

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.09.006

M 血型检测的影响因素及 M 抗原与 Mur 血型的关联性*

李 乔, 廖艳婷, 孙爱农[△]

广东省中山市中心血站检验科, 广东中山 528400

摘 要:目的 探讨 M 抗原和抗-M 检测的影响因素, 了解 M 抗原与 Mur 抗原的关联性, 调查广东省中山市地区人群 M 血型的发生频率。方法 采用微孔板(或试管)盐水法, 对该地区 581 例无偿献血者进行 M 和 Mur 血型抗原筛查, 观察不同条件下人源性抗-M 和单克隆抗-M 检测的敏感性。结果 该地献血者中 M 抗原与 Mur 抗原的发生频率分别为 78.0%(453/581)、7.9%(46/581), 其中 Mur 抗原者中 M 抗原阳性发生频率为 100.0%(46/46)。孵育温度越低, 抗-M 活性越高, 孵育时间过短易导致敏感性降低; 试剂红细胞越新鲜, 敏感性更高。结论 M 抗原与 Mur 抗原两者存在密切相关性。M 抗原抗体检测最佳孵育温度和时间分别为 4℃、15 min, 单克隆抗-M 试剂应选择效价高的试剂(如 1:16 以上), 抗体筛选红细胞试剂尽可能选择新鲜的, 以纯合子最佳。

关键词: M 抗原; 抗-M; Mur 抗原; 发生频率

中图法分类号: R457.1+1; R446.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)09-1203-04

Influencing factors of M blood type testing and relation between M antigen and Mur blood type*

LI Qiao, LIAO Yanting, SUN Ainong[△]

Department of Clinical Laboratory, Zhongshan Municipal Central Blood Station, Zhongshan, Guangdong 528400, China

Abstract: Objective To investigate the influencing factors of M antigen and anti-M testing, to understand the relation between M antigen and Mur antigen, and to investigate the frequency of M blood type occurrence in Zhongshan area of Guangdong Province. **Methods** A total of 581 blood donors in this area were screened for M and Mur blood group antigens by microplate (or test tube) saline method, and the sensitivity of human and monoclonal anti-M detection under different conditions was observed. **Results** The frequency of M antigen and Mur antigen among blood donors was 78.0% (453/581) and 7.9% (46/581) respectively. Among them, the frequency of M antigen positive among Mur antigen donors was 100.0% (46/46). The lower the incubation temperature, the higher the anti-M activity, and too short incubation time easily lead to the sensitivity decrease; the fresher the reagent red blood cells, the higher the sensitivity. **Conclusion** There is a close correlation between M antigen and Mur antigen. The optimal incubation temperature and time for the detection of M antigen and antibody were 4℃ and 15 min. The monoclonal anti-M reagent should select the reagent with high titer (such as 1:16 or above), and the antibody screening red blood cell reagent should choose as fresh as possible, the homozygous is the best.

Key words: M antigen; anti-M; Mur antigen; occurrence frequency

MNS 血型系统是继 ABO 血型系统后的第二大血型系统, 其抗原和基因具有高度多态性且非常复杂, 产生的抗原表型在不同的地区、种族中特异性明显。M 抗原与 Mur 抗原属于 MNS 血型系统 48 个抗

原之一, 被国际输血协会 (ISBT) 分别命名为 MNS1 和 MNS10^[1]。在我国与 Mur 抗原相关的表型以 GP. Mur 最为常见^[2], 其对应的抗体能够引起较严重的同种异体性免疫反应, 如溶血性输血反应^[3]、新生

* 基金项目: 广东省中山市医学科研项目(2019J382)。

作者简介: 李乔, 女, 主管技师, 主要从事输血医学、免疫血液学及检验医学研究。 [△] 通信作者, E-mail: sunainong8@sina.com。

本文引用格式: 李乔, 廖艳婷, 孙爱农. M 血型检测的影响因素及 M 抗原与 Mur 血型的关联性[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(9): 1203-

儿溶血病^[4-5]和配血困难^[6]等。因此,血型抗原的准确定型对输血安全和疾病预防有着重要的临床意义。目前关于 M 抗原与 Mur 抗原二者相关性的研究较少,本次试验主要探讨了 M 抗原与 Mur 血型的关联性及抗-M 检测的影响因素,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取本站 2020 年 7—8 月 581 例献血者,其中男性占 53%(309/581),中位年龄 37 岁。所有献血者采集 5 mL EDTA-K₂ 抗凝静脉血,4 ℃ 储存并在 4 d 内完成检测。从既往收集的献血者抗-M 阳性血浆标本中选取不同抗体水平(效价)各 3 份,均属于 IgM 型。

1.2 仪器与试剂 96 孔 U 型底微量板(苏州康容生物医疗科技有限公司,批号:20191203);全自动加样仪为瑞士哈密尔顿公司 STAR-8CH 型;常规离心机为日本久保田 KA-2200 和 4200 型(平板);振荡仪为德国海德姆 Titramax101 型。单特异性抗-Mur 试剂(批号 M090622)来自本站制备的人源 AB 型抗-Mur,属于 IgM/IgG 混合性抗体^[7];单克隆抗-M 来源于 A、B、C 3 个厂家(厂家 A,批号:OMM157-1;厂家 B,批号:020519C;厂家 C,批号:20200324);单克隆抗-N(厂家 A,批号:ONM233-1);抗体筛选红细胞来源于 C、D 两个厂家(厂家 C,批号:20207013;厂家 D,批号:20200407)。木瓜酶粉剂和 IgG 抗-D 试剂(均为上海血液生物医药有限责任公司生产,批号:20190718 和 20190826),1% 木瓜酶应用液由本站配制。

1.3 方法

1.3.1 M/Mur 抗原或抗体检测方法 微孔板盐水法:30 μL 样本血浆或抗体试剂与 20 μL 4% 试剂或样本红细胞混合,振荡仪 4 档(500 r/min)混匀 30 s 后,室温(24 ℃,下同)孵育 15 min,期间不能震荡,200×g 离心 1 min,3 min 内观察结果,出现凝集者为阳性反应,反之为阴性。试管盐水法参照文献^[8]操作。

1.3.2 两步酶法(试管法) 将 1% 木瓜酶稀释液分别与 M/Mur 抗原阳性的献血者红细胞等量混合,37 ℃ 孵育 30 min,洗涤 3 次红细胞,用生理盐水配成 4% 酶处理后的红细胞悬液。将酶处理后的红细胞分别与人源性抗-M、阳性对照(IgG 抗-D)、阴性对照(生理盐水)各 50 μL 混合,37 ℃ 水浴 30 min,1 000×g 离心 15 s,观察结果。

2 结 果

2.1 广东中山地区献血者 M 和 Mur 血型频率 选取 581 例献血者标本,分别进行 M 和 Mur 血型鉴定,

其中 M 抗原阳性 453 例占 78.0%(453/581),Mur 抗原阳性 46 例占 7.9%(46/581)。

2.2 M 抗原与 Mur 抗原的关联性 将 2.1 筛得的 46 例 Mur 抗原阳性标本用单克隆抗-M 试剂进行检测,结果显示 M 抗原均为阳性,Mur 抗原中 M 抗原阳性者的发生频率为 100.0%(46/46)。

2.3 不同条件对人源性抗-M 检测敏感性的影响

2.3.1 温度对人源性抗-M 的影响 采用试管盐水法对 3 例人源性抗-M 进行效价检测,结果显示,孵育温度越低,人源性抗-M 活性越高。见表 1。

表 1 不同温度下抗-M 效价检测结果						
项目	人源性红细胞(MN 型)			人源性红细胞(MM 型)		
	4 ℃	24 ℃	37 ℃	4 ℃	24 ℃	37 ℃
I 号人源性抗-M	1:32	1:16	1:8	1:64	1:32	1:16
II 号人源性抗-M	1:8	1:4	1:2	1:16	1:8	1:4
III 号人源性抗-M	1:4	1:2	0	1:8	1:4	1:2

注:孵育时间均为 15 min。

2.3.2 孵育时间对人源性抗-M 的影响 室温条件下,观察不同孵育时间试管盐水法中 3 例人源性抗-M 的效价,结果表明该方法中最佳孵育时间是 15 min。见表 2。

表 2 不同孵育时间抗-M 效价检测结果						
项目	人源性红细胞(MN 型)			人源性红细胞(MM 型)		
	1 min	15 min	30 min	1 min	15 min	30 min
I 号人源性抗-M	1:8	1:16	1:16	1:16	1:32	1:32
II 号人源性抗-M	1:2	1:4	1:4	1:4	1:8	1:8
III 号人源性抗-M	0	1:2	1:2	1:2	1:4	1:4

注:孵育时间分别为 1、15、30 min,均在室温条件下。

2.3.3 不同厂家试剂红细胞对人源性抗-M 的影响 室温条件下,红细胞越新鲜,敏感性更高。纯合子(MM 型)红细胞与人源性抗-M 反应敏感性更强,不同厂家之间试剂的红细胞质量存在差异性,D 厂家筛选红细胞的 M 抗原性强。见表 3。

2.4 不同厂家单克隆抗-M 试剂比较

2.4.1 不同温度对试剂敏感性的影响 试验结果显示,试剂孵育最佳温度为 4 ℃ 和 24 ℃。见表 4。

2.4.2 不同孵育时间对试剂敏感性的影响 试验结果显示,室温下,试剂最佳孵育时间是 15 min。见表 5。

2.5 木瓜酶对 M 类抗体的影响 经木瓜酶处理后的 M/Mur 抗原阳性红细胞,与人源性抗-M 和抗-Mur 无凝集,与阳性对照(IgG 抗-D)出现凝集,与阴性对照(生理盐水)无凝集反应。

表 3 不同厂家试剂红细胞对人源性抗-M 的效价结果

项目	C 厂家筛选红细胞检测抗-M 的效价				D 厂家筛选红细胞检测抗-M 的效价			
	新鲜		陈旧		新鲜		陈旧	
	MN 型	MM 型	MN 型	MM 型	MN 型	MM 型	MN 型	MM 型
I 号人源性抗-M	1∶8	1∶16	1∶2	1∶4	1∶8	1∶16	1∶4	1∶8
II 号人源性抗-M	1∶4	1∶8	1∶1	1∶4	1∶2	1∶8	1∶2	1∶4
III 号人源性抗-M	1∶2	1∶4	0	1∶2	1∶2	1∶4	1∶2	1∶4

注:新鲜筛选红细胞指生产日期在 2 个月内,陈旧筛选红细胞指生产日期在 2 个月以上,C 和 D 厂家试剂均在 3 个月的有效期内;孵育时间为 15 min。

表 4 不同温度下单克隆抗-M 效价检测结果

单克隆抗-M	人源性红细胞(MN 型)			人源性红细胞(MM 型)		
	4 ℃	24 ℃	37 ℃	4 ℃	24 ℃	37 ℃
A 厂家	1∶64	1∶32	1∶32	1∶16	1∶16	1∶16
B 厂家	1∶16	1∶16	1∶8	1∶4	1∶4	1∶1
C 厂家	1∶4	1∶4	1∶2	1∶4	1∶1	1∶1

注:孵育时间均为 15 min。

表 5 不同孵育时间下单克隆抗-M 效价检测结果

单克隆抗-M	人源性红细胞(MN 型)			人源性红细胞(MM 型)		
	1 min	15 min	30 min	1 min	15 min	30 min
A 厂家	1∶16	1∶32	1∶16	1∶8	1∶16	1∶16
B 厂家	1∶4	1∶16	1∶8	1∶8	1∶4	1∶4
C 厂家	1∶4	1∶4	1∶2	1∶1	1∶1	1∶1

3 讨 论

MNS 血型抗原决定簇位于红细胞膜上的血型糖蛋白 A 和血型糖蛋白 B 上,并由相邻的 GYPA 和 GYPB 基因进行编码。M 抗原是被鉴定的第 1 个 MNS 系统抗原,其决定簇存在于血型糖蛋白 A 上,由 GYPA 基因编码。Mur 抗原属于 MNS 系统中的 Miltenberger(简称 Mi)亚系列抗原,表达在 GP. Mur、GP. Hop、GP. Bun、GP. Dane 表型红细胞上。GP. Mur 编码基因属于 GYP(B-A-B)杂交基因,由 GYPB 基因假外显子 3 的部分片段被 GYPA 基因的相应片段所取代而形成^[1]。因此,M 抗原与 Mur 抗原二者关系密不可分,多数情况下应为同时表达。

本研究中,Mur 抗原者中 M 抗原阳性的发生频率为 100.0%(46/46),其中仅有 1 例 Mur 抗原阳性而初筛 M 抗原为阴性、复查后变阳性的标本,疑为抗原凝集强度较弱导致了初筛 M 抗原的误判,经过不同厂家的抗-M 血清再次复核后为 M 抗原阳性。有研究报道,中国人群中 Mur 抗原阳性而 M 抗原阴性的发生率为 13.45%(16/119)^[9],亚裔美国人则为 2.06%(2/97)^[10],本研究结果为 0(0/46),与文献数据不一致,今后还需要进一步分析原因。

抗-M 以天然产生的 IgM 类抗体较多,为低温冷抗体,多在输血、妊娠和细菌感染等情况刺激下产生,并激活补体,可引起体内抗原阳性红细胞出现溶血反应。在结果 2.3 试验中,低浓度抗体若孵育时间不足易导致漏检,而为加强抗原抗体反应性本研究延长孵育时间至 30 min,但效果并不明显,因此孵育时间以 15 min、温度以 4 ℃为最佳。试剂红细胞新鲜程度、厂家筛选红细胞试剂质量对抗原抗体反应的效价强度有一定的影响,即临近有效期的试剂有造成人源性抗-M 漏检的可能,日常筛选试验中也应考虑这一点。红细胞膜上抗原表达纯合子(双剂量)要比杂合子(单剂量)更多,因此在与抗-M 反应时,纯合子(MM 型)红细胞比杂合子(MN 型)红细胞反应效价更强,即“剂量效应”现象^[11]。经木瓜酶处理后,红细胞中的 MNS、Mi^a 和 Mur 抗原结构遭到破坏,导致抗原抗体反应减弱或消失^[1]。本试验结果与文献^[12]报道的 MNS 血型系统的特性是一致的。

目前 M 血型检测主要依靠单克隆抗-M 试剂,但结果 2.4 显示,单克隆抗-M 试剂在不同条件下,对抗-M 的敏感性存在差异。应尽可能选择抗体效价高的抗-M 试剂。立即离心法或孵育 15 min 时需要抗-M 效价达到 1∶16,因为抗-M 水平过低会导致 M 血型的漏检或误判。有研究报道,M 抗原发生频率在深圳和温州分别为 71.2%(685/962)^[13]和 78.4%(527/672)^[14],Mur 抗原发生频率在广州和香港分别为 9.7%(51/528)^[2]和 6.3%(392/6 241)^[15],本研究中 M 抗原和 Mur 抗原发生频率为 78.0%和 7.9%,符合该抗原在中国人群中发生频率的特点。

为防止漏检抗-M/抗-Mur 类不规则抗体,应尽可能选择近期(距生产日期 2 个月内)或 M 血型为纯合子(若同时有 Mur 阳性更佳)的不规则抗体筛选红细胞,在出现疑难配血的情况下,应充分排除试剂、人员操作以及反应时间等影响因素。对于存在抗-M/抗-Mur 的临床患者应提供 M/Mur 抗原阴性的同型输注,以提高输血质量和治疗效果,并减少输血不良反应的发生率。(下转第 1210 页)

- mastitis[J]. *Chronic Dis Transl Med*, 2016, 2(1):17-21.
- [2] 周飞, 刘璐, 余之刚. 非哺乳期乳腺炎诊治专家共识[J]. *中国实用外科杂志*, 2016, 36(7):755-758.
 - [3] PAVIOUR S, MUSAAD S, ROBERTS S et al. *Corynebacterium* species isolated from patients with mastitis[J]. *Clin Infect Dis*, 2002, 35(11):434-440.
 - [4] KIVILCIM T, ALTINTOPRAK F, MEMIS B, et al. Role of bacteriological agents in idiopathic granulomatous mastitis: real or not[J]. *Eur J Breast Health*, 2018, 15(1):32-36.
 - [5] WOLFRUM A, KÜMMEL S, THEUERKAUF I, et al. Granulomatous mastitis: a therapeutic and diagnostic challenge[J]. *Breast Care (Basel)*, 2018, 13(6):413-418.
 - [6] WONG S C Y, POON R W S, CHEN J H K, et al. *Corynebacterium kroppenstedtii* is an emerging cause of mastitis especially in patients with psychiatric illness on antipsychotic medication[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2017, 4(2):ofx096.
 - [7] DOBINSON H C, ANDERSON T P, CHAMBERS S T, et al. Antimicrobial treatment options for granulomatous mastitis caused by *corynebacterium* species[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(9):2895-2899.
 - [8] ABDULRAHMAN G O, GATELEY C A. Primary actinomycosis of the breast caused by *Actinomyces turicensis* with associated *Peptoniphilus harei*[J]. *Breast Dis*, 2015, 35(1):45-47.
 - [9] CORVEC S. Clinical and biological features of cutibacterium (formerly propionibacterium) avidum, an underrecognized microorganism[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2018, 31(3):e00064-e00067.
 - [10] SUMMA P G, YVON A, LARCHER L, et al. Propionibacterium avidum infection following breast reduction: high morbidity from a low-virulence pathogen[J]. *J Surg Case Rep*, 2015, 2015(2):rjv002.
 - [11] KRITIKOS A, PAGIN M, BORENS O, et al. Identification of Propionibacterium avidum from a breast abscess: an overlooked etiology of clinically significant infections[J]. *New Microbes New Infect*, 2015, 4:9-10.
 - [12] 杨晓芳, 郭凤丽, 周友全, 等. 贪婪丙酸杆菌致男性乳腺炎 1 例[J]. *临床检验杂志*, 2017, 35(5):400.
 - [13] BERNARD K A, PACHECO A L. In vitro activity of 22 antimicrobial agents against *Corynebacterium* and *Microbacterium* species referred to the Canadian National Microbiology Laboratory[J]. *Clin Microbiol News*, 2015, 37(23):187-198.
 - [14] GOTO M, MORIMOTO T, MIURA M, et al. Four cases of granulomatous mastitis[J]. *J Japan Surg Assoc*, 2012, 73(6):1331-1336.

(收稿日期:2020-03-20 修回日期:2020-08-20)

(上接第 1205 页)

参考文献

- [1] DANIELS G. Human blood groups[M]. 3rd ed. Oxford: Wiley-Blackwell Science, 2013:96-161.
- [2] WEI L, SHAN Z G, FLOWER R L, et al. The distribution of MNS hybrid glycoproteins with Mur antigen expression in Chinese donors including identification of a novel GYP. Bun allele[J]. *Vox Sang*, 2016, 111(3):308-314.
- [3] 梁宝华, 黄燕芬, 郑博金, 等. 输血前不规则抗体筛查在避免免疫溶血性输血反应中的预防效果分析[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16(13):1880-1885.
- [4] 黄津明, 周小兰. 2 865 例新生儿溶血病脐带血检测结果分析[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16(16):2316-2322.
- [5] MALLARI R A, CHAN A, POWERS R J, et al. Fetal inheritance of GP* Mur causing severe HDFN in an unrecognized case of maternal alloimmunization[J]. *Transfusion*, 2020, 60(4):870-874.
- [6] 顾萍, 傅启华, 王静. 儿童抗-M 引起的血型鉴定困难分析 7 例[J]. *中国输血杂志*, 2015, 28(8):1009-1011.
- [7] 孙爱农, 魏双施, 廖艳婷, 等. 人源 Mur 血型抗体的鉴定和应用(附 1 例报告)[J]. *中国输血杂志*, 2016, 29(12):1327-1330.
- [8] FUNG M K, GROSSMAN B J, HILLYER C D, et al. AABB Technical manual[M]. 18th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks (AABB), 2014:138.
- [9] 常婧妍, 王鹏, 周敏榆, 等. 不同地区 MNS 血型系统与 M、N、S、s、Mur⁺ 抗原基因型一致性分析[J]. *中国输血杂志*, 2019, 32(11):1148-1151.
- [10] LIN X, RUBIO G, PATEL J, et al. Hybrid glycoprotein and red blood cell antigen genotyping in Asian American type O blood donors with Mia phenotype[J]. *Transfusion*, 2019, 59(12):3767-3775.
- [11] CLARE M. The minimum requirements for red cell serological testing[J]. *ISBT Sci Series*, 2011, 6(1):189-192.
- [12] 孙爱农, 李乔, 向东, 等. 献血者 Mia 和 Mur 血型研究及 1 例 GP. Vw 结合子的检出[J]. *中国输血杂志*, 2018, 31(9):943-947.
- [13] 梁延连, 苏宇清, 喻琼, 等. 中国汉族人群红细胞 MNS 血型系统 M、N 抗原数量表达的研究[J]. *国际输血及血液学杂志*, 2010, 33(5):391-394.
- [14] 林杰, 郭杰, 林碧, 等. 温州地区汉族人群 MN 血型表现型分析及基因频率调查[J]. *临床血液学杂志(输血与检验)*, 2017, 30(3):447-449.
- [15] POOLE J, KING M J, MAK K H, et al. The MiIII phenotype among Chinese donors in Hong Kong: immunological and serological studies[J]. *Transfus Med*, 1991, 1(3):169-175.

(收稿日期:2020-12-16 修回日期:2021-02-17)