

## • 病例报告 •

## 疑似 B3 亚型标本的 ABO 基因检测与输血策略分析

秦洪伟<sup>1</sup> 李守蕾<sup>2</sup> 薛杰<sup>1</sup> 徐全民<sup>1</sup>

[关键词] ABO 亚型; B3 亚型; 血型血清学; 基因测序; 血型抗原减弱

DOI: 10.13201/j.issn.1004-2806.2022.04.015

[中图分类号] R457.1 [文献标志码] D

ABO gene detection and transfusion strategy analysis of  
suspected B3 subtype specimens

**Summary** The serological manifestation of blood type is B3 subtype, that is, positive type appears mixed field of vision, which needs to be combined with gene test results to determine whether it is a true ABO subtype. Suspected B3 subtype patients, in order to ensure life safety emergency rescue, can choose O washing red blood cells and AB plasma.

**Key words** ABO subtype; B<sub>3</sub> subtype; blood group serology; gene sequencing; blood group antigen weakened

ABO 血型鉴定是输血前常规检验项目, 由于 ABO 非同型输血可能会引起溶血性输血反应, 严重危害患者生命, 所以 ABO 血型的准确检测对保障输血安全至关重要。ABO 血型鉴定不同于其他定性或定量检验项目, ABO 血型鉴定是在正反定型的抗原抗体反应凝集强度的基础上进行的综合判断, 一般要求正定型要达到 4+ 凝集强度, 反定型  $\geq 2+$  凝集强度<sup>[1]</sup>。近期笔者遇到 1 例 ABO 正反定型不符标本, 来自一位 81 岁男性住院患者, 无输血史, 诊断为肠梗阻、结肠癌并转移, 血型血清学出现混合视野, 疑似 B3 亚型, 最终经过 ABO 基因测序分析确定基因型为 ABO \* B.01/O.01.01。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

ABO 正反定型及 RhD 血型定型试剂卡(美国奥森多公司); 抗人球蛋白(IgG, C3b/C3d)检测卡(美国奥森多公司); 单克隆抗-A、单克隆抗-B、ABO 反定红细胞、抗-H 试剂(上海血液生物医药有限公司); 抗-A1、抗-AB(Sanquin 公司); 血型鉴定质控品(北京金豪生物医药公司); ABO 分型检测试剂盒(江苏伟禾生物); DNA 提取试剂盒(康维试剂)。

### 1.2 仪器

KA2200 型离心机(日本 KUBOTA), Ortho BioVue system 离心机(美国奥森多), Ortho BioVue system 孵育器(美国奥森多), ABI9700 基因扩增仪(美国 ABI), ABI3730XL 测序仪(美国 ABI)。

### 1.3 方法

**1.3.1 血型鉴定室内质控** 输血相容性检测室内质控按相关要求于每日工作前进行, 质控规则: ABO 和 RhD 血型正定型和反定型结果与设定靶值不符, 相差  $>1+$  凝集强度时判为失控; 反应格局中任一凝集强度 1 次低于或高于设定靶值时, 预警提示失控; 连续 3 次低于或高于设定靶值即判断为失控<sup>[2]</sup>。

**1.3.2 血型血清学试验** ABO 血型鉴定试验按照试剂说明书要求采用微柱玻璃珠法和盐水试管法进行。

**1.3.3 DNA 提取** 采用 DNA 提取试剂盒, 按照试剂说明书进行 DNA 提取。

**1.3.4 ABO 基因第 6、7 外显子直接测序** 采用江苏伟禾生物科技有限公司提供的特异性引物对 Exon6 及 Exon7 进行扩增。PCR 扩增反应体系: dNTP 各 400  $\mu\text{mol/L}$ , 模板 DNA 500 ng, 每条引物 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  2.5  $\mu\text{mol/L}$ , Taq 酶 3 U, 最终反应体系 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  60 s, 63 $^{\circ}\text{C}$  90 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  60 s, 共 10 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$  60 s, 61 $^{\circ}\text{C}$  90 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  60 s, 共 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。对 PCR 扩增产物进行双酶纯化、测序扩增, 测序纯化和变性后使用 ABI3730XL 测序仪进行测序, 保存测序结果, 基因测序结果与标准序列进行比对分析。ABO 基因检测部分由江苏伟禾生物科技有限公司完成。

**1.3.5 交叉配血试验** 选取献血员红细胞采用盐水试管法和微柱玻璃珠法进行交叉配血试验, 主要步骤: ①红细胞悬液配置方法血液标本 1000  $\times g$  离心 5 min, 吸取 40  $\mu\text{L}$  压积红细胞加入 1 mL 生

<sup>1</sup> 青岛市胶州中心医院输血科(山东胶州, 266300)

<sup>2</sup> 平度市人民医院检验科

理盐水配置 3%浓度红细胞悬液。②主、次和自身对照加样量:盐水试管法,40 μL 红细胞悬液和 80 μL 血浆;微柱玻璃珠法,10 μL 红细胞悬液和 40 μL 血浆。

2 结果

2.1 血型鉴定室内质控

当日血型检测室内质控在控,见表 1。

表 1 血型室内质控参考值及检测值

方法	正定型			反定型		
	抗-A	抗-B	抗-D	Ctl	A1c	Bc
质控品 1 靶值	4+	0	4+	0	0	3+
当日检测值	4+	0	4+	0	0	3+
质控品 2 靶值	0	4+	0	0	3+	0
当日检测值	0	4+	0	0	3+	0

2.2 血型血清学结果

微柱玻璃珠法 ABO 血型鉴定见图 1,盐水试

管法 ABO 血型血清学检测结果见表 2,2 种方法都表现为正定型患者红细胞与抗-B 试剂出现混合凝集现象,符合 B3 亚型的血型血清学特点。

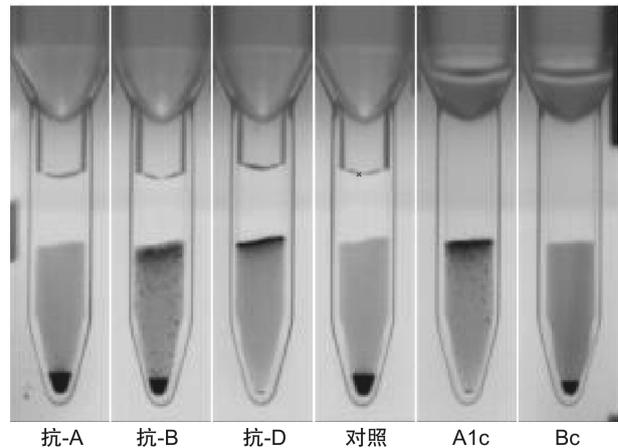


图 1 微柱玻璃珠法 ABO 及 RhD 血型鉴定原始结果

表 2 盐水试管法 ABO 血型血清学检测结果

反应条件	正定型				反定型				人源抗血清		H 抗原测定		
	抗-A	抗-B	抗-A1	抗-AB	A1c	Bc	Oc	自身	抗-A	抗-B	Bc	Oc	Pc
立即离心	0	1+s	0	4+	2+	0	0	0	0	1+w	1+	4+	3+
多次离心	0	3+mf	0	3+mf	2+	0	0	0	0	1+mf	—	—	—

2.3 ABO 基因 Exon6、7 序列结果分析

ABO 基因第 6、7 外显子直接测序结果与标准序列 A101 进行比对,主要基因突变位点为 297A >G、526C >G、657C >T、703G >A、796C >A、803G >C、930G >A、467C >T、缺失 261delG,这些

突变位点符合 B.01 和 O.01.01 等位基因特点,最终确定标本基因型为 ABO \* B.01/O.01.01。

2.4 交叉配血试验结果

患者标本分别与 B 型和 O 型去白细胞悬浮红细胞进行交叉配血试验,结果见表 3。

表 3 患者标本与 B 型和 O 型献血员红细胞交叉配血试验结果

方法	B 型(献血员)				O 型(献血员)			
	主侧	次侧	自身对照	结论	主侧	次侧	自身对照	结论
盐水试管法	0	0	0	相合	0	2+	0	主侧相合,次侧不相合
微柱玻璃珠法	0	0	0	相合	0	3+	0	主侧相合,次侧不相合

3 讨论

ABO 血型抗原由 ABO 基因编码的糖基转移酶决定,A 型和 B 型糖基转移酶分别转移 N-乙酰基半乳糖和 D-半乳糖与 H 抗原表位岩藻糖单糖相连的半乳糖上,形成 A 或 B 抗原,ABO 基因位于第 9 号染色体上,其中第 6 和 7 外显子为主要功能区,当 A 基因或 B 基因序列发生碱基替换或缺失时,通常会影响到基因的表达,引起糖基转移酶的活性变化<sup>[3]</sup>,表现为 A 抗原或 B 抗原数量发生减少或质量发生改变,ABO 亚型在血型血清学通常表现为 ABO 正反定型不符,部分亚型可在血清中发现不规则抗-A 或抗-B<sup>[4]</sup>。血型基因检测是判断疑

难血型的重要方法,单纯依靠血清学判断 ABO 表型存在一定误判风险<sup>[5]</sup>,对安全输血带来潜在影响。

临床上常见的 B 亚型按红细胞上抗原决定簇数量多少依次分为 B3、Bx、Bm、Bw、Bel。B3 亚型是一种较常见的 B 亚型,血清学通常表现为混合凝集外观,主要表现为 B3 细胞与抗-B 试剂反应后出现部分细胞凝集、部分细胞游离的状态<sup>[6]</sup>,在微柱凝集法血型鉴定时表现为一部分红细胞沉降于微柱底部,一部分红细胞分布于微柱上方。相关研究显示 B3 型是仅次于 B(A)的我国人群中最常见的 ABO 亚型<sup>[7]</sup>。与混合凝集相关的等位基因约有 40

个,涉及 B3 亚型的 ABO 基因变异有 17 个,这些等位基因中错义变异占绝大部分,基因变异可导致氨基酸替换,B 型糖基转移酶的活性或结构发生改变,使 B 抗原合成量减少<sup>[8]</sup>。

本例 ABO 正反定型不符样本血型血清学表现符合 B3 亚型特点,而基因测序结果与标准 A101 序列进行比对,确定其 ABO 基因型为 B. 01/O. 01. 01,患者为正常 B 型个体,考虑该患者高龄并且为肠梗阻、结肠癌患者,混合凝集现象可能是疾病相关的抗原减弱现象。除了 ABO 亚型可引起血型鉴定困难外,血液疾病、输血史、造血干细胞移植、嵌合体、恶性肿瘤等都有可能引起血型正反定型红细胞出现弱凝集或混合凝集,导致 ABO 血型正反定型不符<sup>[9]</sup>。有研究显示,恶性肿瘤患者红细胞存在血型抗原减弱现象,分子生物学技术可为肿瘤导致的血型抗原减弱提供精准定型。

对于恶性肿瘤等疾病状态引起的血型鉴定困难,ABO 基因检测可协助确定是否为亚型还是本身疾病引起的抗原减弱,为成分血输注提供安全保障<sup>[10]</sup>。通过和 B 型和 O 型献血者的交叉配血预试验,血型血清学表现为 B3 亚型的标本和 B 型、O 型红细胞主侧都相合,与 O 型红细胞次侧发生凝集,提示在对血型血清学表现为 B3 亚型患者进行输血治疗时,紧急情况下为保障患者生命安全,可以输注 O 型洗涤红细胞和 AB 型血浆或冷沉淀,条件允许时宜进一步利用基因检测确定血型后采取同型输注或自身输血的方式<sup>[11]</sup>。选择 O 型洗涤红细胞输注时应注意充分告知患者本人及近亲属血液输注的理由和风险。本例疑似 B3 亚型患者,在通过基因检测确定血型基因型为 B. 01/O. 01. 01 时,可以选择 B 型红细胞进行交叉配血后输注。

综上所述,在临床输血工作中如遇到混合凝集外观或血型抗原减弱的现象时,一定要详细了解病史、输血史及治疗经过,进一步做血型检测的相关试验,条件充分时可对 ABO 基因第 6 和 7 外显子进行测序来辅助鉴定<sup>[12]</sup>,结合血型血清学结果、基因检测结果和临床病史资料进行 ABO 血型综合判断。需要紧急输血抢救患者而 ABO 血型难以确定

时,可以进行相容性输注,在血液输注过程中应密切观察有无输血反应,如发生严重输血反应要及时采取对症治疗措施,一旦血型确定就应输注同型血液制品,最大限度地保证患者输血安全。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 秦洪伟,迟媛媛,崔海涛,等. 1 例 B(A) 亚型的血清学及分子生物学特征分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(21): 3071-3072.
- [2] 中国输血协会临床输血管理专业委员会. 输血相容性检测室内质量控制的失控判定与处理专家共识[J]. 中国输血杂志, 2020, 33(1): 1-3.
- [3] 朱永亮,李莺,许进明,等. 血清学结合分子生物学方法鉴定 ABO \* cisAB. 01/O. 01. 01 血型 1 例[J]. 临床血液学杂志, 2020, 33(12): 863-866.
- [4] 赵媛,冯强,赵一贺,等. 1 例 Bw11 亚型的鉴定及分子生物学分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2020, 37(10): 1179-1182.
- [5] 李茵,赵倩,苏蔓,等. 罕见的 A3 亚型的血清学和分子生物学研究[J]. 临床血液学杂志, 2021, 34(2): 109-111.
- [6] 胡思群,朱碎永,施顺秋,等. B 亚型血清学鉴定及基因测序分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(23): 2837-2839.
- [7] 雷航,范亮峰,蔡晓红,等. 中国人群血型 ABO 亚型的分子基础研究[J]. 诊断学理论与实践, 2020, 19(4): 364-369.
- [8] 史丽莉,陆乐,肖建宇,等. 1 例 ABO \* B3. 05/O. 01. 01 基因型鉴定及其遗传学特点[J]. 中国输血杂志, 2020, 33(12): 1229-1231.
- [9] 黄小娟,全非,杨卫华. 86 例患者 ABO 血型正反定型不符的原因分析及鉴定[J]. 临床血液学杂志, 2020, 33(12): 869-871.
- [10] 马程明,吴祁生,于桐桐,等. 血液肿瘤患者三例 ABO 基因亚型鉴定及基因表达分析[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(43): 3443-3447.
- [11] 苏巧燕,沈志辉,张乃淙,等. B3 亚型的鉴定及其对临床输血的意义[J]. 军事医学, 2019, 43(5): 397-400.
- [12] 陈静思,林甲进. 罕见 Ax03 亚型血清学和基因序列分析[J]. 临床血液学杂志, 2020, 33(10): 707-709.

(收稿日期:2021-05-01)