đem rửa phức hợp này ít nhất 10 lần bằng nước muối 0,9% để loại bỏ các protein huyết thanh.

Thêm vào 1ml trợ chất Freund, trộn đều, đem tiêm bắp thịt cho thỏ. Sau 3 tuần lấy máu thử, nếu đạt thì thu lấy huyết thanh. Nếu muốn giữ thỏ để chế tạo lâu dài thì chân nuôi cần thận, cứ 4 tháng 1 lần tiêm nhắc nhở và cứ sau 1 đợt nhắc nhở 3 tuần thì lấy huyết thanh.

Để thử chất lượng của huyết thanh này, dùng 2 loại nguyên liệu: hồng cầu đã gắn với kháng thể và bổ thể trong huyết thanh người bị bệnh huyết tán tự miễn (có thể dùng ngay hồng cầu của người bị bệnh này vì hồng cầu này luôn gắn các thành phần bổ thể trên bề mặt), và hồng cầu đã cảm thụ với IgG (chứng âm) (bảng 6.3).

Bảng 6.3. Xác định hoạt tính kháng C₃ của mẫu HT đã hấp thụ

số	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Độ pha loãng của HT	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
HC phản ứng C ₃	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	..

HC không phản ứng	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
HC dư trữ ở 4°C	±	-	-	-	-	+	+	-	-	-

Trước khi thử, các bước hấp thụ cũng tiến hành như trường hợp Antiglobulin đa giá đã mô tả ở trên.

Các kháng thể tạo được như vậy chủ yếu là kháng C_3C_4 . Người ta có thể chế tạo riêng từng loại kháng thể C^{3c} , C^{3b} , C^{4b} , C^{4c} , C^{4d} v.v) xin xem chi tiết thêm trong Blood Transfusion In Clinical Medicine P.L. Mollison, lần xuất bản thứ 6, thứ 7 và các tài liệu chuyên khảo sâu hơn.

CHẾ TẠO HUYẾT THANH ANTI GLOBULIN ĐƠN GIÁ

Anti-IgM, Anti-IgA

NGUYÊN LÝ

Nguyên liệu kháng nguyên dùng để gây miễn dịch cho chó thường lấy từ các globulin đơn dòng của những người bệnh u tủy. Riêng với IgA thì có thể gán hống cầu chó với nước bọt của người (nước miếng) rồi tiêm lại cho chó như cách làm với IgG, dựa trên cơ sở IgA thường được tiết ra bởi các tế bào niêm mạc tuyến nước bọt và có mặt trong nước bọt của người (Tonder and Larsen, 1970).

Muốn có những huyết thanh thực thuần khiết Anti-IgM hay Anti-IgA, thường phải hấp thụ với IgG vì trong chế tạo thường có lẫn cả Anti-IgG.

Các kháng thể Antiglobulin này đòi hỏi những bước tiến hành khá phức tạp, xin xem ở các tài liệu chuyên khảo sâu hơn. Trên thực tế, các Antiglobulin đơn giá đặc hiệu như vậy giá thành cao, chỉ dùng đối với những yêu cầu đặc biệt. Một số cơ sở sản xuất và một số tác giả, kể cả một số hãng lớn có kinh nghiệm, chủ trương không cần chế tạo những sản phẩm thuần khiết cao, quá tốn kém mà không nhất thiết đòi hỏi như thế, người ta chế tạo những sản phẩm thuần khiết tương đối, có nghĩa là hoặc trội về Anti-IgG, hoặc trội về Anti-IgM, hoặc trội về Anti-IgA, rồi dựa vào sự chênh lệch nồng độ giữa các kháng thể ấy mà loại bỏ những kháng thể yếu bằng pha loãng thích hợp.

Phụ lục

MỘT SỐ DUNG DỊCH CHỐNG ĐÔNG VÀ DUNG DỊCH ĐỆM DỪNG TRONG MIỄN DỊCH TRUYỀN MÁU

- Bảo quản các huyết thanh chứa kháng thể nói chung và huyết thanh Anti-globulin nói riêng, thường ở dạng lỏng, ở nhiệt độ -20°C (âm 20°C) trở xuống. Với điều kiện như vậy có thể được giữ lâu dài hàng năm hoặc hơn nữa. Nên định kỳ thử lại mọi tính chất xem còn đủ tiêu chuẩn thì gia hạn sử dụng, không còn đủ nữa thì hủy.

- Một số huyết thanh chứa kháng thể có thể đông khô và giữ dưới dạng này lâu dài ở nhiệt độ từ 4°C đến 10°C . Đông khô tiện cho việc vận chuyển, bảo quản ở các tuyến không có điều kiện nhiệt độ âm 20°C , nhưng khi đông khô thường bị giảm cường độ và hiệu giá kháng thể, có loại kháng thể bị giảm rất nhiều, có loại bị giảm ít. Vì vậy phải tùy theo, không thể có một quy tắc chung cho mọi loại được. Nếu có thì cũng chỉ là: khi muốn đem đông khô 1 huyết thanh thì hãy làm sao tạo ra được 1 cường độ và hiệu giá kháng thể trong huyết thanh đó thật cao để sau khi đông khô dù có bị giảm cũng đủ chất lượng theo tiêu chuẩn, thí dụ trước đông khô hiệu giá đạt tới 1.024, sau đông khô chỉ còn 64. Đó là chưa kể đến chất lượng đông khô. Nếu thiết bị tốt, vật phẩm đông khô giữ được chất lượng lâu. Nếu máy đông khô không tốt, vật phẩm đông khô sẽ nhanh chóng bị xuống cấp giảm hiệu giá.

- Để tránh những phản ứng phụ do trợ chất Freund, nhiều tác giả đã dùng các trợ chất khác như alun (Froome's alun precipitate method), như Na alginate (Slavins alginate method) v.v, tuy hiệu lực kích thích miễn dịch kém thua Freund, nhưng với những phương pháp cải tiến thích hợp vẫn thu được kết quả. Trong hoàn cảnh cụ thể của từng cơ sở, có thể ứng dụng tùy theo.

- Để tránh bớt bước hấp thụ các yếu tố dị loại dồi dào nhiều thao tác kỹ thuật phức tạp và khó đảm bảo vô trùng, có thể thay thế hoàn toàn hoặc một phần bước này bằng phương pháp pha loãng. Muốn vậy, thường chọn lựa thô ngay từ đầu, chỉ gây miễn dịch ở những con mà yếu tố dị loại tự nhiên thấp nhất. Mặt khác, làm sao gây miễn dịch đạt đáp ứng cao (cường độ và hiệu giá cao) để có thể pha loãng tới mức tối ưu loại trừ hết yếu tố dị loại đồng thời đảm bảo cường độ kháng thể đạt các tiêu chuẩn quy ước.

- Như phần trên đã nói, nên đông ống hoặc lọ từng phần nhỏ để khi lấy ra khỏi nhiệt độ băng là dùng hết, không hết cũng loại bỏ, tránh trường hợp đã đưa ra nhiệt độ từ 4°C trở lên rồi lại đông băng lại (khử băng và đông băng nhiều lần), kháng thể sẽ giảm rất nhanh.

- Khi đông băng, các kháng thể thường tập trung ở phần dưới vì vậy khi hoá lỏng để dùng phải lắc đều, hoặc nếu muốn dùng kháng thể với nồng độ cao, có thể để yên rồi hút bỏ đi phần trên, lấy những giọt ở dưới.

MỘT SỐ DUNG DỊCH THƯỜNG DÙNG TRONG MIỄN DỊCH HUYẾT HỌC

DUNG DỊCH CHỐNG ĐÔNG VÀ GIỮ MÁU ACD

Hoà chất	Công thức A	Công thức B
Sodium citrat	0,33 gam	0,33 gam
Acid citric	0,12 gam	0,12 gam
Dextrose	0,3675 gam	0,3675 gam
Nước cất	15 ml	25ml

Cả 2 công thức trên đều dùng chống đông cho 100ml máu. Sự khác nhau duy nhất chỉ là ở độ pha loãng: Trong công thức A pha trong 15ml, trong công thức B pha trong 25ml nước cất. Cụ thể khi chống đông với máu thì:

- 15ml công thức A + 100ml máu, hoặc
- 25ml công thức B + 100ml máu

Cả 2 công thức đều có tác dụng giữ máu ngang nhau, nhưng cho đến nay, người ta vẫn dùng công thức A phổ biến hơn.

DUNG DỊCH AMMONIUM POTASSIUM OXALATE

- Ammonium oxalate: 1,2 gam
- Potassium oxalate: 0,8 gam
- Nước cất vừa đủ 200 ml

DUNG DỊCH EDTA

- EDTA (Ethylenediamine tetra-acetic acid, dipotassium): 10g
- Nước cất: 100 ml

DUNG DỊCH EDTA TRUNG TÍNH, pH 7.0

- EDTA: 8,9 gam
- N-Natri hydrocid: 15 ml
- Nước cất: 200 ml

HEPARIN

Bột heparin hoà tan trong nước cất với nồng độ 4mg/ml. Lấy 0,25ml dung dịch này (chứa 1 mg heparin) cho vào những tub hoặc lọ rồi đặt vào tủ ấm 37°C cho đến khô hết. Cứ mỗi lọ chứa 1mg heparin như thế đủ để chống đông cho đến 10ml máu trong 24 giờ (thường 1mg tương đương với 130 đơn vị quốc tế).

DUNG DỊCH ALSEVER

- Glucose: 24,6 gam
- Trianatri citrat, $2H_2O$: 9,6 gam
- Natri chlorua: 5,04 gam
- Nước cất: 1.200 ml

MỘT SỐ DUNG DỊCH ĐỆM

1. ĐỆM BARBITAL (VERONAL) pH 7,35 - 7.
 - 0,1 mol Barbitat (Na Diethyl barbiturate): 570 ml
 - 0,1 N-Acid chlorhydric: 430 ml
 - Natri chlorua: 5,67 gTrước khi dùng, pha loãng gấp đôi bằng nước muối 0,9%.
2. DUNG DỊCH ĐỆM GLYCIN: pH 3,0
 - Glicin (NH_2CH_2COOH): 6,15 gam
 - Natrichlorua: 4,80 gam
 - Nước cất: 820 ml
 - 0,1 N-Acid chlorhydric: 180ml
3. DUNG DỊCH ĐỆM PHOSPHAT (ISO - OSMOTIC)
 - a) 0,15 mol $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$: 23,4 g/lit
 - b) 0,15 mol Na_2HPO_4 : 21,3 g/lit

pH	Dung dịch	Dung dịch B
7,2	24 ml	76 ml
7,4	18 ml	82 ml
7,6	13 ml	73 ml
7,7	9,5 ml	90,5 ml

4 ĐỆM PHOSPHAT SORENSÉN

Pha dung dịch dự trữ lâu dài 0,066 mol như sau:

A. KH_2PO_4 : 9,1 gam/lit

B. Na_2HPO_4 : 9,5 gam/lit/hoặc

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 11,9 gam/lit

Để đạt các pH theo ý muốn, pha như sau:

pH	Dung dịch A	Dung dịch B
5,4	97,0	3,0
5,6	95,0	5,0
5,8	92,2	7,8
6,0	88,0	12,0
6,2	81,0	19,0
6,4	73,0	27,0
6,6	63,0	37,0
6,8	50,8	49,2
7,0	38,9	61,1
7,2	28,0	72,0
7,4	19,2	80,8
7,6	13,0	87,0
7,8	8,5	91,5
8,0	5,5	94,5

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bạch Quốc Tuyên, P. Cazal.** Nhóm hồng cầu ở Việt Nam, C.T.N.C.K.H. Bộ Y tế, 1984 (17-40).
2. **Đặng Đức Trạch, Nguyễn Đình Hương, Phạm Minh Hùng, Pondman K W, Wright P.E.** Miễn dịch học. Textbook of Immuno-Logy 1984 (12 - 90)
3. **A. Arndt Tanser.** Coombs Primer. The Anti-human Globulin test, 2007 (3 - 29)
4. **C.P. Engelfriet.** The Production of Anti-human globulin Reagent for use in Immunohematology Lab/84.8 (WHO) (1 - 21)
5. **C. Salmon et Coll.** Bases fondamentales de l'immunogenetique
6. **C. Salmon et Coll.** Les systemes de variation
7. **C. Salmon et Coll.** Groupes sanguins Antigènes et Anti-corps
8. **C. Salmon et Coll.** Techniques d'Immuno-hematologie, 2008
9. **Dade Division.** Americal Hospital Supply Corporation. Guide to quality assurance in Blood Banking, 2007 (3 - 90)
10. **Douglas W.Huestis, M.D. Joseph R. Bove, M.D. Shirler busch.** Practical Blood Transfusion, first Edition, 2006
11. **Eloise Giblett.** Blood groups and Blood Transfusion Chapter 282. Harrison's PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE, Eleventh Edition
12. **Frances K. Widmann.** Identification of unexpected alloantibodies technical manual AA BB 2007 (221 - 240)
13. **Harold A. Oberman, J. Dausset.** Standard for Blood Banks and Transfusion services, AABB, 10th Edition 2007 (1 - 42). Immuno-Hematologie biologique et clinique. 1956

14. **J. Colombani, J.Dausset C. Salmon, M.Seligman et Coll.** Travaux pratiques d'Immuohematologie. 2008
15. **J.V.Dacie and S.M.Lewis.** Practical Hematology. 9th Edition
16. **Joseph L.Goldstein, Michael S.Brown.** Genetic principles, Chapter 57 Harrison's Principles of Internal medicine. Eleventh Edition
17. **Margaret treacy, judy cottingham, coeditors.** Reading and Grading of hemagglutination Reactions. Printed in USA July, 2009 (2-21)
18. **Neville J.Bryant.** An Introduction to Immunohematology. 1990
19. **Ortho diagnostic systems.** Benelux Symposium in Blood Bankingg. 2009
20. **Ortho diagnostics.** Compatibility Testing, 2009 (3 - 76).
21. **Philip levine M.D.** Blood group Antigens and antibodies as applied to compatibility testing. 1998 (3 - 83)
22. **Pineda AA, Taswell HF.** Delayed hemolytic transfusion Reaction. An Immunologic hazard of blood transfusion. Transfusion 18. 2008
23. **P.L. Mollison.** Blood Transfusion in clinical Medicine. Seventh Edition, 2008
24. **Rauner T.A. Tanaka K.R.** Hemolytic Transfusion reactions associated with the Kidd antibody N.Engl.J.Med 276. 1486. 2008
25. **Roy R.B, Lotti W.N.** Delayed hemolytic Reactions caused by. Anti-c not detectable before transfusion Transfusion 2 342. 2009
26. **Second USA-USSR joint Symposium.** Blood Transfusion, Blood Component and hepatitis. 21, 2008
27. **Sam frankel, Stan leyreitman, Alex C. Sonnenwirth, bradwohls'.** Clinical Laboratory methods and diagnosis, 2008 (452 - 455)
28. **William J, William M.D.** Hematology 7th Edition, 2008 (561 - 653)
29. **Wintrobe.** Cllical Hematology, 2008 (419 - 449)

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

**HOÀ HỢP MIỄN DỊCH HỒNG CẦU
TRONG TRUYỀN MÁU HIỆN ĐẠI**

Chịu trách nhiệm xuất bản

HOÀNG TRỌNG QUANG

<i>Biên tập:</i>	BS. NGUYỄN LAN
<i>Sửa bản in:</i>	NGUYỄN LAN
<i>Trình bày bìa:</i>	CHU HÙNG
<i>Kí vẽ minh:</i>	TRẦN THANH TÚ

In 1000 cuốn, khổ 14 5x20.5cm tại Xưởng in Nhà xuất bản Y học.
Số đăng ký kế hoạch xuất bản: 1099-2010/CXB/5-181/YH
In xong và nộp lưu chiểu quý IV năm 2010.