

- always Tuberculosis: a case of pulmonary cryptococcosis in an immunocompetent child in Uganda[J]. Afr Health Sci, 2021, 21(3): 990-994.
- [2] LIU K, DING H, XU B, et al. Clinical analysis of non-AIDS patients pathologically diagnosed with pulmonary cryptococcosis[J]. J Thorac Dis, 2016, 8(10): 2813-2821.
- [3] ZHANG J, ZHANG D, XUE X, et al. Clinical analysis of 16 cases of pulmonary cryptococcosis in patients with normal immune function[J]. Ann Palliat Med, 2020, 9(3): 1117-1124.
- [4] BOAZ M M, KALLUVYA S, DOWNS J A, et al. Pattern, clinical characteristics, and outcome of meningitis among HIV-infected adults admitted in a tertiary hospital in north western Tanzania: a cross-sectional study[J]. J Trop Med, 2016, 2016: 6573672.
- [5] YAO K, QIU X, HU H, et al. Pulmonary cryptococcosis coexisting with central type lung cancer in an immunocompetent patient: a case report[J]. Clin Case Rep, 2015, 3(9): 749-752.
- [6] JARVIS J N, WAINWRIGHT H, HARRISON T S, et al. Pulmonary cryptococcosis misdiagnosed as smear-negative pulmonary tuberculosis with fatal consequences[J]. Int J Infect Dis, 2010, 14(Suppl 3): 310-312.
- [7] GUNDA D W, BAKSHI F A, RAMBAU P, et al. Pulmonary cryptococcosis presenting as acute severe respiratory distress in a newly diagnosed HIV patient in Tanzania: a case report[J]. Clin Case Rep, 2015, 3(9): 749-752.
- [8] ZHAN Y, LU C, LI S, et al. Successful management of mixed mycosis in HIV-negative patients with different immune status: a case series report[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 851891.

(收稿日期:2022-04-22 修回日期:2022-11-20)

• 个案分析 •

1例疑难血型的血清学和基因定型处理体会

李雪晨,王加勇[△],陆紫敏,方 琦,郑 浩,周 涛,丁 蔚
同济大学附属同济医院输血科,上海 20065

关键词:抗-M 抗体; 抗原减弱; 血清学检测;

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.03.027

文章编号:1673-4130(2023)03-0382-03

聚合酶链反应-序列特异性引物

中图法分类号:R446.6

文献标志码:C

输血在临床救治患者中起着关键作用,血型鉴定正确是保证临床输血安全的重要前提。患者在输血前进行血型鉴定,通过正反定型一致确保 ABO 血型准确,但病理条件下,尤其是恶性血液病患者,血型抗原缺失或表达减弱,会发生血型鉴定困难^[1]。抗-M 是 MSN 血型系统常见抗体,抗-M 会引起 ABO 血型鉴定困难与交叉配血不合,影响输血^[2]。本实验室使用血型血清学和聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)方法处理了 1 例同时存在上述 2 种情况的患者,报道如下。

1 资料与方法

1.1 病历资料 患者,女,65岁,汉族,因头晕乏力,胸闷气促,于 2021 年 11 月 8 日夜间到本院急诊内科就诊。患者在外院确诊为多发性骨髓瘤 1 年半,重度贫血貌,胸闷,明显气促,心率 114 次/min,显著增快,双肺呼吸音粗,左侧呼吸音减弱,行胸部 CT 检查提示双肺感染。急诊查血常规,白细胞计数(WBC)为 $3.05 \times 10^9/L$, 血红蛋白浓度(Hb)为 31 g/L, 红细胞计数(RBC)为 $1.02 \times 10^{12}/L$, 血小板计数(PLT)为 $52 \times 10^9/L$, 患者严重贫血,急诊申请输注红细胞悬液 4 个单位。因患者 ABO 血型鉴定正反定型不一致,

患者急需输血,输血科启动紧急用血应急预案进一步处理。

1.2 仪器与试剂 ABO/Rh(D) 血型定型检测卡(西班牙 GRIFOLS, 批号 21007.01), 不规则抗体筛选卡(西班牙 GROFOLS, 批号 21094.01), 凝聚胺试剂(珠海贝索, 批号 A201205), 抗 A/抗 B 血型定型试剂(长春博得, 批号 20210605), RhD(IgM) 血型定型试剂(长春博得, 批号 SY20210201), 抗人球蛋白(抗 IgG, C3d) 检测试剂(上海血液生物, 批号 20205001), ABO 血型反定型试剂(红细胞, 长春博得, 批号 20210920), 不规则抗体检测试剂(红细胞, 长春博得, 批号是 20210918), 抗体鉴定谱细胞(上海血液生物, 批号 20210924), 抗-M、抗-N 血型定型试剂(上海血液生物, 批号 20210608), 红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒(天津秀鹏生物, 202004001), 核酸提取或纯化试剂(天津秀鹏生物, 202108003), PCR 仪(杭州博日, Life ECO), 核酸电泳仪(北京君意, JY300C), 核酸成像分析仪(北京君意, JYO2S), 全自动配血及血型分析仪(西班牙 GRIFOLS, WADiana), 细胞洗涤离心机(日本久保田, KA-2200), 离心机(日本久保田, 2420 型), 三用电热恒温水箱(常州翔天, XMTD-204), 冰箱(青

岛 Haier, HYCD-205)。

1.3 方法

1.3.1 PCR-SSP 法检测 患者签署同意书后, 取新鲜 EDTA 抗凝全血 2 mL, 用核酸提取或纯化试剂从全血中提取 DNA, 采用紫外分光光度计检测 DNA 含量为 20.39 ng/μL, A_{260}/A_{280} 比值为 1.76。采用 PCR-SSP 法检测 ABO 血型基因, PCR 反应体系总体积 120.9 μL, 其中 0.9 μL Taq 酶(5 units/μL), 10 μL DNA(22 ng/μL), 110 μL dNTP-Buffer 工作液, 分别向红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒的引物孔(1~11孔)中各加入 10 μL 上述混合液。调整好反应程序, 置 Life ECO 型 PCR 仪上进行扩增。PCR 反应条件为: 在 96 °C 预变性 2 min, 进入循环扩增阶段, 96 °C 20 s, 68 °C 60 s, 循环 5 次; 96 °C 20 s, 65 °C 45 s, 72 °C 30 s, 循环 10 次; 96 °C 20 s, 62 °C 45 s, 72 °C 30 s, 循环 15 次; 72 °C 3 min; 最后在 4 °C 条件下保存。将 PCR 产物转移至 2.5% 琼脂糖凝胶孔中, JY300C 核酸电泳仪电泳 15 min, 在 JYO2S 核酸成像分析仪下观察条带结构, 依据结果分型表判断血型检测结果。

1.3.2 血清学试验 ABO/Rh 血型鉴定、不规则抗体筛查采用微柱凝胶卡法和试管法, 抗体鉴定谱细胞检测采用试管法, 交叉配血联合采用盐水试管法、聚凝胺法和抗球蛋白柱凝集法, Rh 分型、直接抗人球蛋白试验(DAT)结果为阴性。

白试验(DAT)采用试管法。实验操作均按照标准操作规程执行^[3]。

1.3.3 吸收试验 将 3 人份 O 型 Rh 阳性 MN 表型为 MM 的献血员红细胞混合, 用生理盐水将上述红细胞洗涤 3 次, 取 1 mL 压积红细胞, 加入等量患者血清, 4 °C 吸收 2 h, 每 30 min 摆动 1 次, 用离心获得的患者血清吸收液进行 ABO 血型鉴定。

2 结 果

2.1 血型鉴定与抗体筛查 患者 ABO 血型鉴定结果见表 1, 正定型结果为 Aweak, 反定型结果为 O 型, 试管法反定型在显微镜下可见 A1 红细胞凝集, 加生理盐水后凝集未散开, 正反定型结果不一致; 患者 Rh 血型是 DCCEe。患者血浆与抗体筛查细胞 I 和筛查细胞 II 凝集, 结果见表 2。患者红细胞做直接抗球蛋白试验(DAT)结果为阴性。

表 1 患者 ABO 血型鉴定正反定型结果

实验项目	正定型				反定型			
	抗-A	抗-B	A1c	Bc	Oc	自身		
微柱凝胶法	1+	—	1+	4+	—	—		
试管法(IS)	1+	—	1+	4+	—	—		
试管法(37 °C)	1+	—	1+	4+	—	—		

注: + 为凝集; - 为均匀散在。

表 2 患者不规则抗体筛查结果

	Rh-hr					Kidd			MNS			Duffy		Kell		Lewis		P	微柱
	D	C	E	c	e	JKa	JKb	M	N	S	s	Fya	Fyb	K	k	Lea	Leb	P1	凝胶法
I	+	+	—	—	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—	+	—	+	—	1+
II	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—	1+
III	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	+	+	—	—	+	+	+	+	—

注: + 为凝集; - 为均匀散在。

2.2 PCR-SSP 法检测 ABO 基因分型结果见图 1, 患者基因型为 AO1, 表型为 A 型。



图 1 PCR-SSP 法检测 ABO 基因分型结果

2.3 抗体鉴定 患者血清与抗体鉴定谱细胞反应, 格局为 1、2、5、6、8 和 10 号细胞均 1+, 3、4、7 和 9 号

细胞均阴性, 自身红细胞对照阴性。对照谱细胞试剂盒(上海血液生物, 批号 20210924)抗原格局表, 判定患者体内存在抗-M 抗体。红细胞血型抗体鉴定细胞反应格局表见表 3。

2.4 吸收试验 冷吸收后患者 ABO 血型鉴定试管法结果见表 4, ABO 血型为 A 型, 正反定型一致, 证实抗-M 抗体存在。

表 3 红细胞血型抗体鉴定细胞反应格局表

序号	Rh-hr					Kidd		MNS					Duffy		Diego		Kell		Lewis		P	DO	Yt		
	D	C	E	c	e	JKa	JKb	M	N	S	s	Mur	Fya	Fyb	Die	Dib	K	k	Lea	Leb	P1	DOa	DOB	Yta	Ytb
1	+	0	+	+	0	+	+	+	0	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	/	/	/	/
2	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	/	0	+	+	+	+	/	/	/	/
3	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	/	0	+	+	+	0	/	/	/	/
4	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	/	0	+	0	+	+	/	/	/	/
5	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	0
6	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0	/	0	+	0	+	0	/	/	/	/

续表3 红细胞血型抗体鉴定细胞反应格局表

序号	Rh-hr				Kidd		MNS				Duffy		Diego		Kell		Lewis		P	DO		Yt			
	D	C	E	c	e	JKa	JKb	M	N	S	s	Mur	Fya	Fyb	Dia	Dib	K	k	Lea	Leb	P1	DOa	DOB	Yta	Ytb
7	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	/	0	+	0	0	0	/	/	/	/
8	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	0	/	0	+	0	0	/	/	/	/
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0
10	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	/	/	/	/

注: /表示无数据。

表4 冷吸收后患者ABO血型鉴定结果

反应条件	正定型		反定型			
	抗-A	抗-B	A1c	Bc	Oc	自身
IS	1+	-	-	4+	-	-
4 °C	1+	-	-	4+	-	-
37 °C	1+	-	-	4+	-	-

注: +为凝集; -为均匀散在。

2.5 交叉配血 与4个单位M抗原阴性的A型Rh分型为DCCee的红细胞做交叉配血试验,主侧和次侧在盐水、凝聚胺及抗球蛋白介质中均无聚集,无溶血。患者当天夜间输注上述4U去白细胞悬浮红细胞后,血红蛋白由输血前31 g/L上升到60 g/L,红细胞计数由输血前 $1.12 \times 10^{12}/L$ 上升到 $2.17 \times 10^{12}/L$,证明输血有效。

3 讨 论

在临床输血治疗过程中,正确的血型鉴定是确保输血安全的首要条件。近年来,分子生物学法在ABO疑难血型鉴定中被广泛应用^[4]。开展疑难ABO血型基因分型检测,与血清学鉴定技术相结合,可以快速、准确地鉴定出疑难ABO血型,顺利解决疑难血型鉴定的问题。

该患者的血型鉴定试验中,反定型试管法A1c、Oc在不同温度条件下凝集强度一致,排除是由于冷凝集素干扰引起的正反定型结果不一致^[5]。该病例为多发性骨髓瘤患者,考虑可能存在大量异常血浆蛋白干扰,反定型A1c加1滴0.9%生理盐水混匀,在显微镜镜下观察凝集未消失,排除是由于血浆蛋白异常引起的假凝集^[6]。该病例与A亚型的血清学典型特征类似,正定型中红细胞与抗-A发生弱凝集(+),在反定型中与健康者的A1红细胞发生弱凝集(+1),疑似为A亚型^[7],本实验室选择PCR-SSP法检测ABO血型基因。

该患者ABO基因分型为AO1,表型为A型,可排除ABO亚型,患者正定型结果为Aweak,有文献报道,ABO抗原减弱常见于恶性白血病,尤其在急性髓细胞白血病多见,其次是骨髓增生异常综合征,与本病例相符^[8]。该患者血清只与抗体筛查细胞I、II反应凝集,不是与3个抗体筛查细胞均反应凝集,且患

者直接抗球蛋白试验结果为阴性,可排除是由于自身抗体存在造成的血型定型困难^[9]。本实验室选择对患者进行抗体鉴定,依据谱细胞筛查结果,判定患者体内存在抗-M抗体。虽然患者反定型中未出现O细胞凝集现象,但吸收试验结果证实了抗-M抗体的存在,也有效消除抗-M抗体对血型鉴定的干扰,确认患者ABO血型为A型,给患者输注4单位M抗原阴性的A型悬浮红悬液后,患者红细胞总数和血红蛋白均上升,输血有效。

本实验室认为输血科在临床输血实践中,开展血型基因分型检测,可以作为血清学方法的有效补充,能在疑难血型的诊断中发挥重要作用,也能大大减少急诊患者用血等待时间,为临床输血二级学科发展注入动力,保障临床用血安全、合理、有效。

参考文献

- [1] TINA B, BELINDA J, FARMER, et al. Loss of red cell A, B, and H antigens is frequent in myeloid malignancies [J]. Blood, 2001, 97: 3633-3639.
- [2] 蒋绍玮,李秀萍,王秀菊,等.抗M引起血型正反鉴定不符1例[J].临床血液学杂志,2013,26(6):435-436.
- [3] 尚红,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].第4版.北京:人民卫生出版社,2015:127-129.
- [4] 肖莉,后平钦,李国良. PCR-SSP法在ABO疑难血型鉴定中的应用[J].实验与检验医学,2013,31(5):444-445.
- [5] 车进,张燕华,麻静敏,等.献血者高效价冷自身抗-I引起的血液外观变化及血清学研究[J].中国输血杂志,2016,29(1):61-63.
- [6] 盛梅芳,朱辉,王长奇,等.4例ABO正反定型不一致原因分析[J].实验与检验医学,2020,38(5):1027-1029.
- [7] 周晔,林艳,蒋天舒,等.57例多发性骨髓瘤引起ABO血型鉴定异常的原因及对策[J].中国输血杂志,2015,28(9):1110.
- [8] 朱剑英,胡利亚,兰炯才,等.骨髓增生异常综合征ABO血型鉴定观察[J].临床血液学杂志,2007,20(4):173-174.
- [9] 夏荣,张琦,陈勤奋.自身免疫性溶血性贫血患者输血前试验及临床输血专家共识[J].中国输血杂志,2017,30(7):663-665.