

• 经验交流 •

抗 P1 抗体检测的血清学分析和方法探讨

张敏¹ 姚韵¹ 李莺¹ 朱永亮¹ 周小玉¹

[摘要] 目的:分析 P1(-)表型个体产生抗 P1 抗体的血型、抗体鉴定的血清学检测结果、分子机制以及交叉配血策略,并回顾对比分析既往 2 例血清学检测方法和结果,对优化检测方法提高抗 P1 抗体检出率进行探讨。**方法:**采用盐水法、聚凝胺和微柱凝胶法进行血型鉴定、抗体筛选和交叉配血,采用 PCR 扩增 α -1,4-半乳糖基转移酶基因(α -1,4-galactosyltransferase, A4GALT)和 β -1,3-N-乙酰半乳糖氨基转移酶基因(β -13-N-acetylgalactosaminyltransferase, B3GALNT1)外显子编码区,分析 DNA 序列。**结果:**患者 1 经过盐水法、微柱凝胶法、抗人球蛋白法血清学分析鉴定为 IgM 抗 P1 抗体,经过 PCR 核酸检测确定为患者表型为 P1(-);P 型,验证与血清学的检测结果一致。患者 2 仅通过血清学检测鉴定为抗 P1 抗体。**结论:**抗 P1 抗体多为 IgM 型抗体,在进行抗体检测时需考虑到检测方法的适用范围和局限性,选择合适的方法,并进行多种方法联合检测相互验证的方式,以提高抗体的检出率。核酸检测基因分型技术的应用可以从分子生物学角度提供重要佐证,有助于提高抗体鉴定的准确率。

[关键词] 抗 P1 抗体;抗体鉴定;基因分型;方法学比较

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2023.12.013

[中图分类号] R446.11 **[文献标志码]** B

Serological analysis and method discussion of anti-P1 antibody detection

ZHANG Min YAO Yun LI Ying ZHU Yongliang ZHOU Xiaoyu

(Department of Blood Transfusion, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029, China)

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

Abstract Objective: To review the blood type of anti-P1 antibody produced by individuals with P1(-) phenotype, the serological test results of antibody identification, molecular mechanism and cross-matching strategy, compare the previous two serological test methods and results, and discuss the optimization of test methods to improve the detection rate of anti-P1 antibody. **Methods:** Blood group identification, antibody screening and cross matching were performed by normal saline method, polybrene and microcolumn gel method, and PCR amplification was used α -1, 4-galactosyltransferase gene (A4GALT) and β -1, 3-N-acetylgalactosamine aminotransferase gene (B3GALNT1) exon coding region, and DNA sequence was analyzed. **Results:** Patient 1 was identified as IgM anti-P1 antibody by normal saline method, microcolumn gel method and antiglobulin method, and the phenotype of patient 1 was P1(-) by PCR nucleic acid detection. P type, was verified to be consistent with the results of serological detection. Patient 2 was identified with anti-P1 antibodies only by serologic testing. **Conclusion:** Most of the anti-P1 antibodies were IgM. When performing antibody detection, it is necessary to consider the scope and limitations of the detection methods, select the appropriate method, and conduct a variety of combined detection methods to verify each other, so as to improve the detection rate of antibody. The application of nucleic acid detection genotyping technology can provide important corroboration from a molecular biology perspective and help to improve the accuracy rate of antibody identification.

Key words anti-P1 antibody; antibody identification; genotyping; comparison of methodology

P1 抗原频率在人群中差异较大,欧洲人中约 80%,亚洲人群中约 30%。人群中抗-P1 比较常见,通常是天然产生的 IgM 冷抗体,凝集反应很弱,如果温度超过 25℃,一般不出现凝集反应,也

不会发生溶血反应,因此,常规认为临床意义不大^[1]。笔者近期在工作中遇到高效价 IgM 抗-P1 抗体且 37℃ 有活性并影响交叉配血 1 例,结合既往 1 例相同抗体检测的方法和过程,对比检测结果,进行检测方法学的探讨。

¹南京医科大学第一附属医院输血科(南京,210029)

通信作者:周小玉,E-mail:deerzxy@163.com

1 资料与方法

1.1 资料

2016 年 8 月—2022 年 10 月到我院就诊患者因血型鉴定或手术备血而发现抗筛阳性被鉴定为抗 P1,患者 1,男,35 岁,诊断:肝损害,克罗恩病史。患者 2,女,29 岁,诊断:妊娠。两者均无既往输血史。

1.2 试剂与仪器

ABO 及 RHD 血型检测卡和抗人球微柱凝胶卡;单克隆抗 P1;不规则抗体筛检细胞;抗体筛查检测卡;抗体鉴定谱细胞;凝聚胺试剂;2-巯基乙醇(2-Me);伯乐全自动血型分析仪 IH-1000;PCR 核酸测序试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 ABO 及 RHD 血型鉴定 微柱凝胶法、经典盐水试管法。采用 PCR 扩增 α -1,4-半乳糖基转移酶基因(α -1,4-galactosyltransferase, A4GALT)和 β -1,3-N-乙酰半乳糖氨基转移酶基因(β -13-N-acetylgalactosaminyltransferase, B3GALNT1)外显子编码区,分析 DNA 序列。

1.3.2 不规则抗体的筛选和鉴定、抗体类型的鉴定 用抗人球微柱凝胶法、盐水法、间接抗人球蛋白试验进行不规则抗体的初筛和鉴定。用 2-Me 处理血浆破坏 IgM 型抗体后再次用抗人球微柱凝胶

法确定抗体的类型。

1.3.3 效价的测定 筛选 P1 抗原阳性的 ABO 与 RH 同型细胞作为效价测定的指示细胞;用盐水法进行效价的测定。

1.4 交叉配血

用盐水法、凝聚胺法和抗人球微柱凝胶法进行交叉配血。

2 结果

2.1 ABO 及 RHD 血型鉴定结果

患者 1 血型在微柱凝胶法和盐水法中结果一致,正定型为 A+,反定型与 Ac 有 1+ 强度的凝集反应。患者 2 血型在微柱凝胶法和盐水法中结果一致,正定型为 B+,反定型与 Bc 有弱凝集反应。2 例均出现了正反定型不一致,导致了血型鉴定困难。用单克隆抗 P1 试剂分别对反定型细胞和患者红细胞进行 P1 抗原的鉴定,反定型细胞均为 P1 抗原阳性,患者红细胞均为 P1 抗原阴性。见表 1。

患者 1 根据 A4GALT 外显子测序结果,基因型为 A4GALT-new,对应位点为 A4GALT-new: c. 100G>A,发生错义杂合突变(图 1);c. 903C>G,产生同义杂合突变(图 2);根据 B3GALNT1 外显子测序结果,未发现变异,基因型为 GLOB * 01/GLOB * 01;进一步从分子生物学角度确定表现型为 P1(-);P。

表 1 2 例 ABO,RHD 血型鉴定结果

编号	伯乐全自动血型分析仪 IH-1000						盐水试管法				盐水试管法 P1 抗原鉴定			最终结果			
	抗-A	抗-B	抗-D	Ac	Bc	ctrl	抗-A	抗-B	抗-D	Ac	Bc	Oc	Ac		Bc	Oc 患者	
患者 1	4+	0	4+	1+	4+	0	4+	0	4+	1+	4+	1+	P1	/	/	0	A+
患者 2	0	4+	4+	4+	±	0	0	4+	4+	4+	1+	1+	/	P1	/	0	B+

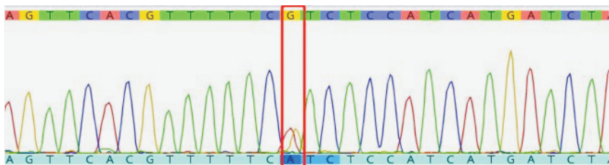


图 1 患者 1 A4GALT 外显子测序错义杂合突变位点

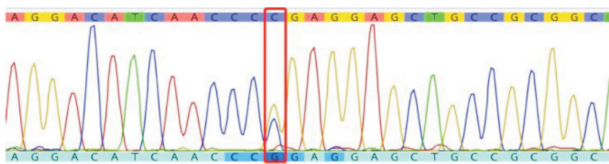


图 2 患者 1 A4GALT 外显子测序同义杂合突变位点

2.2 不规则抗体筛查和鉴定结果

2 例患者直接抗人球蛋白试验均阴性,自身对照阴性。患者 1 抗体初筛结果在盐水法、微柱凝胶法两种检测方法中一致,盐水法检测反应强度明显

增强。且用 2-Me 处理后抗体筛选结果为阴性,说明抗体类型仅为 IgM 型;患者 2,仅在盐水方法中检出抗体,微柱凝胶法抗体初筛结果为阴性。见表 2。

用谱细胞对抗筛结果进行进一步鉴定患者 1 在微柱凝胶方法中无法确定特异性,而在盐水法和抗人球蛋白法中鉴定为抗 P1。且凝集强度:盐水介质>抗人球蛋白介质>微柱凝胶介质。患者 2 在微柱凝胶法中未检出抗体,盐水法中鉴定为抗 P1。见表 3。

2.3 效价的测定

患者 1 用盐水试管法测抗 P1 效价,室温下效价为 64,放置 4℃下效价为 512,放置 37℃下效价为 2。患者 2 用盐水试管法测抗 P1 效价:室温下效价为 8,放置 4℃下效价为 32,放置 37℃下无活性。

2.4 交叉配血

患者 1 血清与 P1(+)的 ABO 与 RH 同型细胞进行交叉配血在盐水方法室温下结果均为(3+~4+),在凝聚胺法中强度为 1+,抗人球微

柱凝胶介质中强度为±~1+,与 P1(-)的 ABO 与 RH 同型细胞在盐水法、凝聚胺和微柱凝胶法中

均阴性。患者 2 因无临床输血申请故而未进行交叉配血。

表 2 患者血清与抗体筛选细胞反应结果

编号/试剂批号	检测方法	与筛选细胞反应格局			Sc	鉴定结果
		I	II	III		
患者 1/ 20220802	微柱凝胶	±	3+	0	0	抗 M、S、P1
	盐水法	3+	4+	0	0	抗 M、S、P1
	2-Me 处理后	0	0	0	0	
患者 2/ 20200702	微柱凝胶	0	0	0	0	未检出
	盐水法	0	0	+	0	抗 Fy ^b 、Le ^b 、P1

表 3 患者血清与谱细胞反应鉴定结果

编号/试剂批号	检测方法	与谱细胞反应格局																Sc	鉴定结果
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
患者 1/ 20220905	微柱凝胶	0	0	0	0	0	2+	2+	0	2+	0	2+	3+	2+	0	0	0	0	未确定
	盐水法	2+	2+	0	2+	2+	2+	2+	0	2+	0	2+	2+	2+	2+	0	2+	0	抗 P1
	抗人球蛋白法	1+	1+	0	1+	1+	2+	2+	0	1+	0	1+	3+	2+	1+	0	2+	0	抗 P1
患者 2/ 20200611	微柱凝胶	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0	未检出
	盐水法	±	0	±	0	2+	+	±	+	0	±							0	抗 P1

3 讨论

P 血型系统是 Landsteiner 和 Levine 发现的,也是第 3 个被发现的人类红细胞血型系统,经历过一段时间的命名混乱期,2011 年国际输血协会(ISBT)确认了 P1PK 血型系统的抗原,统一命名为 P1PK,编号 003,包括 P、P(k)、P1 三种抗原,P 抗原的基因位于 3 号染色体,P1P(K)血型系统基因位于 22 号染色体,P1 表型完全表达所有 3 种抗原,P2 表型红细胞不表达 P1 抗原^[1]。婴儿时期 P1 抗原尚未发育成熟,7 岁以后逐步发育完全,P1 抗原除了在红细胞,还有粒细胞、淋巴细胞、单核细胞上表达^[1]。P2 献血员中,有 1/4~2/3 的人存在抗 P1,包虫囊肿或肝吸虫病患者以及鸟类饲养员中抗-P1 效价常升高。鸟类粪便中的 P1 样物质可刺激肌体抗-P1 水平增高^[2]。近年来对 P 表型的报道不多^[3-5],且大多为抗-Tja 抗体的报道^[6],抗-P1 抗体的报道较少,也有较少合并其他抗体的报道^[7-8]。

本文 2 例患者,均无既往输血史,天然存在的抗 P1 抗体均干扰了血型的鉴定,造成 ABO 正反定型的不一致,这在之前也有过类似的报道^[9-10]。患者 1 在 37℃ 下仍然能够检测出明显的凝集反应,但通过 2-Me 巯基试剂处理后再次进行抗体筛检结果为阴性,确定该抗体仅为 IgM 抗体,无 IgG 抗体的存在,效价测定显示该 IgM 抗 P1 抗体 4℃ 下高达到 512,室温下 64,37℃ 下仍可达到 2,可能是高效价导致的高活性,以至于在 37℃ 下依然有活性,通过抗体鉴定排除抗体干扰后确定血清学血

型。通过基因测序检测到, A4GALT-new: c. 100G>A,发生错义杂合突变;c. 903C>G,产生同义杂合突变,该突变也曾经分别被报道过^[5,11],进一步确定表现型为 P1(-);P。患者 2 干扰了血型的鉴定,但反应凝集强度明显比患者 1 弱,经测定效价较低,室温下仅为 8,37℃ 下无活性,故而仅在盐水法中检出抗体,微柱凝胶法中未检出。因为回顾性研究,无法对患者 2 标本进行基因测序从分子生物学的角度确定其表型。

近年来由于微柱凝胶技术的标准化操作、结果清晰、易于判读、准确度、灵敏度高等优势,已经广泛应用于抗体鉴定和交叉配血中。且因为在日常工作中引起免疫性输血性不良反应的抗体以 IgG 型抗体居多,而针对 IgG 型抗体普遍认为灵敏度方面微柱凝胶法>抗人球蛋白法>盐水法,也有过类似的研究报道^[12]。但没有任何一种方法可以检出所有类型的不规则抗体^[13]。故而日常工作中常常会仅仅使用微柱凝胶法进行常规的抗体筛选和鉴定以及交叉配血,这就导致了抗体漏检和抗体特异性鉴定的不清晰。本研究中,患者 1 在首次微柱凝胶法抗体筛选结果指向抗体有特异性,而在微柱凝胶法的抗体鉴定中又都没有明确鉴定出抗体的特异性,加做盐水法和抗人球蛋白法后最终确定了抗体特异性为抗 P1。并且凝集反应强度为盐水介质>抗人球蛋白介质>微柱凝胶介质,可见在对于类似抗 P1 这种 IgM 型抗体时,这三种检测方法的敏感度是相反的。而患者 2 则在微柱凝胶法中未检出,只在盐水法中检出并最终鉴定为抗

P1 抗体,这可能是由于该抗 P1 抗体为 IgM 抗体,且效价较低室温下仅为 8,37℃ 下无活性,低效价、低亲和力导致了微柱凝胶法的漏检,此前也有过类似的报道^[14]。因此在日常工作中,我们需根据抗体的种类和试验方法的特点选择更具针对性的适当的方法进行抗体的鉴定和交叉配血,以提高抗体特异性的检出率和较少抗体的漏检,提高输血安全性。

AABB 指南上提出因为抗 P1 抗体多为冷抗体,温度超过 25℃,一般不出现凝集反应,也不会发生溶血反应,临床意义不大,所以常规不用挑选 P1 抗原阴性的红细胞用于临床^[2]。国外也有报道称,对于存在抗 P1 的患者需要输血时,只需要交叉配血结果相合即可发放输注,不需要特别筛选 P1 阴性的红细胞,发生溶血性输血反应的比例也极少^[15]。但是近年也有 37℃ 有活性的抗 P1 引起急性和迟发性溶血性输血反应以及在妊娠期间检出抗 P1 抗体而导致溶血性输血反应的报道^[16-18]。加上抗 P1 血清价格高且稀有,无法做到普及,因此用抗 P1 血清进行筛选也不容易实现。因此交叉配血结果的准确性尤为重要。本文患者 1 在进行交叉配血时,患者血清与 P1 抗原阳性的 A 型 RH 同型的献血员红细胞在盐水介质中均强阳性(3+~4+),而在抗人球微柱凝胶介质中强度为±~1+,如果仅仅用抗人球微柱凝胶法进行交叉配血存在漏检的风险。因此从现实角度出发,结合患者 1 和患者 2 的血清学结果,在日常工作中对怀疑有抗 P1 抗体的标本,可以将盐水法交叉配血代替抗 P1 血清进行初筛,盐水配血相合后再进行微柱凝胶或者凝聚胺法交叉配血,选择 2 种方法均相合的血液发放,即节约了成本,也增加了可操作性,从而提高抗体的检出率和特异性的准确率。

随着输血学科的发展,从业人员需努力同步提升专业知识水平,增加专业技能,开展专业技术,如核酸检测基因分型技术在患者 1 血型鉴定、抗体鉴定方面发挥了决定性的作用,才能更好地为临床提供更高效、直接、有意义的指导意见。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 龚道元. 临床输血检验技术(第 2 版/创新教材)[M]. 北京:人民卫生出版社,2021:28-29.
[2] Mark KF. 美国血库协会技术手册[M]. 北京:人民卫生出版社,2020:196-197.
[3] 徐路琼,彭靖琪,窦红勇,等. p 表型孕妇的妊娠管理[J]. 临床血液学杂志,2021,34(10):732-736.

[4] 屠佳燕,周建华,吴瑾惠,等. p 表型个体的血清学特点和分子机制研究 1 例[J]. 中华医学遗传学杂志,2023,40(3):291-294.
[5] 魏玲,姬艳丽,骆宏,等. 一例罕见 P 表型个体家系研究[J]. 中华医学遗传学杂志,2012,29(6):701-704.
[6] 许露萍,尹俊皓,王若涵. 罕见抗-Tj(a)合并自身抗体致疑难配血分析[J]. 临床输血与检验,2021,23(6):800-802.
[7] 刘世佳,张勇萍,杨世明,等. IgM 抗 Le^a、抗 P₁ 抗体联合 IgG 抗 E 抗体的血清学检测分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2021,10:932-935.
[8] 李丹,杨琳,杨世明,等. 抗 P₁ 抗体及其联合抗 M、抗 E 抗体的鉴定分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2023,9:841-845.
[9] 石翠英,刘敬闪,王毅,等. 天然抗-P1 引起血型定型困难 1 例[J]. 中国输血杂志,2000,13(2):132.
[10] 陈凯,庄文华,陈平,等. 献血者抗-P1 抗体的鉴定和处置策略探讨[J]. 医学检验与临床,2022,33(8):66-67,72.
[11] 赵梓昕,许先国,洪小珍,等. 血清学和分子生物学鉴定罕见 p 表型——附 1 例报告[J]. 中国输血杂志,2019,32(11):1116-1120.
[12] 张晨光,张婧婧,庞桂芝,等. 血型不规则抗体检测的方法学评价[J]. 检验医学,2010,25(12):929-933.
[13] Loua A, Nikiema JB, Sougou A, et al. Transfusion in the WHO African region [J]. Transfus Clin Biol, 2019,26(3):155-159.
[14] 王文婷,顾顺利,陈要臻,等. 微柱凝胶卡交叉配血法导致血型抗体漏检的探讨[J]. 中国输血杂志,2019,32(7):691-693.
[15] Smith D, Aye T, Er LS, et al. Acute hemolytic transfusion reaction due to anti-P1: a case report and review of institutional experience[J]. Transfus Med Hemother, 2019,46(5):380-383.
[16] Arndt PA, Garratty G, Marfoe RA, et al. An acute hemolytic transfusion reaction caused by an anti-P1 that reacted at 37 degrees C[J]. Transfusion, 1998,38(4):373-377.
[17] Bezirgiannidou Z, Christoforidou A, Kontekaki E, et al. Hyperhemolytic syndrome complicating a delayed hemolytic transfusion reaction due to anti-P1 alloimmunization, in a pregnant woman with HbO-Arab/ β -thalassemia[J]. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2016,8(1):e2016053.
[18] Thakral B, Bhattacharya P, Agnihotri N, et al. Acute hemolytic transfusion reaction by anti-P1 antibody in pregnancy[J]. Am J Hematol, 2005,78(2):163-164.
(收稿日期:2023-02-20 修回日期:2023-10-15)