

混合抗体型自身免疫性溶血性贫血的血型定型和抗体鉴定

骆宏, 张润青, 罗广平*, 赵阳, 魏玲, 莫春妍, 姬艳丽, 王贞
(广州血液中心临床输血研究所, 广东 广州 510095)

摘要:【目的】建立合适的方法解决混合抗体型自身免疫性溶血性贫血的血型定型和抗体鉴定。【方法】分离标本的血清和红细胞,将红细胞进行轻度热放散和氯喹放散实验后,用于ABO正定型、Rh血型抗原分型和后续的自身吸收实验;取适量患者血清,加入等量O型红细胞进行抗体吸收,吸收后的血清用于ABO反定型实验;分别采用PEG法和自身吸收法对自身抗体进行吸收,比较两者的吸收时间、吸收次数、吸收后血清抗体鉴定结果;取适量红细胞进行乙醚放散,放散液用于抗体鉴定。【结果】21例患者的ABO血型得到正确鉴定,15例患者的Rh血型进行了正确定型。2种吸收方法处理后的血清抗体检测结果一致;检出自身抗体合并同种抗体7例,其中4例同种抗体得到确认,3例同种抗体特异性未明确;单纯自身抗体14例。PEG法总吸收时间为825 min,平均为39.3 min;总吸收次数55次,平均每例吸收2.6次;自身细胞放散后吸收实验总耗时为2 070 min,平均为98.7 min;总吸收次数66次,平均每例吸收3.1次。【结论】轻度热放散结合氯喹放散法适用于混合抗体型AIHA患者血型定型前的红细胞处理;PEG吸收法快速、简便、吸收效果好,适用于临床实际工作。

关键词: 自身免疫性溶血性贫血;放散;吸收;氯喹;聚乙二醇

中图分类号: R392.7, R556.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)03-0434-04

Blood Group Typing Test and Antibody Identification of Autoimmune Hemolytic Anemia with both Warm and Cold Autoantibodies

LUO Hong, ZHANG Run-qing, LUO Guang-ping*, ZHAO Yang, WEI Ling, MO Chun-yan,
JI Yan-li, WANG Zhen

(Clinical Institute of Transfusion, Guangzhou Blood Center, Guangzhou 510095, China)

Abstract: 【Objective】 To resolve the difficulty in blood group typing test and antibody identification test of autoimmune hemolytic anemia (AIHA) with both warm and cold autoantibodies. 【Methods】 Patient's RBC was used for ABO and rhesus typing test after it had been eluted with gently heat and chloroquine. The ABO reverse typing test was performed after the autoantibodies in patient's plasma had been absorbed with O group blood cell. Polyethylene glycol (PEG) adsorption method and auto-adsorption method were studied by comparing the total time and numbers of the adsorption. Antibodies were identified with ethylether elute. 【Results】 ABO and Rh blood group were typed correctly in 21 and 15 cases, respectively. Seven cases were detected to have both allo-antibody and auto-antibody, including anti-S, anti-Ce, anti-c and anti-E, however, antibodies specificity had not been identified in 3 cases. Fourteen cases had only autoantibody. The mean time required by PEG adsorption and auto-adsorption for autoantibody removal was 39.3 minutes (total, 825 minutes) and 98.7 minutes (total, 2 070 minutes). The mean number of autoadsorption for removing autoantibody were 2.6 (total, 55) and 3.1 (total, 66). 【Conclusion】 Gently heat elute combines chloroquine elute is a good choice to perform blood group typing test for AIHA patients with both cold and warm autoantibodies. PEG method is a rapid, simple and effective way to remove autoantibody and detect underlying alloantibody, which can be used in routine practice.

Key words: autoimmune hemolytic anemia; elution; adsorption; chloroquine; polyethylene glycol

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(3):434-437]

收稿日期:2012-11-22

基金项目:广州市医药卫生科技项目(201102A213233)

作者简介:骆宏,主治医师,研究方向:临床输血与血型的分子遗传机制,E-mail:fywzlh74@163.com; *通信作者:罗广平,主任医师,E-mail:594664277@qq.com

自身免疫性溶血性贫血 (autoimmune hemolytic anemia, AIHA) 是由于患者的免疫系统发生紊乱,产生针对自身抗原的抗体或/和活化的补体,吸附在红细胞表面而引起的溶血性贫血。根据自身抗体的特性可分为温抗体型、冷抗体型和混合抗体型。混合抗体型 AIHA,不仅仅是温冷自身抗体混合,还可能在此基础上合并同种抗体,这类患者的血清学特征和输血问题都较复杂,常常困扰着输血工作者。我们对我中心 2009 年至 2012 年间的 21 例混合抗体型 AIHA 患者的输血前实验进行了初步研究,采用轻度热放散结合氯喹放散的方法去除红细胞自身抗体后用于自身抗体吸收实验和红细胞血型定型实验;采用未经放散的患者红细胞加入 PEG 和患者血清进行自身吸收。对上述两种吸收方法进行了比较,现总结报告如下。

1 材料与方 法

1.1 病例资料

2009 年 9 月至 2012 年 4 月总计收集温、冷混合抗体型 AIHA 患者 21 例,其中男性 8 例,女性 13 例,年龄 2~83 岁。原发性患者 10 例,继发性患者 11 例。入选患者近 3 个月无输血史。

1.2 标本采集

受检者手臂肘正中静脉区皮肤消毒后,分别抽取 5 mL 血液至 2 支 EDTA 抗凝管中,离心分离血浆后,红细胞待处理备用,血浆转移至另一洁净试管备用。

1.3 仪器和方 法

1.3.1 试剂与仪器 单克隆抗-A、抗-B 血型试剂(上海血液生物医药公司),抗-D 血型试剂(德国 Biotest 公司),反定型 A、B、O 细胞(本研究室自制),抗体筛选细胞(瑞士达亚美公司),谱细胞(美国 Immucor 公司),Rh 血型抗原分型卡(长春博讯生物技术公司),抗人球蛋白试剂(长春博德生物技术公司),1%木瓜酶,聚凝胺试剂(珠海 Baso 公司),KA-2200 血清学专用离心机(日本久保田公司),恒温振荡式水浴箱(韩国)。

1.3.2 温度梯度实验 取患者血清,加入 3% O 型红细胞悬液 2 滴后,分别置于 22 ℃和 30 ℃水浴环境中,孵育 2 h 后,直接振荡试管观察结果。

1.3.3 常规血清学方法 包括直接抗人球蛋白实验、间接抗人球蛋白实验、抗体鉴定实验、ABO 和 Rh

血型定型实验,均按照中国输血技术操作规程(血站部分)和相应的试剂说明书进行操作^[1]。其中,ABO 反定型实验的血清处理如下:取 O 型红细胞,用生理盐水洗涤 3 遍后,离心去上清,取适量压积红细胞加入等量未经处理的患者血清,37 ℃孵育 15 min 后,检测血清,若间抗实验阴性,则该血清可用于反定型实验;若阳性,则继续吸收,直至间抗实验阴性。

1.3.4 放散实验 针对不同实验采用不同的放散技术。轻度热放散结合氯喹放散后红细胞用于血型定型和后续的自身抗体吸收实验;乙醚放散获取的放散液用于抗体鉴定。①轻度热放散实验:患者红细胞用生理盐水洗涤 3 遍后,去末次上清,加入与压积红细胞等量的生理盐水,放入恒温振荡水浴箱中,45 ℃热放散 15 min 后,离心去上清,备用。②氯喹放散实验:参照 AABB 技术操作手册^[2]。③乙醚放散实验:参照本科室有关技术规范进行。

1.3.5 吸收实验 ①PEG 法吸收^[3]:将患者红细胞与低分子量聚乙二醇(PEG)和患者血清进行吸收实验。②自身细胞吸收法:取放散处理后的红细胞适量,加入 1%木瓜酶进行处理后,洗涤 3 遍,再加入等量血清,37 ℃孵育 30 min,1 000 ×g 离心 5 min 后获取上清,按 3.4.1 所述方法检查是否吸收彻底,再行抗体鉴定。

2 结 果

2.1 温度梯度实验

22 ℃和 30 ℃反应条件下,均出现凝集反应。不同温度条件下的凝集强度略有差别,30 ℃时介于 1+~2+;22 ℃时则在 2+以上。

2.2 ABO 和 Rh 血型鉴定

21 例患者标本处理前 ABO 血型鉴定均为正定型 AB 型,反定型 O 型;15 例患者处理前 Rh 血型抗原检测均为 CcDEe。处理后,患者的 ABO 和 Rh 血型均得到了正确分型(表 1)。

表 1 混合抗体型 AIHA 患者放散前后 ABO 和 Rh 血型定型

Table 1 ABO and Rhesus blood group typing results of mixed AIHA pre- and post elute

	ABO Blood Group				Rhesus Blood Group			
	A	B	O	AB	CcDEe	CCDee	CcDee	untyped
Pre-elute	0	0	0	21	15	0	0	6
Post-Elute	5	4	10	2	2	11	2	6

2.3 放散前后抗人球蛋白实验、不同吸收方法比较及抗体鉴定

放散处理前,所有标本直抗实验阳性强度 $\geq 3+$,间抗实验阳性强度 $\geq 2+$;而放散后的红细胞,其直抗实验结果强度介于 $0\sim 1+$ 。抗人球蛋白实验结果、自身吸收和 PEG 吸收的次数和时间比较及抗体鉴定结果详见表 2。

表 2 放散前后抗人球蛋白实验、不同吸收方法比较及抗体鉴定结果

Table 2 Antiglobulin test results of pre-and post-elute with different adsorption method and antibody identification test results

Sam- ple	Pre -elute		Elute with heat and chloroquine DAT of post-elute	Auto-adsorption n (minites)	Adsorption with PEG n (minites)	Auto- or alloantibody
	DAT	IAT				
1	4+	4+	1+	4(120)	4(60)	Uncertain
2	4+	4+	0	3(90)	2(30)	Auto and anti-S
3	3+	3+	W+	3(90)	3(45)	Uncertain
4	4+	4+	1+	4(120)	3(45)	Auto-antibody
5	4+	4+	0	3(90)	3(45)	Auto and anti-Ce
6	4+	4+	1+	4(120)	3(45)	Auto-antibody
7	3+	3+	1+	3(90)	2(30)	Auto-antibody
8	3+	2+	W+	3(90)	2(30)	Auto-antibody
9	3+	2+	W+	3(90)	2(30)	Auto-antibody
10	4+	3+	0	3(90)	3(45)	Auto and anti-c
11	4+	4+	W+	4(120)	3(45)	Auto-antibody
12	4+	4+	1+	4(120)	3(45)	Auto and anti-E
13	4+	3+	1+	3(90)	3(45)	Auto-antibody
14	4+	4+	1+	4(120)	4(60)	Auto-antibody
15	4+	3+	W+	3(90)	2(30)	Auto-antibody
16	4+	4+	1+	3(90)	3(45)	Uncertain
17	4+	3+	0	2(60)	1(15)	Auto-antibody
18	4+	3+	0	2(60)	2(30)	Auto-antibody
19	4+	4+	W+	3(90)	2(30)	Auto-antibody
20	4+	4+	1+	4(120)	2(30)	Auto-antibody
21	4+	4+	1+	4(120)	3(45)	Auto-antibody

3 讨 论

AIHA 最主要的特点是含有识别并结合破坏自身红细胞的抗体,甚至合并有同种抗体。根据已有的公开资料表明,AIHA 的发病率在 $1/25000$,成人多于小孩,女性多于男性,且多数为中老年人,70%的人发病年龄在 40 岁以上^[4]。根据病因可

分为原发性和继发性 AIHA;根据抗体的性质可分为温抗体型、冷抗体型、温冷混合抗体型和药物诱导型。其中,温冷混合抗体型 AIHA 的输血前实验检测是难中之难,主要体现在:患者 ABO 正反定型不一致、Rh 血型抗原分型全阳性;抗体筛查和抗体鉴定全凝集;交叉配血实验主、次侧凝集等。因此,对于临床输血工作者而言,要掌握这类 AIHA 的实验室诊断要点和输血前实验的处理,显得尤为重要。

实验诊断方面,对于温抗体而言,要满足以下条件中的 2 个:直接抗人球蛋白实验阳性、放散液或血浆中含有自身抗体。对于冷抗体而言,要考虑的是有临床意义的冷自身抗体,这种抗体吸附到红细胞上时,会导致离体后的抗凝血液自凝、温度梯度范围较大($4^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$),溶血症状会更重。因此,混合抗体型 AIHA 的实验室诊断要点是:直抗实验 IgG/C3d 检测均阳性、血液自凝、盐水介质温度梯度实验可以观察到患者红细胞在 30° 甚至更高的温度下出现凝集、抗体筛选和抗体鉴定出现全凝集现象。本研究中,所有病例的血清学实验结果均符合上述诊断要点。

一旦确诊了混合抗体型 AIHA 的病例,输血实验室的首要任务是解决输血前实验的干扰,需要实现 3 个目标:血型定型准确、尽可能的鉴定出抗体种类(自身抗体?自身抗体合并同种抗体?)、尽可能的找出适合患者输注的血液。血型定型方面,混合抗体型 AIHA 的患者,其血型正定型为 AB 型,反定型为 O 型,因此,需要选择合适的方法对标本进行处理后,再行定型实验。轻度热放散结合氯喹放散的方法较其他放散方法而言,有两方面的优势:一是放散效果较单纯的热放散或氯喹放散要彻底;二是可以使得患者的红细胞抗原保留最为完整、破坏较少,适合血型定型。本研究的 21 例患者,在未进行放散实验之前,正、反定型均不相符。经过轻度热放散和氯喹放散后,正定型得到鉴定;血清经过 O 型红细胞吸收自身抗体后,反定型也得到了鉴定;且正反定型均完全相符。15 例患者红细胞经过放散后,其 Rh 血型抗原得到了正确分型。值得注意的是,这类混合抗体型的患者,每例标本其放散和吸收实验都需要 2 次以上,才能得到较好的结果;某些直抗实验强阳性的标本,经过放散处理后,细胞表面依然有少量抗体存在,直抗实验可表现为弱阳性,估计与自身抗体的效价

较高、所结合的温抗体(IgG型)不同亚型有关。

抗体鉴定方面,较为重要也是较为困难的就是自身温抗合并同种抗体时的抗体鉴定。困难在于如何避免自身温抗对同种抗体的掩盖导致的漏检;重要在于检出同种抗体后,可以避免输注相应抗原阳性的红细胞而导致后续的输血反应。所入选的21例标本中,检出自身抗体合并同种抗体的有4例,约占19%,分别为抗-S、抗-Ce、抗-c、抗-E,同种抗体主要分布在Rh血型系统,与国内外同行报道的基本一致^[6-7];暂时无法确定抗体特异性的有3例;其余14例均为自身抗体。抗体特异性鉴定,依靠两方面的信息:放散液和经过处理的患者血清。21例患者红细胞放散液与谱细胞全凝集,提示有自身抗体;而检出同种抗体的4例患者和不能确定特异性的3例患者,则是通过处理后的血清与谱细胞反应而得出的结果。PEG作为一种抗原-抗体反应的增强剂,可以显著提升抗体的吸附率,因此,本研究做了PEG吸收和自身红细胞放散后吸收的比较。从最终的结果判定而言,两者没有明显的差异;吸收时间方面,PEG法总吸收时间为825 min,平均为39.3 min;自身细胞放散后吸收实验总耗时为2070 min,平均为98.7 min。吸收次数方面,PEG法总计55次,平均为2.6次;自身吸收总计66次,平均为3.1次。因此,两者比较而言,PEG方法在时间方面有优势,主要在于其吸收前不用处理患者的红细胞,且单次吸收时间较短;而自身细胞放散后的自身吸收需要前处理,且单次吸收时间长。值得注意的是,有报道指PEG吸收方法会导致抗体稀释效应^[8],但从多数的临床实验^[3,9-10]以及本研究的结果看,可能性较小,且可以在抗体鉴定时,按混合液:红细胞悬液的体积比为4-6:1,可以最大程度的避免稀释效应导致的漏检。

总体而言,混合抗体型AIHA患者的输血问题较为复杂并有输血的免疫学风险,血型定型和抗体鉴定是其中比较棘手的问题^[11]。本研究对此作了初步的研究,其中所用的轻度热放散联合氯喹放散法可以有效的解决这类患者的血型定型;PEG吸收法简单易行,耗时相对较少,较其他方法而言,可节省人力和物力。因此,可以在临床中进行推广应用。

参考文献:

- [1] 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, 1997, 83-86.
Ministry of Health of the People's Republic of China. The Standard Operation Program for Transfusion Medicine [M]. Tianjin: Tianjin Science Technology Press, 1997, 83-86.
- [2] Bercher ME. Technical Manual. 15th [M]. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2005, 783-784.
- [3] Sudipta SD, Rajendra C. Utility of adsorption techniques in serological evaluation of warm autoimmune haemolytic anaemia[J]. Blood Transfus, 2009, 7(9): 300-304.
- [4] Petz D, Garratty G. Immune hemolytic anemias. 2nd [M]. New York: Churchill Livingstone, 2004: 61-63.
- [5] Paul DM. Transfusion Therapy: Clinical Principles and Practice, 3rd [M]. Bethesda, MD: AABB Press, 2011, 62-63.
- [6] Chrisien AW, Loni C, Douglas P. Blackall. Warm Reactive Autoantibodies, Clinical and Serologic Correlations[J]. Am J Clin Pathol, 2004, 122: 682.
- [7] 向东, 刘曦, 王健莲, 等. 红细胞温自身抗体的血清学特点分析及配血对策[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(12): 924-926.
Xiang D, Liu X, Wang JL, et al. The serologic character of the warm autoimmune antibody in RBC and the method used for blood cross-matching test[J]. Chin J Blood Transfusion, 2008, 21(12): 924-926.
- [8] Barron CL, Brown MB. The use of polyethylene glycol (PEG) to enhance the adsorption of autoantibodies[J]. Immunohematology, 1997, 13(9): 119-122.
- [9] Chun-Kwok C, Maria LW, and Ala WL. PEG adsorption of autoantibodies and detection of alloantibodies in warm autoimmune hemolytic anemia[J]. Transfusion, 2001, 41(8): 13-17.
- [10] Joan C, Xavier O, Asunción P, et al. Use of polyethylene glycol for performing autologous adsorptions[J]. Transfusion, 2005, 45(8): 694-697.
- [11] 兰炯采. 加强对自身免疫性溶血性贫血输血前试验的研究, 中国输血杂志[J]. 2012, 25(4): 295-296.
Lang JC. The pre-transfusion test study for autoimmune hemolytic anemia should be strengthened [J]. Chin J Blood Transfusion, 2012, 25(4): 295-296.

(编辑 孙慧兰)