

# 多发性骨髓瘤全凝集血型处理及输血实践\*

孔存权<sup>1</sup> 朱伟彦<sup>1</sup> 连利霞<sup>1</sup> 燕备战<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:对多发骨髓瘤全凝集病例进行血清学及分子生物学定型,并探讨其输血实践。方法:初检血型呈全凝集者,红细胞37℃生理盐水洗涤3遍,正定型检测仍有凝集时,56℃水浴箱热放散1 min,再次洗涤后做正定型;血浆用多人份O型洗涤红细胞4℃进行吸收4 h,离心取上清做反定型,结果不理想者复做一次;仍未能判读者取上清置37℃水浴30 min再次如上方式进行反定型检测。经上述处理结果仍然不理想时,进一步应用二硫苏糖醇(DTT)处理检测红细胞或患者红细胞。同时采用中和抑制试验测定患者唾液中和血型物质及PCR扩增1~7外显子测序佐证血型。结果:血型全部得以确认;唾液中和试验与基因定型结果与血清学结果一致;配血试验血红蛋白均有提升。结论:全凝集患者血型定型正确,输血效果良好。

**[关键词]** 多发性骨髓瘤;药物干扰血型;冷自身抗体

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2019.04.003

[中图分类号] R733.3 [文献标志码] A

## ABO total coagulation treatment and blood transfusion practice in multiple myeloma

KONG Cunquan ZHU Weiyan LIAN Lixia YAN Beizhan

(The People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou, 450003, China)

Corresponding author: YAN Beizhan, E-mail: hlzhsxlt@163.com

**Abstract Objective:** To do the serology-typing and geno-typing test in multiple myeloma patients with agglutination. **Method:** For unidentified cases, red blood cells(RBC) was washed with 37℃ saline, and dissipated at 56℃ for 1 min, Serum was absorbed with 4℃ multiple-people-O-type compressed RBC, then RBC and serum were treated with DTT, 1 to 7 exons were amplified. The same type of blood or O washed red cells were selected for transfusion. **Result:** After RBCs washed with saline and serum absorbed with O-type RBC, blood type of the patient 2 was A. After 56℃ dissipating 1 min, blood groups of the patient 3 and 4 were confirmed. Treated with DTT, blood type of the patient 1 was AB. Amplification sequences of 1 to 7 exons were consistent with the serological results. Cross-matching results showed that patient 2 and 4 with primary and secondary blood side were not agglutination, but the patient 1 was. After transfusion, there were no adverse reactions. **Conclusion:** The blood types of the patients were correct and the transfusion was reasonable.

**Key words** multiple myeloma; Dara-interference-blood-typing; cold autoantibody

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一

种克隆性浆细胞恶性疾病,发病率为6/100 000~7/100 000,约占全部恶性肿瘤的1%,占造血系统恶性肿瘤的10%~15%<sup>[1]</sup>。MM多发于中老年人,发病率随年龄增长而增高,往往男性多于女性,但是至今病因仍然知之甚少,电离辐射,农药和苯,肥胖和慢性感染均被认为是倾向性因素<sup>[2]</sup>。MM

\*基金项目:河南省科技公关项目(No:182102310223); 2018年度河南省卫生计生科技英才海外研修项目(No:2018102)

<sup>1</sup>河南省人民医院(郑州大学人民医院)输血科(郑州, 450003)

通信作者:燕备战, E-mail: hlzhsxlt@163.com

[17] Eom J, Yoo J, Kim JJ, et al. Viperin Deficiency Promotes Polarization of Macrophages and Secretion of M1 and M2 Cytokines[J]. Immune Netw, 2018, 18: e32.  
[18] Ye Y, Xu Y, Lai Y, et al. Long non-coding RNA cox-2 prevents immune evasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by altering M1/M2 macrophage polarization[J]. J Cell Biochem, 2018, 119: 2951-2963.  
[19] Gou W, Zhang Z, Yang C, et al. MiR-223/Pknox1 axis protects mice from CVB3-induced viral myocarditis by modulating macrophage polarization[J]. Exp Cell Res, 2018, 366: 41-48.

[20] Gao J, Scheenstra MR, van Dijk A, et al. A new and efficient culture method for porcine bone marrow-derived M1-and M2-polarized macrophages[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2018, 200: 7-15.  
[21] Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, et al. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14: 399-416.  
[22] Sun L, Chen B, Jiang R, et al. Resveratrol inhibits lung cancer growth by suppressing M2-like polarization of tumor associated macrophages [J]. Cell Immunol, 2017, 311: 86-93.

(收稿日期:2018-12-25)

患者多伴有贫血,常急需输血治疗,但单克隆浆细胞恶性增殖并分泌的大量单克隆免疫球蛋白,包裹红细胞表面产生的缗钱状蛋白凝集,常常干扰检测,给患者血型鉴定及临床配血带来一定困难。本文对我院 MM 血型呈现全凝集患者的临床处理及输血实践进行报道。

## 1 资料与方法

### 1.1 标本来源

2016-01—2017-03 在我院收治,鉴定血型或申请输血治疗时发现的 4 例正反定型呈现全凝集的 MM 患者,其中男女各 2 例;年龄 43~68 岁,平均 50.4 岁。

### 1.2 仪器与试剂

强生全自动血型系统,离心机,37℃、56℃ 恒温水浴箱,ProFlex PCR 仪。抗-A、抗-B、抗-AB 与抗-H 试剂、ABO 标准反定型细胞、抗人球蛋白试剂、抗体筛选红细胞、抗体鉴定细胞(上海血液生物医药有限公司),血型鉴定卡(美国 ORTHO),抗人球蛋白卡(西班牙戴安娜公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 初步检测** 患者红细胞配成 2%~5% 悬液,用单克隆抗-A、抗-B、抗-AB 与抗-H 试管法进行抗原检测;患者血清标准反定型红细胞 Ac、Bc、Oc 试管法进行抗体鉴定;全凝集标本试管内加生理盐水 2 滴,轻摇判读凝集能否消失,凝集未消失的标本正定型试管连同反定型试管置 37℃ 水浴箱 5~10 min,再次轻摇后判读。

**1.3.2 直接抗人球蛋白试验与不规则抗体检测** 多特异性抗人球蛋白卡(IgG 与 C<sub>3</sub>)检测红细胞是否致敏;抗体筛检细胞检测血清中是否存在不规则抗体,筛检细胞阳性者进一步用 37℃ 洗涤 5 遍的自身红细胞加等量自身血清,放置 4℃ 冰箱吸收自身冷抗体 12 h 后再次检测,如仍有抗体检出且有特异性,进一步用谱细胞确定抗体特异性。

**1.3.3 样本处理** 经初步检测,正定型或者反定型仍有凝集的患者,依次进行以下处理,直至血型结果得以确认。红细胞处理:①红细胞 37℃ 生理盐水洗涤,吸取患者红细胞用 37℃ 预温生理盐水洗涤 3 遍,再次进行正定型鉴定;②红细胞经以上处理仍然有凝集时,采用 37℃ 预热生理盐水洗涤 3 遍后 56℃ 水浴箱进行热放散 1 min,然后用 37℃ 预热生理盐水再次洗涤 3 遍后做正定型鉴定。血浆处理:①血浆标本冷抗体吸收,用洗涤后的 3 人份的 O 型压积红细胞加等量患者血清在 4℃ 进行吸收 4 h,吸收后离心取上清试管法做反定型,如结果不理想,复做 1~2 次;②血浆标本残留纤维蛋白去除,取血浆置 37℃ 水浴 30 min,再次离心后,用试管法进行反定型检测。以上处理后结果不理想的

情况下用二硫苏糖醇(DTT)处理检测细胞:将配制好的 0.01 mol/L DTT 应用液按 1:1 比例加入红细胞(50%悬液),37℃ 放置 30 min,红细胞用 PBS 液洗涤 3 遍,然后按照 1.3.1 方法鉴定血型,如若仍不理想,DTT 处理患者红细胞。

**1.3.4 唾液血型物质测定** 取已标化抗-A、抗-B、抗-H 血清(以出现 4+凝集的最高稀释度为最适稀释度),分别加入等量已处理好的唾液中和 20 min 后,再分别加入 2%~5% 相对应的红细胞,混匀,室温孵育 30 min,离心观察结果。

**1.3.5 分子生物学定型** 血液基因组抽提试剂盒抽提先证者外周血基因组 DNA,对其 1~7 外显子进行 PCR 扩增,引物序列和扩增条件参考文献[3]。PCR 体系(25 μl 体系)中包含基因组 DNA,引物,混合 la 酶,反应在 ProFlex PCR 仪上进行,反应条件为 95℃ 3 min,95℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 60 s,30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。其中第 1 外显子高 GC,需要 GC buffer,各成分加入量及反应条件略有变动。取 PCR 反应产物 2 μl 用于琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,获取相应条带后,取 10 μl 送江苏中济生物科技公司检测。Chromos 比对和分析测序结果。

**1.3.6 交叉配血试验** 血液输注原则上同型输注,特殊情况下配合性输血(O 型洗涤红细胞)。交叉配血试验患者红细胞采用洗涤红细胞,患者血清采用经自身洗涤红细胞 4℃ 吸收 4 h 后的血清,通过凝聚胺法结合卡氏法与相应献血员血液进行配血试验。

## 2 结果

### 2.1 初步检测结果

试管法检测 4 例患者正反定型均呈现凝集(即正定型 AB 型,反定型 O 型)。正定型加生理盐水 2 滴处理凝集均未完全消失,正定型与反定型试管放 37℃ 水浴箱 5~10 min 后,轻晃正反定型的凝集均未完全散开。

### 2.2 直接抗人球蛋白试验与不规则抗体检测结果

处理前多特异性抗人球蛋白(IgG 与 C<sub>3</sub>)检测 4 例患者结果均为阳性(3+~4+),抗筛细胞检测均阳性(±~4+);处理后红细胞(37℃ 洗涤)多特异性抗人球蛋白(IgG 与 C<sub>3</sub>)卡检测显示阳性,阴性各 2 例,而血清(4℃ 吸收与 37℃ 水浴)抗体筛检细胞结果 4℃ 吸收后 2 例阳性,进一步 37℃ 水浴 1 例阳性,谱细胞检测无特异性。

### 2.3 血型检测结果

患者红细胞经过 37℃ 洗涤和 56℃ 放散,血清经过 4℃ 3 人份 O 型洗涤红细胞吸收或者 37℃ 水浴等处理,见表 1~2。仍未明确血型的患者 1 进一步 DTT 处理,正定型:抗 A<sub>1</sub>3+,抗 B 3+,抗 D

4+,抗 H 0,抗 AB 3+;自身对照±;反定型:Ac 0,Bc 0,Oc 0;直抗 ±。

2.4 唾液血型物质测定

受检者唾液经煮沸、离心,上清液与抗 A、抗 B 及抗 H 血清室温 20 min 中和后,与相应的 ABO 试剂红细胞悬液反应 30 min 后检测结果,见表 3。

2.5 患者基因检测结果

4 例患者外显子 1~7 的 PCR 产物基因测序结果与 GENE 库进行 Blast 比对,以 A101 为参照序列,差异主要集中在外显子 6 与 7,患者 1 判断为 A102B101 型,2 符合 A102O101 型,3 结果为 O101 型,4 为 B101O101 型,未发现亚型情况。

表 1 患者红细胞 37℃ 洗涤与血清 4℃ 吸收后血型检测结果

患者	正定型(37℃ 洗涤)							反定型(4℃ 吸收)		
	抗 A <sub>1</sub>	抗 B	抗 D	抗 H	抗 AB	自身对照	直抗	Ac	Bc	Oc
患者 1	4+	4+	4+	2+	4+	2+	2+	2+	2+	2+
患者 2	4+	0	4+	2+	4+	0	0	0	4+	0
患者 3	2+	2+	4+	4+	2+	±	±	4+	4+	±
患者 4	2+	4+	4+	2+	4+	0	0	4+	0	0

注:37℃ 洗涤指 37℃ 预温生理盐水洗涤 3 遍;4℃ 吸收指 3 人份 O 型压积红细胞加等量患者血清 4℃ 吸收 4 h;Ac、Bc 与 Oc 指反定型检测细胞 A 细胞,B 细胞与 O 细胞;抗 H 正常 A、B、O、AB 型对照分别为 3+、3+、4+ 与 2+。

表 2 患者红细胞 56℃ 放散与血清 37℃ 水浴后血型检测结果

患者	正定型(56℃ 放散)							反定型(37℃ 水浴)		
	抗 A <sub>1</sub>	抗 B	抗 D	抗 H	抗 AB	自身对照	直抗	Ac	Bc	Oc
患者 1	4+	4+	4+	±	4+	±	±	±	±	±
患者 3	0	0	4+	4+	0	0	0	4+	4+	0

注:56℃ 放散指 37℃ 预温生理盐水洗涤 3 遍后的红细胞 56℃ 水浴箱热放散 1 min,然后再次 37℃ 预温生理盐水洗涤 3 遍后检测正定型与直抗;37℃ 水浴指反定型试管置于 37℃ 水浴箱水浴 30 min。

表 3 唾液血型物质测定

患者	Ac	Bc	Oc	阳性对照	阴性对照	盐水对照
患者 1	±	1+	4+	0	4+	4+
患者 2	±	4+	3+	0	4+	4+
患者 3	4+	4+	0	0	4+	4+
患者 4	4+	0	4+	0	4+	4+

注:标化的抗-A、抗-B、抗-H 血清(以 4+凝集的最高稀释度为最适稀释度,待检者疑 A 型用抗 A,B 型用抗 B,O 型用抗 H,AB 型用抗 A、抗 B);Ac、Bc 与 Oc 指反定型检测 A、B、O 细胞。

2.6 交叉配血试验

血液输注原则上同型输注,患者 2 与 4 配血主次侧均不凝集不溶血,患者 3 主侧配血相合,次侧有凝集,患者 1 凝聚胺配血主次侧均仍有凝集。患者 1 经与大夫沟通后,试探性的输注 O 型洗涤红细胞 2 单位,输注后 4 例患者均无不良反应发生,复查血红蛋白,均有提升。

3 讨论

MM 是恶性浆细胞病中最常见的一种类型,常以单克隆浆细胞恶性增殖并分泌大量单克隆免疫球蛋白为特征<sup>[4]</sup>。MM 患者血清中单克隆免疫球蛋白异常增多包裹红细胞(RBC),降低 RBC 表面负电荷之间的排斥力,导致 RBC 发生缙钱状蛋白凝集<sup>[5]</sup>。对于此类现象的策略是在定型试管中加

入等量生理盐水后置显微镜下观察,或者重离心,倒掉上清液,再加 2~3 滴生理盐水,通常凝集消失。但笔者遇到的 4 例 MM 血型鉴定呈现全凝集患者,上述处理后凝集均不能完全消失,将 4 例患者正定型与反定型试管置于 37℃ 水浴箱 10 min 后,凝集也均未能完全散开。患者 2 经过 37℃ 盐水处理 6 遍排除了正定型干扰,患者 3 与 4 红细胞 56℃ 放散 1 min 得以鉴定,而患者 1 则需要经过 DTT 处理后的试剂细胞鉴定才可以确定。唾液血型物质测定以及基因定型均进一步佐证了血清学检测结果。

人类血型系统中,体内产生的天然血型抗体相对稳定,RBC 表面的非活性血型抗原同样相对稳定,但在病理情况下,这两种物质会发生改变<sup>[6]</sup>。全凝集最常见的情况是冷凝集素引起,这类抗体通常在 22℃ 以下反应,4℃ 反应强烈,且在 90% 的冷凝集素病例中,冷凝集素本身就是 IgM,部分冷凝集素强烈或者合并 IgG 温抗体或者其他抗体的情况下,常规处理不能做出正确的血型。通常 37℃ 洗涤能够解决由于温自身抗体引起的自发凝集(微观至 2+),但是由于常规血清学数据并不总是提供足够的信息,因此很难诊断 IgM 温 MM(例如常规使用的抗球蛋白血清不含抗 IgM)。吸收放散试验的方法可以用于检测抗原也可以用于检测抗体,而本试验采用的 56℃ 放散 1 min,对于强致敏的

RBC 有助于血型确认,且未发现 RBC 有明显的损坏。用 DTT 处理试剂红细胞可以有效且可获得以抵消抗 CD38 药物在输血前测试中的干扰及难处理的冷抗体,但是基于 DTT 对二硫键有还原作用,其潜在缺点是血型抗原的破坏,然而,对于大多数抗原来说变化均很小,并且在测量变化范围内<sup>[7-8]</sup>。在常规临床实践中<sup>[9]</sup>,抗 K 是 DTT 敏感的 RBC 抗原中唯一常见的临床意义上的抗体,但是献血员中 90% 以上是 K 是阴性的,但 DTT 破坏 Kell, Yta, LW 等几种抗原特性,决定了 DTT 处理后的标本通常是不用来做交叉配血的,但在 DARA 药物导致的全凝集输血时,用 DTT 处理后配血也还是相对安全的,尽管可能会漏检抗 k, 抗 Yta, 抗 LW 等抗体<sup>[10]</sup>。另外 DTT 还有很多可以利用的作用,比如能够保护 RBC 免受有机金属诱导的溶血作用,有试验表明这些有机金属化合物的溶血效率以浓度依赖性方式被 DTT 阻断<sup>[11]</sup>。

MM 血型变异给临床工作带来一些问题,增加了交叉配血的难度。同型悬浮红细胞交叉配血试验显示患者 2、4 主次侧均相合,患者 3 次侧弱凝集无溶血,考虑到 37℃ 洗涤后的直抗仍呈阳性,予以临床输血,患者输注后均未发现不良反应,血红蛋白提升明显;患者 1 与大夫沟通后,考虑可能为药物影响,试探性的输注了 O 型洗涤红细胞,未出现输血反应,输注后血红蛋白有所提升,与 Chari 等<sup>[12]</sup>报道结果一致。在实际工作中,如遇到血型变异或无法确定正确血型,甚至能确定正确血型但换多袋血进行交叉配血都不合,患者贫血严重又必须输注 RBC 悬液时,可采用试探性的输注 O 型洗涤 RBC。如果患者还需要输注血浆,可以选择输注 AB 型血浆。当然对于需要经常输血的严重贫血的 MM 患者,应该怀疑自身免疫性溶血性贫血(AIHA)<sup>[13]</sup>,然后按照 AIHA 方案来输注相关血液成分。

#### 参考文献

- [1] Kehrner M, Koob S, Strauss A, et al. Multiple Myeloma-Current Status in Diagnostic Testing and Therapy [J]. *Z Orthop Unfall*, 2017, 155: 575-586.
- [2] Gerecke C, Fuhrmann S, Striffler S, et al. The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma [J]. *Dtsch*
- [3] Cai X, Jin S, Liu X, et al. Molecular genetic analysis of ABO blood group variations reveals 29 novel ABO subgroup alleles [J]. *Transfusion*, 2013, 53: 2910-2916.
- [4] Nau KC, Lewis WD. Multiple myeloma: diagnosis and treatment [J]. *Am Fam Physician*, 2008, 78: 853-859.
- [5] Park J, Jekarl DW, Park SY, et al. Combined Group I and III ABO Discrepancies in Multiple Myeloma with IgG-Lambda Type: A Case Report [J]. *Med Princ Pract*, 2017, 26: 90-92.
- [6] Kim SY, Oh SH, Park KS, et al. ABO discrepancy in an elderly patient with IgA kappa-type multiple myeloma [J]. *Ann Hematol*, 2010, 89: 747-748.
- [7] Chapuy CI, Nicholson RT, Aguad MD, et al. Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing [J]. *Transfusion*, 2015, 55: 1545-1554.
- [8] Roback JD, Grossman BJ, Harris T, et al. Technical manual [M]. 17th ed. Bethesda (MD): AABB, 2011.
- [9] Hosokawa M, Kashiwagi H, Nakayama K, et al. Distinct effects of daratumumab on indirect and direct antiglobulin tests: a new method employing 0.01 mol/L dithiothreitol for negating the daratumumab interference with preserving K antigenicity (Osaka method) [J]. *Transfusion*, 2018, 58: 3003-3013.
- [10] Chapuy CI, Aguad MD, Nicholson RT, et al. International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing [J]. *Transfusion*, 2016, 56: 2964-2972.
- [11] Kleszczyńska H, Bonarska D, Sarapuk J, et al. Protection of erythrocytes against organometals-induced hemolysis [J]. *J Fluoresc*, 2004, 14: 5-10.
- [12] Chari A, Arinsburg S, Jagannath S, et al. Blood Transfusion Management and Transfusion-Related Outcomes in Daratumumab-Treated Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2018, 18: 44-51.
- [13] Kashyap R, Singh A, Kumar P. Prevalence of autoimmune hemolytic anemia in multiple myeloma: A prospective study [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2016, 12: e319-322.

(收稿日期: 2018-12-29)