

• 个案分析 •

罕见类抗-A1 抗体引起 ABO 血型正反定型不符多因素分析*

杨红梅^{1,2}, 邹 昕^{1,2#}, 虞 茜^{1,2}, 许 飞^{1,2}, 徐 立^{1,2△}

1. 江苏省常州市中心血站, 江苏常州 213000, 2. 江苏省常州市临床输血重点专科实验室, 江苏常州 213000

关键词:凝集抑制试验; 溶血率; 吸收放散试验; 类抗-A1 抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.20.025

中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2022)20-2557-04

文献标志码:C

ABO 血型系统是最早被发现的人类血型系统,其基因位于第 9 号染色体,同时也是最重要的一个血型系统,在临床输血、移植医学和产前诊断中具有重要意义。在日常 ABO 血型鉴定工作中,常常会碰到正反定型不一致,在排除人为操作因素外,不规则抗体和亚型往往是研究者考虑的方向^[1-3]。本实验室在 ABO 血型鉴定过程中发现 1 例正反定型不符标本,该标本血型血清学无法判断其血型,借助不规则抗体筛查、吸收放散试验、凝集抑制试验、酶处理试验、不同温度效价试验、溶血率监测等检测手段,并结合聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)基因分型和 ABO 基因第 6、7 外显子扩增产物基因测序,最后确定其血型为 A101 型。该病例为 A 型罕见的产生了类抗-A1 抗体,目前国内少见其相关报道。

1 资料与方法

1.1 一般资料 常某某,男,74 岁,江苏常州人,汉族,2021 年 3 月 3 日因肩骨疼痛入住常州市中医医院,术前常规备血过程中发现其鉴定正定型为 A 型,反定型为 O 型,正反定型不符,于当天送常州市中心血站输血研究室进行血型鉴定。

1.2 仪器与试剂 抗-A/B 单克隆抗体(上海血液生物医药有限责任公司,批号:20200609)、抗-D(IgM)单克隆抗体(上海血液生物医药有限责任公司,批号:20200301101)、抗-H 抗体(德国 CE 公司,批号:OHM142)、抗-AB 抗体(德国 CE 公司,批号:OABM083)、抗-A1 抗体(上海血液生物医药有限责任公司,批号:20200522)、ABO 血型反定型红细胞(北京金豪制药股份有限公司,批号:2021101001)、人源抗-A/B 单克隆抗体(自制)、血型分析液(上海血液生物医药有限责任公司,批号:20216201)、血型试剂质控试剂盒(上海申型医学科技有限公司,批号:20227202)、抗-Lea 和抗-Leb 抗体(德国 CE 公司,批号:OLeM121-1 和 OLeM110-1)、抗体筛选细胞(匈

牙利 REAGENS 公司,批号:702013)、微量游离血红蛋白(FHb)检测试剂盒(QuantiChrom 公司,批号:210114)、ABO-PCR-SSP 基因分型试剂盒(天津市秀鹏生物技术有限公司,批号:K202008006)、DNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司,批号:15101)、琼脂糖(北京沃森生物科技有限公司,批号:181650)、溴化乙锭(10 mg/mL,青岛捷世康生物科技有限公司)。美国 AB 公司 9700 型 PCR 扩增仪、DNA 浓度测定仪、凝胶成像系统、美国贝克曼库尔特的高速离心机、日本久保田的 KA-2200 型血清学专用离心机。37 ℃ 恒温水浴箱、湖南卢湘仪的 TD4 低速自动平衡离心机、北京瑞尔达生物科技有限公司的 F4040 半自动生化分析仪。

1.3 血清学检测 采用试管法进行 ABO 正反定型试验。取 B 型献血者、O 型献血者和患者红细胞少许,生理盐水洗涤 3 次,配制成 2% 红细胞悬液进行抗-H、抗-A1 和抗-AB 试验,离心判读凝集强度;同时对该标本进行抗体筛查。所有试验均严格按照《AABB 技术手册(第 18 版)》^[4]和文献^[5]的方法及试剂操作说明书进行。

1.4 PCR-SSP 基因组 DNA 提取及 ABO 基因扩增、图谱比对分析 采用 Invitrogen 公司 DNA 提取试剂盒提取患者外周血基因组 DNA,调整 DNA 模板浓度为 30~35 ng/ μ L, A_{260}/A_{280} 为 1.60~1.80,根据人类 ABO 血型基因检测试剂盒说明书设置参数进行 PCR 扩增;取扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像分析系统进行分析,并与天津市秀鹏生物技术有限公司提供的图谱比对分析结果。

1.5 ABO 基因测序分析和序列比对 ABO 基因第 6、7 外显子扩增片段大小约为 2 019 bp,扩增反应体系根据天津市秀鹏生物技术有限公司试剂盒说明书进行,采用引物:上游 5'-CCTGCCAGCTCCAT-GTGAC-3';下游:5'-CAGGACGGACAAAGGA-3'。

* 基金项目:江苏省输血协会英科新创科研基金资助项目(JS2020001);江苏省常州市卫健委科技项目(青年人才科技项目)(QN202133);江苏省常州市中心血站站级课题(xz202106)。

共同第一作者。 △ 通信作者,E-mail:yhmei83@126.com。

扩增产物经纯化后并测序,该试验部分在天津市秀鹏生物技术开发有限公司完成。第 6 外显子测序引物为上游:5'-CATGTGGGTGGCACCCCTGCC-3';下游:5'-ATGTCCACAGTCACTCGCCA-3'。第 7 外显子测序引物为上游:5'-GCTCCCCCAGCCCCGTCGG-3';下游:5'-GTTTACCCGTTCTGCTAA-3'。

2 结 果

2.1 血型血清学检测结果 采用试管法对标本进行 ABO 血型血清学检测,正定型与抗-A 凝集强度可达 4+,与抗-B 不反应。反定型患者血浆与 A 细胞(Ac)、B 细胞(Bc)呈强凝集,与 O 细胞(Oc)和自身细胞(自身 c)均不反应。进一步试验发现,H 抗原表达强度很弱,与正常 Bc 几乎一致(正常 O 型抗-H 凝集

强度 3+,正常 B 型抗-H 凝集强度 1+w/±),与抗-A1、抗-AB 呈 4+凝集,排除 A2 亚型。为排除冷性不规则抗-A 抗体,将反定型试管离心于 37 ℃ 孵育 15 min 后再看结果,与 Ac 和 Bc 仍有凝集。为进一步鉴定是否存在同种抗体干扰血型,进行了抗筛试验,结果在盐水、凝聚胺、抗人球蛋白 3 种介质中均无凝聚、无溶血。以上试验排除了亚型、冷抗体及同种抗体等多因素干扰。

2.2 试剂抗体或抗保养液抗体判断 将反定型试剂细胞经生理盐水洗涤 3 次后配成 2%左右红细胞悬液(此时无保养液)进行血型血清学检测发现反定型 Ac 呈阴性,但换成血型稀释液即保养液后反定型 Ac 呈阳性(有无添加保养液对 Oc 和自身 c 均无影响),见表 1。

表 1 患者血型血清学检测结果

反应条件	抗-A	抗-B	抗-AB	抗-H	抗-A1	A1c	Bc	Oc	自身 c
IS	4+	—	4+	±	4+	2+s	4+	—	—
2IS	4+	—	4+	±	4+	2+s	4+	—	—
3IS	4+	—	4+	±	4+	3+	4+	—	—
37 ℃15 min(IS)	/	/	/	/	2+	3+s	—	—	—
生理盐水洗涤试剂 ABO 细胞 3 次	/	/	/	/	/	0	4+	—	—
加血型稀释液(保养液)	/	/	/	/	/	3+	4+	—	—

注:/代表未做;+代表阳性;±代表肉眼不可见凝块;—代表阴性;IS 代表盐水介质立即离心;2IS 代表第 2 次即刻离心;3IS 代表第 3 次即刻离心。

2.3 多细胞凝集判断 多凝集红细胞抗原是由于各种原因产生膜抗原暴露,从而导致多细胞凝集现象,这与临床疾病、人体免疫机制及红细胞免疫有关。为验证是否为多细胞凝集,整个试验过程参考《AABB 技术手册(第 18 版)》进行,结果见表 2。如果为多细

胞凝集,则用酶处理患者细胞 A 抗原强度大大减弱,而正常 A 型红细胞 A 抗原强度不会减弱,患者红细胞经木瓜酶处理后 A 抗原强度并没有减弱,排除 Tn 多细胞凝集现象,说明正定型为 A 型。根据试验结果,排除多细胞凝集干扰。

表 2 Tn 多细胞凝集试验结果

反应条件	患者红细胞	A 型红细胞	多凝集 A 型红细胞	酶处理患者红细胞	酶处理正常 A 细胞	酶处理多凝集 A 型红细胞
AB 浆	—	—	1+s	/	/	/
试剂抗-A	4+	4+	4+	4+	4+	1+s
人源抗-A	4+	4+	4+	4+	4+	1+

注:/代表未做;+代表阳性;—代表阴性。

2.4 吸收放散试验 第 1 组取 0.3 mL 患者压积红细胞(Pc)与 0.3 mL 等量生理盐水 56 ℃ 放散 10 min;第 2 组取 0.3 mL A 型混合 Pc 加 0.3 mL 患者血清 4 ℃ 吸收 1 h 即刻离心,冷盐水洗涤 6 次,加等量生理盐水 56 ℃ 放散 10 min;第 3 组取 0.3 mL A 型混合 Pc 加 0.3 mL 患者血清及 2 滴血型稀释液(保养液)4 ℃ 吸收 1 h 即刻离心,冷盐水洗涤 6 次,加等量生理盐水 56 ℃ 放散 10 min。试验过程中发现,第 2 组吸收后血浆呈溶血状态,即促发溶血反应并且 A 型红细胞在无保养液的情况下未能吸收抗-A 抗体,所

以吸收后血浆抗-A 呈阳性而放散试验呈阴性。而第 3 组加血型稀释液(保养液)后抗-A 能很好地被 A 细胞吸附,经 56 ℃ 也能很好地放散下来,见表 3。

2.5 不同抗凝剂的溶血率监测分析 在试验过程中发现,不同颜色的标本管溶血程度完全不同,紫管第 2 天出现了肉眼可见的溶血现象。连续 10 d 监测 3 种试管中血浆或血清 FHb 水平,结果见表 4、图 1。其中紫管抗凝剂为乙二胺四乙酸,绿管抗凝剂为枸橼酸钠,红管无抗凝剂。紫管与红管、绿管 FHb 水平比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

2.6 不同介质中 Ac 重悬液的抗体效价测定 取 380 μL 血清加 20 μL 质控液,加 400 μL 2-Me 混合于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中破坏 30 min,离心后取 4 滴破坏液和 1 滴 Ac 混合离心结果为阴性,说明破坏完全且该抗体为 IgM 型抗体。采用倍比稀释测定 IgM 抗体效价,结果见表 5。结果显示,未加保养液的 Ac 和该抗体无凝集反应,加保养液后效价达到 16,至少增强 4 管。

2.7 唾液试验 收集患者唾液离心后用玻璃管煮沸 10 min 再次离心,取上清液备用。同时将抗-A、抗-B、抗-H 稀释调整到 2+ 的凝集强度,标好试管,先加抗-A、抗-B、抗-H 100 μL 到试管中,阴性对照管加 100 μL 生理盐水,测试管加 100 μL 唾液,离心混匀置

4 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 后加 0.8% Ac、Bc 和 Oc,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,结果唾液中检测到 A 物质和 H 物质。进一步对患者红细胞 Lewis 系统抗原进行测定,表现型为 Le(a-b+),结合结果该患者为 A 型分泌型,说明该患者反定型抗体并非抗-ALeb 抗体。

表 3 吸收放散试验结果

组别	吸收后血浆	洗涤最后 一遍上清液	放散液
第 1 组	/	/	—
第 2 组	1+	—	—
第 3 组	—	—	2+w

注:/代表未做;+代表阳性;—代表阴性;每组均+Ac。

表 4 3 种试管中 FHb 水平比较(g/L)

试管	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天	第 9 天	第 10 天
紫管	0.057	0.235	0.584	0.693	0.807	0.912	0.983	1.032	1.080	1.173
绿管	0.038	0.063	0.098	0.121	0.144	0.172	0.189	0.206	0.213	0.241
红管	0.030	0.034	0.039	0.042	0.047	0.053	0.058	0.060	0.062	0.068

表 5 不同介质中 Ac 重悬液的抗体效价测定

反应条件	1	2	4	8	16	32
IS+100 μL 试剂 Ac	2+	1+s	1+	1+w	±	—
IS+100 μL 生理盐水 Ac	—	—	—	—	—	—
IS+100 μL 血型稀释液 Ac	2+w	1+s	1+	1+w	±	—

注:IS 代表盐水介质立即离心;+代表阳性;—代表阴性;±代表肉眼不可见凝块。

2.8 ABO-PCR-SSP 及基因测序 经 ABO-PCR-SSP 及第 6、7 外显子测序,以 A101 作为测序标准序

列,患者第 6、7 外显子未见碱基替换和氨基酸替换,表现型为 A1,基因测序为 ABO * A1.01,见表 6。

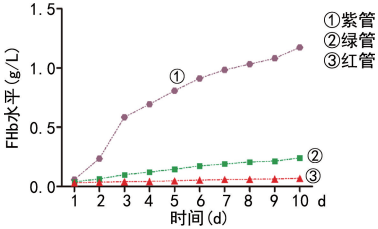
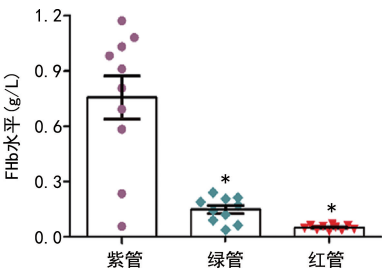


图 1 3 种试管连续监测 10 d FHb 水平比较

表 6 患者 ABO 血型第 6、7 外显子核苷酸序列结果

等位基因	外显子 6		外显子 7										
	261	297	467	526	640	641	646	657	681	700	703	771	796
A101	G	A	C	C	A	T	T	C	G	C	G	C	C
B101	G	G	C	G	A	T	T	T	G	C	A	C	A
O01	Del	A	C	C	A	T	T	C	G	C	G	C	C
患者	G	A	C	C	A	T	T	C	G	C	G	C	C



注:与紫管比较,* $P<0.05$ 。

图 2 3 种试管 FHb 水平比较

3 讨论

类同种抗体指类似于同种抗体性质的自身抗体,但不同于自身抗体。比如 RhD(+)患者血浆中有类同种抗-D,该患者血浆中抗-D 与其他所有人的 RhD(+)红细胞均反应,但与自身红细胞不反应,这应该是同种抗体,但又和同种抗体不一样,所以将这样的抗体定义为“类同种抗体”。抗-A1 有类同种抗-A1 抗体,这种抗体除了不与自身红细胞反应外,能凝集所有 A1 细胞,与疾病、免疫应答和抗体三维结构改变有

关^[6]。抗-A1 还可能受 Rh 相关糖蛋白的影响,有文献报道了 1 例很独特的抗-A1,它只凝集 A 型 RhD+ 细胞,而且这例抗-A1 与 A1D+ 细胞反应强于 A2D+ 细胞,同时这例抗-A1 不与 A1D- 细胞反应,也不与 O 型 D+ 细胞反应^[6-7]。被认为是 Rh 相关蛋白影响了 A1 细胞在不同 RhD(+/-) 时与抗-A1 的反应情况,可能是因为膜外抗原三维构象改变所致^[8]。而抗-A1 有类同种抗体,类同种抗-A1 抗体可存在于 A1 型人血浆中,但与自身 A1 型红细胞不反应,可与其他人 A1 型红细胞反应,这种类同种抗-A1 抗体在理论上属于自身抗体,但其分子生物学结构目前还缺少研究报道。

本病例在鉴定其血型过程中,排除了亚型、冷抗体及同种抗体等多因素的干扰,进一步考虑是否为试剂抗体或者抗保养液抗体导致血型不一致,或存在 Tn 多细胞凝集或异体抗-A 抗体还是抗-A Leb 抗体或抗-HA 抗体或类抗-A1 抗体等多因素,并通过相关血型血清学技术手段一一验证。在试剂抗体或者抗保养液抗体试验过程中发现,患者血浆中存在一种和 A 抗原特异性反应的抗-A 抗体,该抗体可以被红细胞保养液增强,但也很容易被生理盐水洗脱,且亲和力不强。而抗保养液抗体一般反定型 Ac、Bc、Oc 都凝集(室温盐水弱凝集)、与自身 c 不反应、直接抗人球蛋白试验阴性、无冷抗体特性及能排除类同种抗体等特点,排除了并非为抗保养液抗体引起的正反定型血型不一致。同时,随机挑取 3 位健康 A 型献血者和 3 位健康 O 型献血者与本研究的患者进行交叉配血试验,本研究的患者血清与 3 位健康 A 型献血者用生理盐水配置的 2% 红细胞悬液在盐水和抗人球蛋白卡中

均为阴性,而凝聚胺为阳性,这种情况通常发生在弱冷抗体情况下,但弱冷抗体被保养液明显增强的案例少见报道。本研究的患者血清与 3 位健康 O 型献血者用生理盐水配置的 2% 红细胞悬液配血在 3 种介质中均无凝集、无溶血。

总之,ABO 血型鉴定极其重要,若存在正反定型不一致时,非常有必要采用血型血清学和分子生物学相结合的方法进行检测,以确保临床输血安全。

参考文献

[1] 王雅茹,李萌,何婷,等. ABO 血型 B 抗原减弱分子生物学及家系分析[J]. 临床血液学,2021,34(8):583-585.

[2] 袁慧铭,毛韵,刘艳,等. 1 例肝移植输血后产生抗-A1 抗体患者的 ABO 亚型血清分析[J]. 浙江医学,2017,39(9):747-749.

[3] 何鸣镝,许婷婷,沈钢. A1 型患者检测出自身抗-A1 一例[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(23):3271-3272.

[4] FUNG M K, GROSSMAN B J, HILLYER C D, 等. AABB 技术手册[M]. 18 版. 桂嵘,陈秉宇,黄远帅,译. 长沙:中南大学出版社,2019:584-586.

[5] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2015:118-137.

[6] 魏玲,莫春妍,姬艳丽,等. 罕见复合抗体抗-A1 Leb 的鉴定及其特征分析:附 1 例报告[J]. 中国输血杂志,2015,28(6):648-650.

[7] 杰夫·丹尼尔. 人类血型[M]. 2 版. 朱自严,译. 北京:科学出版社,2007:27-28.

[8] 刘素芳,苗天红,范道旺,等. A 型血肝移植患者产生抗-A 1 例[J]. 中国输血杂志,2012,25(3):278.

(收稿日期:2022-02-13 修回日期:2022-06-18)

(上接第 2549 页)

[J]. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi,2005,26(11):907-910.

[17] LEE S Y, KIM M J, KANG H G, et al. Polymorphisms in matrix metalloproteinase-1, -9 and -12 genes and the risk of chronic obstructive pulmonary disease in a Korean population [J]. Respiration,2010,80(2):133-138.

[18] BCHIR S, NASR H B, ANES A B, et al. MMP-2 (-1306 C/T) polymorphism affects serum matrix metalloproteinase (MMP)-2 Levels and correlates with chronic obstructive pulmonary disease severity:a case-control study of MMP-1 and -2 in a tunisian population [J]. Mol Diagn Ther,2016,20(6):579-590.

[19] VOGELMEIER C F, CRINER G J, MARTINEZ F J, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. GOLD executive summary [J]. Am J Respir Crit Care Med,2017,195(5):557-582.

[20] GONG H, REN J, XU J, et al. SMAD3 rs36221701 T>C

polymorphism impacts COPD susceptibility in the Kashi population[J]. Gene,2022,808:145970.

[21] WANG K, LI M, HAKONARSON H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data [J]. Nucleic Acids Res,2010,38(16):e164.

[22] JOHNSON S R. Untangling the protease web in COPD: metalloproteinases in the silent zone[J]. Thorax,2016,71(2):105-106.

[23] GHARIB S A, MANICONE A M, PARKS W C. Matrix metalloproteinases in emphysema [J]. Matrix Biol,2018,73:34-51.

[24] HERNANDEZ-MONTOYA J, PEREZ-RAMOS J, MONTANO M, et al. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and protein levels in chronic obstructive pulmonary disease in a Mexican population [J]. Biomark Med,2015,9(10):979-988.

(收稿日期:2022-01-12 修回日期:2022-05-20)