

• 病例报告 •

1 例 ABO 正反定不符的血型分子生物学鉴定

康丹¹ 郝一文¹

[关键词] 正反定不符;血型分子生物学;鉴定报告

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2019.10.023

[中图分类号] R457.1 [文献标志码] D

A case report of ABO positive-negative inconsistency in blood group molecular biology identification

Summary The practical value of combined use of serological methods and molecular biological methods in the identification of difficult blood type was explored through the identification of 1 case of ABO subtype blood group. The ABO blood group antigen of erythrocyte was determined by conventional blood serological detection method. The preliminary classification and sequencing of ABO blood group genes were performed using PCR-SSP. The haplotypes of DNA samples were sequenced by single nucleotide sequencing. Serological results showed that the specimens were positive for O type, reverse type for A type, serological method was unable to determine the blood type of patients; PCR-SSP results showed that the genotype was AxO1, AxO4/O2 type; direct sequencing and haplotype sequencing showed that the genotype of the specimen was Ael02. What did not match the serological positive and negative stereotypes was Ael02. Difficult blood group identification sometimes may require a combination of serological and molecular biological methods to accurately stereotype

Key words positive-negative inconsistency; blood group molecular biology; identification

ABO 血型系统是临床输血中最重要的血型系统之一。ABO 血型系统除正常的 A、B、O、AB 这 4 种血型外,还有多个亚型。ABO 亚型通常在血清学时表现为正反定型不符,血清中含有针对弱抗原特异性的相应血型抗体,给疑难血型鉴定甚至临床患者的输血带来一定的困难。近几年经大量研究与输血实践证实,基因分型手段在某一程度上能够充分地克服血清学试验在实际应用中无法或准确定型的弱点,其作为血清学补充方法之一对临床输血的安全性提供了很好的技术支持。本报告以 1 例 ABO 疑难血型患者作为研究对象,分析探讨 ABO 疑难血型鉴定中联合应用血清学及基因分型方法的实用价值,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 病例资料

患者,男,66 岁,2016 年 8 月 18 日因膀胱结石在我院预行手术。患者无输血史,术前备血常规血型血清学检测中发现 ABO 正反定型不符,正定为 O,反定型为 A,抗体筛查阴性。

1.2 试剂与仪器

抗-A(批号:20160515),抗-B(批号:20160515)为北京金豪制药股份有限公司生产;抗-H(批号:20160516),抗-A1(批号:20160515),抗-IgG 抗体

(批号:20160510),ABO 标准红细胞(批号:20160509)均为上海血液生物医药责任有限公司生产;ABO Rh 血型定型微柱凝胶卡(批号:20160205)为 Diagnostic Grifols, S. A 公司生产。人源性抗-A 和抗-B 血清为本科室配置,经过筛选,选取抗体效价>256 的为实验所用。基因组 DNA 提取试剂盒,ABO 基因分型初筛试剂盒,ABO 血型-A 亚型基因分型试剂盒均为天津市秀鹏生物技术有限公司生产,所有试剂均在有效期内使用。医用低速离心机 BaSo2000-2(台湾贝索企业有限公司),卡式专用离心机 DG Spin(Diagnostic Grifols S. A),台式低速离心机 L550(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),卡式专用孵育器 DG Therm (Diagnostic Grifols S. A),Bio-Rad C1000PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad);DYY-6C 电泳仪(北京市六一仪器厂);SYNGENE BIO IMAGING 凝胶成像系统(Gene Gnome made in UK)。

1.3 鉴定流程

疑难血型鉴定流程见图 1。

2 结果

正反定型,①微柱凝胶血型鉴定卡鉴定:患者血型结果抗-A-,抗-B-,抗-D 4+,抗-C-,抗-E 4+,Ct1-,Ac-,Bc 4+。ABO 血型正定型为 O 型,反定型为 A。②试管法血型鉴定:患者红细胞用生理盐水洗涤 3 次后,在 4℃ 和室温条件下分别与抗-

¹ 中国医科大学附属第一医院输血科(沈阳,110005)
通信作者:郝一文, E-mail:hyw82666@163.com

A、抗-B、抗-A1、人源抗-A 和人源抗-B 血清反应均不凝集,但与抗 H 凝集反应为 4+,与抗 A₁B 凝集

反应为 1+。反定型患者血清与 Bc 凝集反应为 4+(见表 1)。

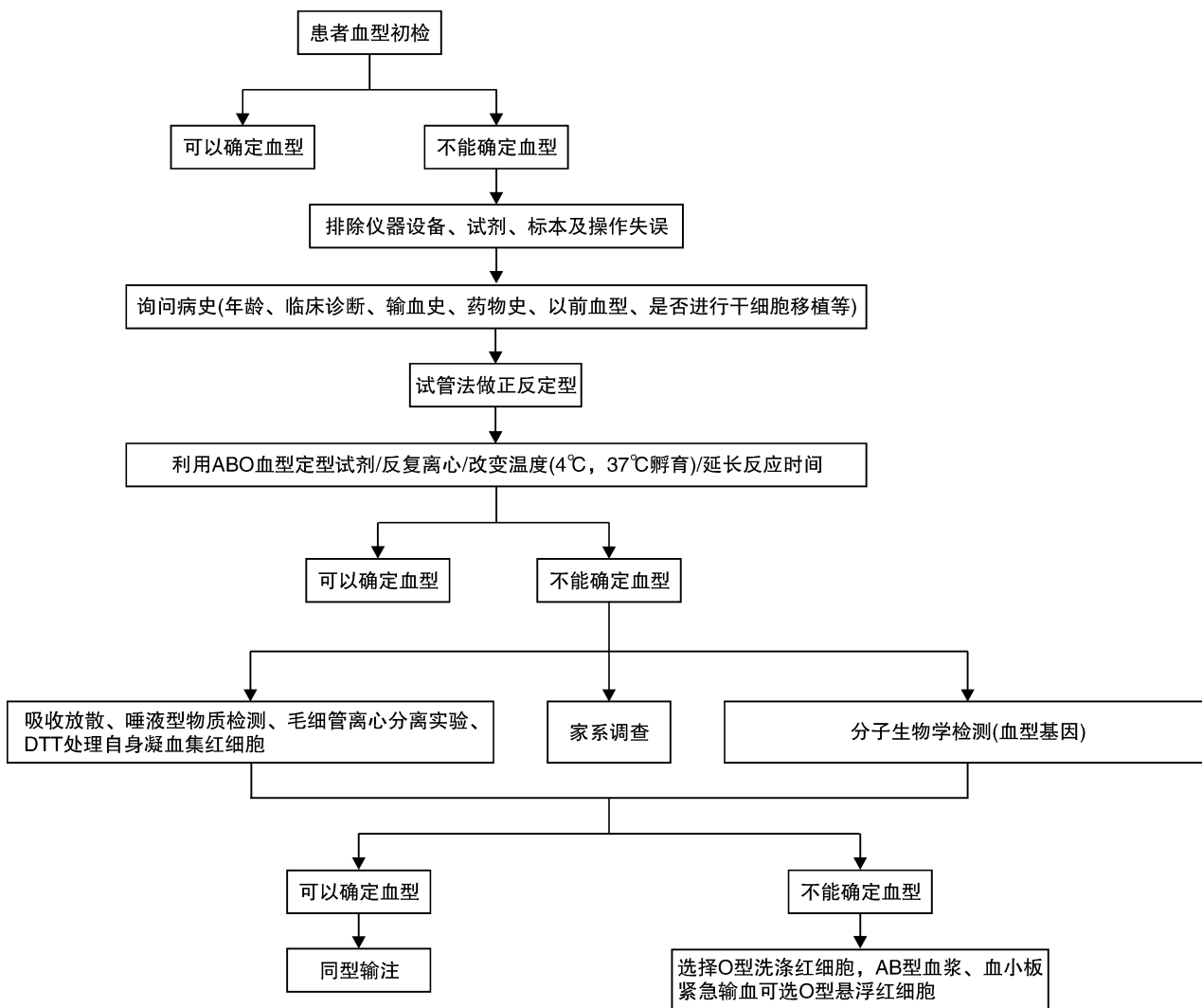


图 1 血型鉴定流程

表 1 试管法 ABO 血型鉴定

反应 温度	患者红细胞与试剂血清反应							患者血清与试剂红细胞反应					A 抗原 吸收放散
	抗-A	抗-B	抗-A1	人源抗-A	人源抗-B	抗-A ₁ B	抗-H	A ₁ c	A ₂ c	Bc	Oc	自身 c	
室温	—	—	—	—	—	1+	4+	—	—	4+	—	—	2+
4℃	—	—	—	—	—	1+	4+	—	—	4+	—	—	/

患者红细胞经 4℃ 与多克隆抗 A 吸收 1 h 后进行 56℃ 热放散,放散液与 Ac 凝集结果为 2+,表明红细胞表面表达有 A 抗原(见表 1)。PCR-SSP ABO 基因分型初筛结果见图 2,基因型为 O2/O2 型,表型为 O。

PCR-SSPA 亚型基因检测结果见图 3,提示该患者为 AxO1, AxO4/O2 型。

DNA 序列分析:结果显示:其基因型为 Ael02/O02(见图 4,5)。

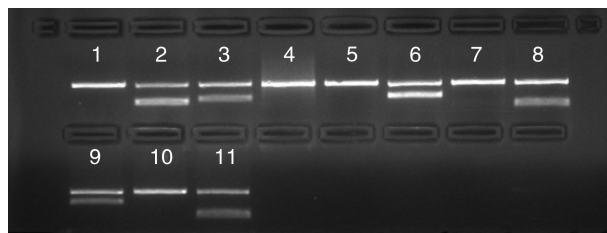


图 2 PCR-SSP 基因分型初筛

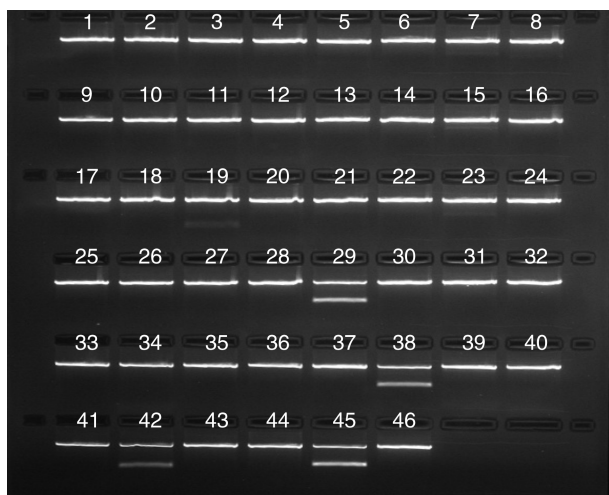


图 3 PCR-SSPA 亚型基因分型

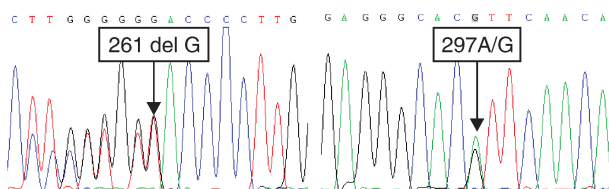


图 4 患者 ABO 基因第 6 外显子直接测序

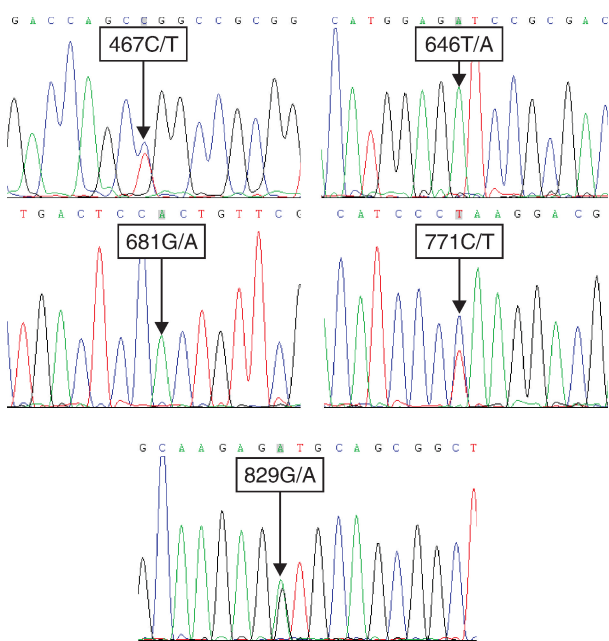


图 5 患者 ABO 基因第 7 外显子直接测序

3 讨论

研究发现 ABO 血型系统存在一定数量的 ABO

亚型,它们主要表现为 A 或 B 抗原凝集强度的减弱或 ABO 血型鉴定中正反定型不一致,特别是血型鉴定仅进行正定型时更容易漏检 ABO 亚型。

我院检验科对该例患者进行正定型血型初筛为 O 型。术前备血时,输血科用 ABO 微柱凝胶血型卡鉴定患者血型,正定型为 O 型,反定型为 A 型,发现正反定型不符。随后我们改用试管法进行鉴定,发现患者红细胞在 4℃ 条件下分别与抗-A,抗-B,抗-A₁,人源抗-A 和人源抗-B 血清反应均不凝集,但与抗 H 凝集反应为 4+,抗 A₁B 凝集反应为 1+;反定型显示患者血清与 Bc 凝集反应为 4+;患者红细胞能吸收并放散抗 A,说明红细胞表面表达有 A 抗原,初步怀疑为 A 亚型。为了进一步证实 ABO 血清学正反定型不符的分子遗传学基础及亚型类别,我们对标本进行了 PCR-SSP ABO 基因分型和基因测序检测,A 亚型基因检测结果提示该患者血型基因型是 A_xO₁,A_xO_{4/02} 型;但考虑到 PCR-SSP 方法检测存在局限性,因此我们又采取了克隆测序的方法,其测序结果与 A101 标准序列比对发现其在 467 位存在 C>T 的单碱基突变,在 646 位存在 T>A 的单碱基突变,在 681 位存在 G>A 的单碱基突变。根据红细胞血型抗原基因突变数据将其基因型定为 Ael02。

本研究结果表明:该患者之所以常规血型血清学未检出 A 抗原,只能通过吸收放散试验检出弱 A 抗原,其原因可能是因为患者的 1 条链的单体型序列发生了 3 个错义突变(467C>T;646T>A;681G>A),从而导致氨基酸的改变,进而影响了酶的活性和抗原的表达。该患者血清中存在弱抗 A 抗体,在进行反定型结果判定时要规范判读凝集强度,否则本例患者的血型很容易误判为 O 型。对于微柱凝胶法正、反定型凝集强度小于 4+;试管法正定型凝集强度小于或等于 3+,反定型小于或等于 2+的情况出现时,要进行凝集强度减弱的原因分析,不要漏检 ABO 亚型或误判血型。对于存在不规则血型抗体的 ABO 亚型,建议给患者输注 O 型红细胞。

总之,ABO 血型准确鉴定极其重要,是一项需要具有高度责任心和技术性的工作。当发生正反定型不符时,有必要联合采用血型血清学和分子生物学方法进行检测,确保临床输血安全。

(收稿日期:2019-02-25)