

补体 C₃d 对抗人球蛋白交叉配血的影响及处理分析^{*}

孙长杰¹ 霍姿含¹ 刘冰¹ 李凌波²

[摘要] **目的:**分析临床患者交叉配血试验中使用不同抗人球蛋白试剂结果不一致的因素,为临床出现抗人球蛋白法疑难配血提供借鉴及处理对策。**方法:**采用广谱及单特异性抗人球蛋白检测卡对患者进行血清学检测,并应用不同抗人球蛋白试剂进行试管法复查,其中交叉配血试验将患者血清 56℃ 30 min 处理后再进行卡式法及试管法验证。**结果:**2 例患者样本均为使用单特异性抗-IgG 试剂配血相合,使用广谱及抗-C₃d 试剂配血不合。且患者血清经 56℃ 30 min 处理后使用不同试剂均配血相合。**结论:**结合患者临床病例资料,证实 2 例样本均是由血清中补体 C₃d 成分对使用广谱试剂的抗人球蛋白配血试验造成干扰,可给予单特异性抗-IgG 试剂下配血相合血液输注,以改善其贫血症状。

[关键词] 补体;交叉配血;抗-IgG;抗-C₃d

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2017.08.002

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Effect of complement C₃d on antihuman globulin crossmatch and its management

SUN Changjie¹ HUO Zihan¹ LIU Bin¹ LI Lingbo²

(¹Department of Blood Transfusion, First Hospital, Jilin University, Changchun, 130021, China; ²Changchun Bioxun Biotechnology Limited Company)

Corresponding author: LIU Bing, E-mail: liubing1204@163.com; LI Lingbo, E-mail: lilingbo@bioxun.com

Abstract **Objective:** To analyze the factors that result in inconsistent results in clinical patients' blood cross-matching test using different anti-human globulin reagents, and provide reference and countermeasure for the clinical emergence of difficulty in blood cross-matching test in anti-human globulin method. **Method:** The patients were serologically tested with broad-spectrum and monospecific anti-human globulin test cards, and the serum of the patients which were inconsistent in blood cross-matched test was treated at 56℃ for 30 minutes, and then verification tests were performed using different anti-human globulin reagents. **Result:** Two patients were consistent with monospecific anti-IgG reagent but inconsistent with broad-spectrum or anti-C₃d reagent in blood cross-matched test, and both patients were consistent with different reagents after the serum was treated at 56℃ for 30 minutes. **Conclusion:** Combined with the clinical data of both patients, it was confirmed that the two samples which were inconsistent in blood cross-matching test were caused by the complement C₃d components in the serum which might cause interference in blood cross-matching test using broad-spectrum anti-human globulin reagent, and the blood which was consistent in blood cross-matching test with monospecific anti-IgG reagent could be used for blood transfusion to improve the anemia symptoms of the patients.

Key words complement; crossmatch; anti-IgG; anti-C₃d

抗人球蛋白试剂主要有广谱和单特异性的区分,广谱抗人球蛋白试剂主要含有抗-IgG 和抗补体 C₃d 成分,单特异性抗人球蛋白试剂为含有某一种抗人球蛋白成分,例如抗-IgG、抗-C₃d 等^[1]。临床上最有意义的抗体是 IgG,用含抗补体活性的广谱

抗人球蛋白试剂做输血相容性相关的交叉配血等试验曾引起广泛争议^[2-4]。国内外诸多研究表明^[4-6],应用抗人球蛋白试验进行输血相容性检测如应用多特异性的广谱抗人球蛋白试剂,由于其所含有的抗补体成分影响会导致无意义的阳性反应,造成配血困难。近期我们发现使用广谱抗人球蛋白试剂(抗-IgG+抗-C₃d)与单特异性抗-IgG 试剂进行交叉配血试验结果不一致病例 2 例,经血型血清学试验并结合患者临床病例资料,证实 2 例样本均是由血清中被激活的补体 C₃d 成分对配血造成

^{*}基金项目:吉林省科技发展计划资助项目(No: 20150307011YY)

¹吉林大学第一医院输血科(长春,130021)

²长春博迅生物技术有限责任公司

通信作者:刘冰, E-mail: liubing1204@163.com; 李凌波, E-mail: lilingbo@bioxun.com

干扰,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

患者 1,女,57 岁,2016 年 5 月 5 日因“头晕、乏力、咳嗽伴腰背部疼痛 1 个月”入院,既往无输血史、药物过敏史、预防接种史及接触放射物质病史,否认家族性遗传病,临床诊断为“IgG 型多发性骨髓瘤”,5 月 8 日申请 B 型悬浮红细胞 2 U,输血前检查:WBC 8.26×10⁹/L,RBC 1.91×10¹²/L,Hb 56 g/L,C-反应蛋白 75 mg/L,IgG 6.5 g/L,总蛋白 107 g/L,白蛋白 32 g/L,球蛋白 55 g/L,A/G 0.58。

患者 2,男,75 岁,2016 年 5 月 25 日因“腹痛 1 月余,加重 7 d”入院,既往无输血史、食物药物过敏、外伤史,无传染病及预防接种史,否认高血压、糖尿病、肝炎、结核病史,临床诊断“弥漫性腹膜炎、右侧胸腔积液”,患者于入院当日行腹腔脓肿清除、右半结肠切除手术,5 月 30 日申请 A 型悬浮红细胞 2 U,输血前检查:WBC 6.58×10⁹/L,RBC 2.94×10¹²/L,Hb 65 g/L,C-反应蛋白 100 mg/L,总蛋白 43.1 g/L,白蛋白 22 g/L,球蛋白 45 g/L,A/G 0.49。

患者 1、2 均随机选取多名同型献血员血液进行交叉配血,发现 2 例样本应用广谱(抗-IgG、抗-C₃d)抗人球蛋白卡均主、次侧不相合,患者 1 主侧凝集强度±~1+、次侧±,患者 2 主侧强度 1+~2+、次侧 1+;盐水法均相合。遂对 2 例患者血样进行复查及进一步检测分析。

1.2 试剂与仪器

ABODE 血型检测卡(批号 20151101),抗人球蛋白检测卡(抗-IgG,批号 20160102),ABO 血型反定型试剂盒(批号 20160307),不规则抗体检测试剂(批号 20160401),均由长春博迅生物技术有限责任公司提供;DG Gel Coombs 卡(抗-IgG、抗-C₃d,批号 15110.01),由西班牙 Diagnostic Grifols,S. A 公司提供;单克隆抗 A、抗 B(批号 20151225),IgM 抗 D(批号 20151816),IgM 抗 E(批号 20163201),抗人球蛋白(抗 IgG、C₃d)检测试剂盒(批号 20155001),直接抗人球蛋白试剂盒(抗 IgG,批号 20155101),直接抗人球蛋白试剂盒(抗 C₃d,批号 20155201),红细胞血型抗体鉴定谱细胞(批号 20160304),均由上海血液生物医药有限责任公司提供。TD-A 型血型血清学用离心机、FYQ 型免疫微柱孵育器由长春博研科学仪器有限责任公司生产;DG-230 Diana fuge 离心机、DG-230 Incubado 孵育器由西班牙 Diagnostic Grifols,S. A 公司生产;LDZ4-1.2 低速自动平衡离心机由北京雷勃尔离心机有限公司生产;DK-S600 型电热恒温水槽由上海申贤恒温设备厂生产。

1.3 方法

患者血型鉴定采用微柱凝胶卡式法并用试管法复查;交叉配血、不规则抗体筛查和鉴定、放散试验均使用 DG Gel Coombs 卡(抗-IgG、抗-C₃d)及抗人球蛋白检测卡(抗-IgG)进行,并采用盐水、广谱抗人球蛋白试剂、单特异性抗-IgG 试剂、单特异性抗-C₃d 试剂 4 种介质下的试管法进行复查,其中患者血清经 56℃ 30 min 后再进行卡式法及 4 种介质下的试管法交叉配血试验验证;直抗试验采用广谱抗人球蛋白试剂、单特异性抗-IgG 试剂、单特异性抗-C₃d 试剂 3 种介质的试管法试验。以上试验中试剂卡均按说明书操作及判读,试管法操作及判读均参考文献[7]。

2 结果

2.1 血型鉴定

患者 1:B 型 RhD 阳性、RhE 阳性;患者 2:A 型 RhD 阳性、RhE 阳性。患者 1、2 均正反定型相符,以试管法复查与卡式法一致,结果见表 1~2。

表 1 患者血型鉴定反应格局(卡式法)

	抗-A	抗-B	抗-D	抗-E	A ₁ c	Bc
患者 1						
37℃	0	4+	4+	4+	4+	0
4℃	0	4+	4+	4+	4+	0
室温	0	4+	4+	4+	4+	0
患者 2						
37℃	4+	0	4+	4+	0	4+
4℃	4+	0	4+	4+	0	4+
室温	4+	0	4+	4+	0	4+

注: + 代表凝集, 0 代表阴性。

表 2 患者血型鉴定反应格局(试管法)

	抗-A	抗-B	抗-D	抗-E	A ₁ c	Bc	Oc	自身 c
患者 1								
37℃	0	4+	4+	4+	4+	0	0	0
4℃	0	4+	4+	4+	4+	0	0	0
室温	0	4+	4+	4+	4+	0	0	0
患者 2								
37℃	4+	0	4+	4+	0	4+	0	0
4℃	4+	0	4+	4+	0	4+	0	0
室温	4+	0	4+	4+	0	4+	0	0

注: + 代表凝集, 0 代表阴性。

2.2 直接抗人球蛋白试验

患者 1、2 试管法直抗试验均在广谱抗人球蛋白试剂、单特异性-C₃d 试剂 2 种介质下有凝集,在单特异性抗-IgG 试剂介质下无凝集。结果见表 3。

表 3 患者直接抗人球蛋白试验结果

	抗-IgG+C ₃ d	抗-IgG	抗-C ₃ d
患者 1	1+	0	1+
患者 2	2+	0	2+

注: +代表凝集, 0 代表阴性。

2.3 交叉配血

患者 1、2 交叉配血试验在广谱抗人球蛋白试剂、单特异性-C₃d 试剂 2 种介质下均有凝集, 在盐水、单特异性抗-IgG 试剂 2 种介质下无凝集、无溶血。结果见表 4~5。患者 1、2 血清经 56℃ 30 min 后再进行卡式法及 4 种介质下的试管法交叉配血试验主次侧均无凝集反应, 无溶血。

表 4 患者交叉配血试验结果(卡式法)

	抗-IgG+C ₃ d	抗-IgG
患者 1		
主侧	1+	0
次侧	±	0
患者 2		
主侧	2+	0
次侧	1+	0

注: +代表凝集, 0 代表阴性。

表 5 患者交叉配血试验结果(试管法)

	抗-IgG+C ₃ d	抗-IgG	抗-C ₃ d	盐水
患者 1				
主侧	1+	0	1+	0
次侧	±	0	±	0
患者 2				
主侧	2+	0	2+	0
次侧	1+	0	1+	0

注: +代表凝集, 0 代表阴性。

2.4 不规则抗体筛查和鉴定

患者 1、2 血清不规则抗体筛查在广谱抗人球蛋白试剂、单特异性-C₃d 试剂 2 种介质下均有凝集, 在盐水、单特异性抗-IgG 试剂 2 种介质下均无凝集、无溶血, 结果见表 6~7。患者 1、2 血清与 1~10 号谱细胞及自身细胞在广谱抗人球蛋白试剂、单特异性-C₃d 试剂 2 种介质下均有凝集, 在盐水、单特异性抗-IgG 试剂 2 种介质下均无凝集、无溶血, 表明患者 1、2 血清中不存在同种抗体, 阳性凝集反应系由血清中被激活的补体 C₃d 成分所致。

2.5 放散试验

应用不规则抗体检测试剂对患者 1、2 放散液进行检测, 患者 1、2 放散液均在广谱抗人球蛋白试剂、单特异性-C₃d 试剂 2 种介质下有凝集, 在盐水、单特异性抗-IgG 试剂 2 种介质下均无凝集、无溶

血, 进一步证实患者红细胞上仅致敏了补体 C₃d 成分。

表 6 患者不规则抗体筛查试验结果(卡式法)

	抗-IgG+C ₃ d	抗-IgG
患者 1		
I	1+	0
II	1+	0
III	1+	0
患者 2		
I	2+	0
II	2+	0
III	1+	0

注: +代表凝集, 0 代表阴性。

表 7 患者不规则抗体筛查试验结果(试管法)

	抗-IgG+C ₃ d	抗-IgG	抗-C ₃ d	盐水
患者 1				
I	1+	0	1+	0
II	1+	0	1+	0
III	±	0	±	0
患者 2				
I	1+	0	1+	0
II	1+	0	1+	0
III	1+	0	1+	0

注: +代表凝集, 0 代表阴性。

3 讨论

间接抗球蛋白试验(indirect antiglobulin test, IAT)是公认的交叉配血方法, 临床应用 IAT 的交叉配血及不规则抗体筛查等试验的目的是检测临床有意义抗体, 临床有意义抗体一般指: 引起新生儿溶血病、溶血性输血反应, 或者使输入的红细胞存活期减少的在 37℃ 反应的同种异型抗体^[8]。如英国血液学标准委员会(British Committee for Standards in Haematology, BCSH)规定“如果患者血浆中含有(或既往曾有)临床可能有意义的红细胞抗体, 则须使用 IAT 法作交叉配血”, 且在确定了受血者与献血者 ABO 同型条件下(盐水法配血相合)“IAT 交叉配血目的是检出 IgG 抗体导致的不相合”^[9]。在使用 IAT 进行交叉配血时, 一些亲和力弱的抗体、冷抗体、自身抗体、药物依赖性抗体等与红细胞反应后, 本身易自膜上脱落, 只留下与红细胞膜牢固结合的补体成分, 残存在膜上的补体 C₃ 不是有生物活性的 C₃b, 而是无活性的 C₃d。此时应用多特异性抗球蛋白试剂(抗-IgG、抗-C₃d)能够得到阳性结果, 而应用单特异性试剂(抗-IgG)为阴性结果, 在不能排除补体影响试验的情况下, 此种交叉配血结果的不一致常给疑难配血的鉴定工作带来困扰, 易贻误输血时机。

本文报道的2例患者通过对其样本血型血清学的进一步检查发现,患者1、2的不规则抗体筛查鉴定及交叉配血(卡式法、试管法)、直抗(试管法)均出现在广谱抗人球蛋白试剂、单特异性-C₃d试剂2种介质下有凝集,在单特异性抗-IgG试剂介质下无凝集,且将2例患者血清经56℃30 min后再进行全部介质下的试管法交叉配血试验主次侧均无凝集反应;结合对患者放散液的检测均证实2例患者样本红细胞上不存在IgG类自身抗体,血清中不存在IgG类同种抗体、冷抗体及药物抗体(试剂红细胞未致敏药物抗原),为被激活的补体C₃d成分导致的IAT交叉配血试验使用多特异性广谱抗人球蛋白试剂(含抗-IgG和抗-C₃d)出现干扰,造成配血困难。有研究分析61例疑难交叉配血,此种补体C₃影响造成的交叉配血假阳性结果占14.75%(9/61)^[4]。

C₃d是补体系统的核心C₃(补体第三组分)最终裂解的产物,是一种稳定的补体激活标志,可共价与抗原结合,并能通过补体受体CR2结合B淋巴细胞促进后者的活化,因C₃d本身不具有活性,对人体也不具免疫原性,近年来被用作新型分子佐剂以提高疫苗的抗体效价、亲和性等^[10-11]。C₃d是不能再被酶解的最小片段,多年来的研究证实C₃d是红细胞免疫黏附作用的最终降解产物^[12],当外来抗原(病毒、细菌、癌细胞等)进入血液后,机体产生大量的免疫复合物(IC),IC首先激活补体系统,黏附上补体C₃b,被红细胞补体受体(CD35)分子作用后,降解为C₃d,红细胞通过与抗原-抗体-补体复合物结合将其运送至肝脾固定吞噬系统,IC从红细胞上解离并被吞噬细胞吞噬清除。而残留下的补体C₃d成分继续附着于红细胞膜上,不涉及特异性抗原抗体反应的补体附着于红细胞膜的机制称为补体包被^[13],致使用广谱抗球蛋白试剂的IAT出现无意义阳性,导致配血困难、干扰抗体筛查和特异性鉴定。本文2例患者出现唯使用广谱抗球蛋白试剂阳性,在排除前述亲合力弱的抗体、冷抗体、自身抗体、药物依赖性抗体等因素,分析其二者红细胞唯有C₃d包被的原因可能由疾病因素导致。患者1临床诊断为“IgG型多发性骨髓瘤”,伴有贫血、肺部感染,C-反应蛋白75 mg/L,该病特征是骨髓中克隆性浆细胞异常增生,并分泌大量单克隆免疫球蛋白,其血浆中异常增多的免疫球蛋白常常干扰输血前试验,可造成卡式法交叉配血的异常凝集,一般认为使用间接抗球蛋白试管法进行检测可排除干扰^[14],本例患者1交叉配血试验在广谱抗人球蛋白试剂的试管法试验下仍为阳性结果,可知并非异常免疫球蛋白干扰造成;患者2临床诊断“弥漫性腹膜炎”,伴有发热,体温最高39℃,C-反应蛋白100 mg/L。考察2例患者,均伴有C-反应蛋

白的异常增高,其是一种急性时相性蛋白,健康人血清中浓度很低,当细菌感染引起炎症或组织损伤、术后其浓度显著升高,不易受贫血、药物等因素影响,且在包括多发性骨髓瘤在内的多种肿瘤疾病及细菌性腹膜炎中都有不同程度的增高^[15-16]。研究显示^[17]C-反应蛋白能激活补体系统,调理外来病原体,增强细胞的吞噬作用,还可以作为抗菌分子及炎症标记物,在炎症反应中发挥作用。推测2例患者受外来抗原刺激致C-反应蛋白异常增高,C-反应蛋白激活补体系统,导致大量免疫复合物沉积并黏附补体C₃b,最终降解为C₃d附着于红细胞膜,造成唯广谱抗人球蛋白试剂IAT试验阳性结果,研究认为这还与使用了枸橼酸抗凝的新鲜血液有关(本文2例样本均为枸橼酸抗凝),枸橼酸可以不破坏补体分子,使血液中的固有免疫系统和适应免疫系统保持完整^[18]。2患者血样经进行复查及进一步检测分析后,分别给予单特异性抗-IgG试剂介质下无凝集的配血相合同型悬浮红细胞各2 U,输血过程无不良反应发生。患者1于输血后第2天、患者2于输血后第2及第4天各自再分别申请悬浮红细胞各2 U,2患者均在最后一次输注同型悬浮红细胞后复查血常规,患者1、患者2 Hb分别升至85 g/L、100 g/L,贫血症状均得到改善。

参考文献

- [1] 胡丽华. 临床输血学检验[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2012:48—52.
- [2] AABB. Technical Manual[M]. 18th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks,2014:396—396.
- [3] 陶翠华,张真路,王文武. 高效价自身冷抗体致血型鉴定和交叉配血困难的处理方法[J]. 临床血液学杂志(输血与检验版),2011,24(4):201—203.
- [4] 谭庆芬. 抗球蛋白试验在疑难交叉配血过程中的重要性分析[J]. 检验医学与临床,2014,11(13):1747—1749.
- [5] 张峰,韩海心,余东. 冷凝集素对血型鉴定和交叉配血的干扰及处理方法[J]. 临床血液学杂志(输血与检验),2015,28(6):506—507.
- [6] Mayer B, Bartolmäs T, Yürek S, et al. Variability of findings in drug-induced immune haemolytic anaemia: experience over 20 years in a single centre[J]. Transfus Med Hemother,2015,42:333—339.
- [7] 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,2014:127—139.
- [8] Meny G. Determining the clinical significance of alloantibodies[J]. ISBT Sci Ser,2015,10:39—43.
- [9] British Committee for Standards in Haematology, Milkins C, Berryman J, et al. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. British Committee for Standards in Haematology[J]. Transfus Med,2013,23:33—35.
- [10] Lv R, Zhang W, Han F, et al. Capillary deposition of

- complement C4d and C₃d in chinese renal allograft biopsies[J]. Dis Markers, 2015, 2015:397613.
- [11] De Groot AS, Ross TM, Levitz L. C₃d adjuvant effects are mediated through the activation of C₃d-specific autoreactive T cells[J]. Immunol Cell Biol, 2015, 93:189-197.
- [12] 郭峰, 查占山, 钱宝华. 体外血液实验创新: 用系统模式研究红细胞多种调节功能的进展[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(5):705-707.
- [13] 李勇, 李一. 实用血小板免疫生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2013:116-117, 185.
- [14] 杨志钊, 陈信, 蒋旭, 等. 多发性骨髓瘤引起的输血前试验干扰两例[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(5):583-584.
- [15] 晋淑媛, 杨慧蓉, 马艳萍, 等. C反应蛋白对多发性骨髓瘤细胞生长影响的研究[J]. 中国药物与临床, 2010, 10(5):504-506.
- [16] 赖静兰. 自发性细菌性腹膜炎早期联合检测血清降钙素原及C-反应蛋白的临床意义[J]. 福建医药杂志, 2013, 35(1):65-67.
- [17] 唐仕超, 王赓, 张志国, 等. 补体 C₃、补体 C₄ 和 C 反应蛋白在系统性红斑狼疮活动和感染中的临床价值[J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(4):397-400.
- [18] 郭峰. 新鲜血快速培养系统免疫学实验研究[J]. 临床医学工程, 2011, 18(1):1-3.

(收稿日期:2007-03-14)

(上接第 581 页)

定性和重复性好, 瓶间差小, 与商品化质控品相关性好, 可满足本室输血相容性检测室内质量控制的要求。

参考文献

- [1] 冯万周, 王凤岚, 田华, 等. 输血前相容性检测试验的室内质控体会[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(5):702-704.
- [2] Xu GP, Wu LF, Li JJ, et al. Performance Assessment of Internal Quality Control (IQC) Products in Blood Transfusion Compatibility Testing in China[J]. PLoS One, 2015, 10:e0141145.
- [3] Yu Y, Ma C, Feng Q, et al. Establishment and performance assessment of preparation technology of internal quality control products for blood transfusion compatibility testing[J]. Exp Ther Med, 2013, 5:1466-1470.
- [4] International Organization for Standardization(ISO). Medical Laboratories-Particular Requirements for Quality and Competence [S]. Geneva, Switzerland: ISO15189;2012.
- [5] 汪德清, 于洋. 输血相容性检测实验室质量控制与管理[M]. 北京: 人民军医出版社, 2011:64-67.
- [6] 李勇, 马学严. 实用血液免疫学: 血型理论和实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006:588-591.
- [7] 鲍维珍, 徐畅, 付晋. 输血相容性检测自制质控品制备设计方案及管理程序[J]. 世界最新医学信息文摘: 连续型电子期刊, 2015, 15(48):157-158.
- [8] 袁晓阳, 马晓露, 陈洁. 基层输血科自制室内质控品的方法与可行性分析[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(4):398-401.
- [9] 张敏, 芦慧霞, 辛琪, 等. 不规则抗体筛查室内质控品的制备及初步应用[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(12):929-931.
- [10] Kinns H, Pitkin S, Housley D, et al. Internal quality control: best practice[J]. J Clin Pathol, 2013, 66:1027-1032.
- [11] Jordan A, Chen D, Yi QL, et al. Assessing the influence of component processing and donor characteristics on quality of red cell concentrates using quality control data[J]. Vox Sang, 2016, 111:8-15.
- [12] 于洋, 马春娅, 冯倩, 等. 自制输血相容性检测室内质控品保存条件的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(3):780-784.
- [13] Chan RC, Kotner JS, Chuang CM, et al. Stabilization of pre-optimized multicolor antibody cocktails for flow cytometry applications[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2016.

(收稿日期:2017-01-09)