

• 病例报告 •

冷凝集素对血型鉴定的影响分析*

徐慧英¹ 廖昭平²

[关键词] 冷凝集素;血型鉴定;PCR-SSP

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2017.10.023

[中图分类号] R457.1 [文献标志码] D

Effect of cold agglutinin on blood type identification

Summary To analyze the influence of cold agglutinin on blood typing and cross-matching test, and find out corresponding solution. Micro glass bead column method, tube test, absorption elution test, antiglobulin test of Coombs and cross-matching test with Polybrene were applied to identify specific antibody, and PCR-SSP to confirm the exact blood type together with serologic pattern. Incubation at 37℃, no puzzle with blood typing and cross-matching. Incubation at 37℃, RBC washing at 37℃ and/or cold absorption at 4℃ could resolve the discrepancy of blood typing which is mediated by cold agglutinin, also PCR-SSP may further affirm the serologic pattern.

Key words cold agglutinin; blood typing; PCR-SSP

冷凝集素是一种自身抗体,在最适温度 3~4℃ 可以凝集自身红细胞^[1];随着温度升高,冷凝集素与红细胞解离,当温度超过 28~30℃ 冷凝集素与红细胞未能解离时,机体将受到免疫损害。正常人体内存在低亲和性非致病的冷凝集素,且大多为多克隆 IgM 性抗体,滴度通常小于 1:64。高滴度的冷凝集素在室温环境中往往会引起患者红细胞自发性凝集,从而引起患者血型鉴定错误和交叉配血困难。本文结合临床出现的冷凝集素干扰血型鉴定的案例,分析冷凝集素的特点,为临床安全用血提供借鉴。

1 资料与方法

1.1 临床资料

患者,男,63 岁,2016 年 12 月因溶血性贫血,脾肿大入院,无输血史,否认传染病史、家族遗传病史。入院查血常规发现 RBC $1.2 \times 10^{12}/L$, Hb 70 g/L,伴有切脾指征,临床科室随即联系输血科择期手术备血 2 U 红细胞悬液。用玻璃珠微柱法鉴定患者血型正定型为 B 型,反定型为 O 型;盐水法复查正定型为 AB 型,反定型为 O 型,37℃ 水浴 5 min,正反定型均为 B 型。重新抽血复检,与原始结果一致,初步考虑冷凝集素干扰了患者血型定型。

1.2 试验方法

1.2.1 血型及血清学检测 血型和抗筛检测采用强生 Ortho 血型鉴定卡,血型手工复查试剂、抗人球蛋白试剂均来自上海血液中心,改良聚凝胺试剂来自中山生科。冷凝集抗体滴度测定按照文献^[2]

的方法分别在 4℃ 和 25℃ 通过倍比稀释进行检测。

1.2.2 血型基因检测 采用杭州 SIMAEN 公司全血 DNA 小量提取试剂盒提取患者 DNA 样本;采用天津秀鹏生物 ABO 基因检测试剂盒对该样本血型进行 PCR-SSP 法检测,所有操作均严格按照说明书进行。

1.2.3 交叉配血试验 患者血浆和红细胞分别进行吸收放散试验之后,采用常规改良聚凝胺试剂进行交叉配合试验。红细胞放散:将患者红细胞配制成 3% 悬液,用 50 ml 37℃ 预热生理盐水将红细胞悬液洗涤 5 次,3 500 r/min 离心 15 s,除去上清液,直到显微镜下可见患者的红细胞无凝集状态。血浆吸收:将标准 O 型红细胞配制成 3% 浓度的红细胞悬液,加入等量血浆后置于 4℃ 的冰箱内孵育 1 h,3 500 r/min 离心 15 s,收集上清。

2 结果

2.1 血清学试验结果

患者在 4℃、25℃ 和 37℃ 的血清学试验结果见表 1。

2.2 该患者基因类型

PCR-SSP 方法确认该患者基因型为 BB 型,见图 1。



第 2 泳道检测 O₂, B, A, A₂; 第 4 泳道检测 O₁ B, A, A₂; 第 5 泳道检测 B; 第 8 泳道检测 A, B, O₁ O₂; 第 11 泳道检测非 A₂₀₁。

图 1 患者 PCR-SSP 产物电泳图

2.3 交叉配血试验

患者红细胞和血浆经过放散和吸收试验后,血

* 基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(No: LY16H160023)

¹ 浙江大学医学院附属第二医院检验科(杭州,310009)

² 浙江大学医学院附属第二医院输血科

通信作者:廖昭平, E-mail: 2514117@zju.edu.cn

型正反相符为 B 型,抗筛阴性,交叉配合试验相合。患者切脾术中输注 B 型 6 U 红细胞悬液和 600 ml 血浆,嘱以加热慢速输注,未见不良反应。相关血液学指标见表 2。

表 1 患者血清学反应格局

温度/℃	检测方法	正定型			反定型			自身对照	冷凝集素滴度	抗 IgG	抗 C3d
		抗-A	抗-B	抗-D	A ₁ 细胞	B 细胞	O 细胞				
4	试管法	2+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	1:512	—	3+
25	试管法	2+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	1:4	—	3+
	微柱法	—	4+	4+	4+	4+	/	—	/	/	/
37	试管法	—	4+	4+	4+	—	—	—	/	—	3+

注:—表示阴性/表示不适用。

表 2 患者相关血液学指标

日期	RBC/ (×10 ¹² ·L ⁻¹)	Hb/ (g·L ⁻¹)	胆红素/(μmol·L ⁻¹)		
			直接胆红素	间接胆红素	总胆红素
2016-12-06	1.20	70	9.4	50.1	59.5
2016-12-09(术中输血、血浆)	0.86	93	/	/	/
2016-12-10	1.09	92	0.8	45.0	49.4
2016-12-11	0.89	86	0.8	44.6	49.2
2016-12-12	0.84	87	0.8	50.8	53.7
2016-12-13	1.01	83	0.8	41.5	42.3
2016-12-14	1.05	87	0.8	24.5	26.1
2016-12-15	1.28	92	0.8	17.6	19.4

注:/表示未测。

3 讨论

冷凝集素一般为抗红细胞的 I 类抗原的 IgM 抗体,在低温环境下 IgM 抗体作为补体的强激活剂结合到红细胞表面启动补体经典激活途径;在 37℃ IgM 抗体与红细胞可逆性解离,补体 C₃b 仍然结合在红细胞表面一部分与 C₃b 结合的红细胞在肝脏经过巨噬细胞网状内皮系统吞噬,存活红细胞上的 C₃b 经过裂解形成 C₃d,这也解释了冷凝集素介导的溶血常常抗 C₃d 阳性,抗 IgM 和 IgG 阴性(表 1)。

在某些病理情况下,如巨细胞病毒感染、水痘、风疹、腺病毒感染、流感病毒感染、支原体肺炎、系统性红斑狼疮及某些肿瘤等疾病会导致机体产生高效价冷凝集素^[3],引起血型鉴定和交叉配血困难。血型鉴定出现正反不一致时须加做自身对照来判断是否存在自身抗体,冷抗体效价检测、直接抗人球蛋白试验可以辅助排除自身抗体干扰。患者红细胞进行 37℃ 热放散,血浆进行 4℃ 抗体冷吸收之后再行正反血型鉴定及交叉配血可以完全确认并排除冷凝集素的影响。ABO 血型亚型鉴定也会表现为正反不符,同型配血表现为弱凝集,水浴后凝集不消失。此时可以采用 PCR-SSP 法对患者基因型进行检测(图 1),进一步确认血清学试验结果,对冷凝集素导致的血型定型困难做出及时准确的诊断。

患者切脾手术中输注 6 U B 型红细胞悬液和 600 ml 血浆,通过输血前血液加温、缓慢输注及输血中给予患者保温等措施,未见输血不良反应。患者术后用甲泼尼龙 30 mg/d 静脉推注治疗,自身免

疫性溶血情况得到好转(表 2),患者后续也未再输注血液制品。

发热性感染会加重至少 2/3 原发性冷凝集素疾病患者溶血性贫血症状,这是由于感染过程中大量产生的补体 C₃、C₄ 会加重补体介导的溶血作用。有意思的是严格保暖的患者即使在夏天也会出现溶血现象,研究表明在 37℃ 仍然有部分 IgM 抗体结合到红细胞,介导溶血^[4]。此外,有报道表明冷凝集素能引起急性脑卒中、大动脉炎、单发性神经病变等疾病过程^[5]。因此,冷凝集素引起机体病理生理改变的机制仍需要后续深入研究。

参考文献

[1] Berentsen S. Role of complement in autoimmune hemolytic anemia[J]. Transfus Med Hemother, 2015, 42:303—310.
[2] 褚笑眉,张海燕,刘久波. 冷凝集素对交叉配血的影响及处理分析[J]. 临床血液学杂志:输血与检验, 2016, 29(2):135—136.
[3] Berentsen S, Tjonnfjord GE. Diagnosis and treatment of cold agglutinin mediated autoimmune hemolytic anemia[J]. Blood Rev, 2012, 26:107—115.
[4] Bartolmas T, Yurek S, Balola AH, et al. Evidence suggesting complement activation and haemolysis at core temperature in patients with cold autoimmune haemolytic anaemia[J]. Transfus Med Hemother, 2015, 42:328—332.
[5] Jin H, Sun W, Sun Y, et al. Report of cold agglutinins in a patient with acute ischemic stroke[J]. BMC Neurol, 2015, 15:222.

(收稿日期:2016-12-19)