

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 and literature review[J]. BMC pulmonary medicine, 2020, 20(1):161.

[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, 丁懿
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),不规则抗体筛检卡(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

[△] 通信作者, E-mail:576978380@qq.com.

岛 Haier, HYCD-205)。

1.3 方法

1.3.1 PCR-SSP 法检测 患者签署同意后,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/ μ L, A₂₆₀/A₂₈₀ 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 μ L,其中 0.9 μ L Taq 酶(5 units/ μ L),10 μ L DNA(22 ng/ μ L),110 μ L 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 μ L 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 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,进入循环扩增阶段,96 $^{\circ}$ C 20 s,68 $^{\circ}$ C 60 s,循环 5 次;96 $^{\circ}$ C 20 s,65 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,循环 10 次;96 $^{\circ}$ C 20 s,62 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,循环 15 次;72 $^{\circ}$ C 3 min;最后在 4 $^{\circ}$ 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)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 $^{\circ}$ C 吸收 2 h,每 30 min 摇动 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 $^{\circ}$ 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	Dia	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	Pl	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	/	/	/	/
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0
10	+	+	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			自身
	抗-A	抗-B	A1c	Bc	Oc	
IS	1+	—	—	4+	—	—
4 ℃	1+	—	—	4+	—	—
37 ℃	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 4 U 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 1.12×10¹²/L 上升到 2.17×10¹²/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(+1),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 Hantigens is frequent in myeloid malignancies [J]. Blood,2001,97:3633-3639.

[2] 蒋绍伟,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] 朱剑荣,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.