

罕见 B(A)02/O01 致疑难血型鉴定

许进明¹ 余悦娇¹ 史丽莉² 周小玉¹

[摘要] 目的:准确掌握 B(A)血型血清学反应格局,熟知其形成的分子机制,正确进行血型鉴定,保证临床输血的安全。方法:采用传统血型血清学方法对样本进行 ABO 血型鉴定,同时运用 PCR-SSP 方法对本 ABO 基因进行分析。结果:血型血清学正定型为 A_弱B,反定型为 B 型,Rh 分型为 DEecc,直接抗人球蛋白试验及血型不规则抗体筛查均为阴性,基因分型结果为 B(A)02/O01 型。结论:对于 ABO 正反定型不符的样本,基因分型技术的应用有助于解决疑难血型的鉴定,但熟练掌握并正确运用血型血清学技术也是必不可少的。

[关键词] B(A);疑难血型;基因分型

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2018.12.020

[中图分类号] Q343.1 **[文献标志码]** A

Identification of rare B(A)02/O01 causing difficult blood type

XU Jinming¹ YU Yuejiao¹ SHI Lili² ZHOU Xiaoyu¹

(¹Department of Blood Transfusion, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210000, China; ²Jiangsu Blood Center)

Corresponding author: ZHOU Xiaoyu; E-mail: deerzxy@163.com

Abstract Objective: To accurately master the reaction pattern of B(A) blood group serology, and know the molecular mechanism that it forms very well, so as to make correct determination of blood group and guarantee the safety of clinical blood transfusion. **Method:** The traditional blood group serological method was used to identify ABO blood group of samples, and PCR-SSP method was used to analyze ABO gene of the specimen. **Result:** The direct typing of blood group serology was A weak B, reverse typing B type and Rh type DEecc. The direct anti human globulin test and blood group irregular antibody screening were all negative. The result of genotyping was B(A)02/O01 type. **Conclusion:** The application of genotyping may be helpful to the identification of difficult blood groups for samples not complying with ABO direct and reserve stereotypes, but it should be essential to master and use blood group serological techniques skillfully.

Key words B(A); difficult blood type; genotyping

患者 ABO 血型的正确鉴定是保障安全输血的前提,临床上影响血型正确鉴定的因素有很多种,包括生理性、实验技术、临床治疗、疾病等多方面原因^[1],但有些是因为控制血型表达的基因发生突变所引起。近几年来,随着分子生物技术的发展,一些疑难血型的成因逐渐从基因层面被揭示,笔者最近发现 B(A)02/O01 致疑难血型鉴定 1 例,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例介绍

患者,男,36 岁,因左腰痛伴肉眼血尿入院,诊断为输尿管结石,拟在我院行输尿管镜碎石手术,无输血史,无血液疾病史。术前进行常规 ABO 血型鉴定时发现血型正反定型不符,进一步分析原因。

1.2 试剂

抗-A、抗-B 标准血清(批号:20170921)、抗-H

血清(批号:20170719)、抗-A1 血清(批号:20170719),反定型试剂红细胞(批号:20185319),上述试剂均由上海血液生物医药有限责任公司提供。抗-AB 血清(DIAGAST,批号:455000),Rh 分型卡(江阴力博医药生物技术股份有限公司,批号:201712001),抗体筛选细胞(长春博迅生物技术有限责任公司,批号:20180402);不规则抗体筛查微柱凝胶卡(长春博迅生物技术有限责任公司,批号:20171203),抗人球蛋白卡(IgG+C₃d)(瑞士 DiaMed,批号:50531.22.05),基因组 DNA 提取试剂盒购自北京 TIANGEN 公司,琼脂糖购自 BIO-WEST 公司,HF Taq 聚合酶购自 Thermo Fisher Scientific 公司,AxyPrep PCR 纯化试剂盒购自爱思进生物技术有限公司,TOPO TA 克隆试剂盒购自 Invitrogen 公司。

1.3 仪器

瑞士 DiaMed ID-Incubator 37SI 微柱凝胶卡保温箱,瑞士 DiaMed ID-Centrifuge 12S II 离心机,长春博研 TD-3A 血型血清学用离心机,无锡源博 Rh 分型卡 LB-3000 专用离心机,Baso 2005-2 离心机,PCR 扩增仪(美国 Applied Bio-system 公司,

¹南京医科大学第一附属医院输血科(南京,210000)

²江苏省血液中心

通信作者:周小玉;E-mail:deerzxy@163.com

PE600); 荧光可见光凝胶成像分析系统(Alpha Innotech 公司, Alpha ImagerEP)。

1.4 方法

1.4.1 ABO 血型鉴定 微柱凝胶卡式法血型鉴定严格按厂家提供操作规程进行操作, 试管法按照参考文献[2]操作。

1.4.2 Rh 血型分型 将患者红细胞使用低离子液稀释成 1% 浓度, 取 50 μl 加入 Rh 血型分型卡中, 置专用离心机离心 5 min, 肉眼观察结果。红细胞悬浮于凝胶表面或中间的为阳性, 沉于凝胶底部的为阴性。

1.4.3 直接抗人球蛋白试验 将患者红细胞使用低离子液稀释成 1% 浓度, 取 50 μl 加入 DiaMed 抗人球蛋白卡(IgG + C₃d) 中, 置专用 37℃ 孵育箱 15 min 后放入专用离心机离心 10 min, 肉眼观察结果。红细胞悬浮于凝胶表面或中间的为阳性, 沉于凝胶底部的为阴性。

1.4.4 血型不规则抗体筛查 取长春博迅不规则抗体筛查微柱凝胶卡分别加入 1% 的 1~3 号筛选细胞 50 μl 和受检者血浆 50 μl, 置专用 37℃ 孵育箱 15 min 后放入专用离心机离心, 肉眼观察结果。红

细胞悬浮于凝胶表面或中间的为阳性, 沉于凝胶底部的为阴性。

1.4.5 血型基因分型 按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取全血 DNA, PCR 扩增 ABO 基因的第 6、7 外显子, 所需引物由上海生工生物技术有限公司合成, PCR 扩增条件, 扩增引物及测序引物序列见参考文献[3]。

2 结果

样本在不同介质中、不同条件下的血型鉴定结果为正定型为 A_弱B, 反定型 B 型, 正反定型不一致, 反应格局见表 1。

血型不规则抗体筛查: 反应格局 I(-), II(-), III(-)。患者血清中未检出不规则抗体, 结果见表 2。

ABO 血型基因分型、测序结果基因分型为 BO 基因型, 标本的第 6 外显子存在 261delG 突变; 第 7 外显子在 B101 序列的基础上出现了 B(A)02 型 700C>G 的典型突变。最终确定该标本基因型为 B(A)02 型与 O01 型杂合(基因分型及测序由江苏省血液中心研究室协助完成)。

表 1 患者血型鉴定反应格局表

检测方法	正定型						反定型					
	抗-A	抗-B	抗-AB	抗-A ₁	抗-H	抗-H+ Bc 对照	抗-H+ Oc 对照	抗-D	Ac	Bc	Oc	自身对照
微柱凝胶卡式法	3+w	4+						4+	3+w	0		
室温	3+w	4+	4+	0	3+s	2+w	4+w	4+	2+S	0	0	0
4℃	4+	4+	4+	0	4+	2+	4+	4+	3+	0	0	0
37℃	3+	4+	4+	0	3+s	2+w	4+w	4+	2+	0	0	0

Rh 血型分型: DEecc。直接抗人球蛋白试验(IgG+C₃d): 阴性。

表 2 患者血型不规则抗体筛查格局

序号	Rh-hr					Kidd		MNS			Duffy		Kell		Lewis		P	结果	
	D	C	E	c	e	Jk ^a	Jk ^b	M	N	S	s	Fy ^a	Fy ^b	K	k	Le ^a	Le ^b		P ₁
I	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
II	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
III	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-

3 讨论

人类 ABO 血型基因位于 9q34.1-9q34.2, 共有 7 个外显子, 主要功能编码区位于 exon6 和 exon7。其基因编码产物是糖基转移酶, 分别负责转运 N-乙酰氨基半乳糖和 D-半乳糖至血型前体 H 物质形成 A 抗原和 B 抗原, 血型基因座上某些位点的碱基发生突变会相应引起糖基转移酶活性的改变, 形成 A、B 抗原的数量和性质也随之变化, 产生不同的 ABO 亚型。B(A) 血型就是其中一种非常罕见的亚型, 最早于 1985 年被首次报道^[4], 其在人群中

的发生频率非常低, 在欧洲高加索人种中发生的频率约 1/(17~18) 万^[5]。目前报道的 B(A) 等位基因有 6 种: B(A)01-06, 中国大陆发现的有 B(A)02、B(A)04、B(A)05、B(A)06 等位基因^[6]。有研究报道, B(A)04 基因型在上海地区献血人群中出现的频率约为 1.6/10 万, 而 B(A)02 则更低, 约为 0.78/10 万, 属于罕见血型的一种。其发生机制现在普遍认为 B 等位基因在正常 B 基因序列的基础上发生单碱基突变, 变异的 B 基因可能具有编码双功能活性酶的能力, 从而在血清学方法中除正常表

现 B 抗原特异性外,还表现少量 A 抗原特异性。

B(A)的血清学格局与 A_xB 产生抗-A 抗体的反应格局非常的相似,在实际工作中常受检测试剂、实验条件、操作不规范以及工作人员对 B(A)血清学认识不够等多重因素的影响,很容易将二者混淆,造成血型判定错误,给临床输血带来非常大的安全隐患。二者在血清学的反应格局还是存在一定的差异性:① B(A)正定型时患者红细胞与抗-A₁、一些单克隆抗-A 及人源抗-A 发生弱凝集,而 H 抗原明显强于对照的 B 细胞,其凝集强度相当于抗-H 与 O 细胞反应强度,而 A_xB 亚型中 H 抗原与 B 型红细胞比较没有明显增强。②反定型时 B(A)血清中含有的抗 A 可以凝集 A₁ 细胞和部分 A₂ 细胞,反应强度明显比 A_xB 亚型强,一般达 3+~4+,A_xB 亚型血清中的抗 A₁ 只与 A₁ 细胞反应,不与 A₂ 细胞反应。本例患者的血清学反应格局也证实了这点,另外直接抗人球蛋白试验、抗体筛查及自身对照均为阴性,排除因同种抗体和自身抗体干扰血型鉴定的可能性,后经基因分型确定该患者为 B(A)02/O01 型,即为一个 O 基因和一个突变的 B 基因组成,进一步测序发现在 B 基因 700 位置发生了 C>G 的突变。

近几年来,随着分子生物学的飞速发展,血型基因分型技术在阐述血型抗原和基因多态性方面有着独特的优势,采用传统的血清学方法同时结合基因分型技术用于疑难血型、罕见血型的鉴定,已成为业界的共识。但作为输血技术人员,熟练掌握各种血型(亚型)在不同反应介质中、不同反应条件下的血清学反应格局对于疑难血型鉴定以及交叉

配血同样必要,目前对于 B(A)亚型患者的临床输血基本原则尚无统一标准,基本遵循同型输注或相容性输注原则。B(A)患者作为受血者除可输同型 B(A)型外,还可选择输 O 型洗涤红细胞及 AB 型血浆等血液制品。B(A)亚型患者含有不规则抗体的一般不适宜作为普通供血者。

(致谢:江苏省血液中心研究室提供的基因检测支持!)

参考文献

- [1] 兰炯采,陈静娴,马红丽,等.推荐 ABO 疑难血型三步分析法[J].中国输血杂志,2010,23(3):165-168.
- [2] 中华人民共和国卫生部,中国输血技术操作规程(血站部分)[M].天津:天津科学技术出版社,1998:71-71.
- [3] Chen Q, Xiao J, Wang S, et al. ABO sequence analysis in an AB type with anti-B patient[J]. Chin Med J(Engl), 2014;127(5):971-972.
- [4] Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system 3 A(X) and B(A) alleles[J]. Vox Sang, 1993, 64:120-123.
- [5] Schenkel-Brunner H. ABO system. Human blood groups chemical and Biochemical basis of antigen specificity[M]. 2ed. New York, Springer wien, 2000: 145-147.
- [6] Patnaik SK, Helmberg W, Blumenfeld OO. NCBI dbRBC database of allelic variations of genes encoding antigens of blood group systems[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40:1023-1029.

(收稿日期:2018-00-00)