

9 例新生儿高效价 RhD 抗体导致胎儿新生儿溶血病且形成 RhD 抗原遮蔽现象的回顾性分析与对策*

陈伟¹ 李菲¹ 马筱洁¹ 邱进¹ 李慧君¹ 文军¹

[摘要] 目的:回顾调查新生儿高效价 RhD 抗体导致胎儿新生儿溶血病(HDFN)的患儿资料,了解新生儿血型鉴定和新生儿溶血病相关情况。方法:9 例新生儿抗 D-HDFN 且抗-D 抗体效价大于 1 : 256,利用全自动血型仪和盐水试管方法,检测血型、不规则抗体、抗体效价、溶血 3 项试验,记录新生儿溶血病发病时间、血清总胆红素、血清间接胆红素、血红蛋白的检测数据。结果:9 例新生儿中 A 型 3 例、B 型 4 例、O 型 2 例;RhD 血型初筛与复检不相符 3 例;不规则抗体三细胞均为阳性;抗体效价 1 : 512~4096;新生儿溶血 3 项:直接抗人球蛋白试验、游离试验、放散试验均为阳性(3+~4+);发病时间 6.2 h、血清总胆红素(125.2±31.3) μmol/L、血清间接胆红素(111.7±30.2) μmol/L、血红蛋白(115.2±6.9) g/L。结论:高效价 RhD 抗体导致严重 HDFN,可形成抗原遮蔽现象,给新生儿 RhD 血型鉴定带来困扰,需综合检测分析,确保试验结果可靠性。

[关键词] 高效价;RhD 抗体;遮蔽现象;胎儿新生儿溶血病;血型鉴定

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.06.011

[中图分类号] R722.18 **[文献标志码]** A

Retrospective analysis and countermeasures of 9 neonates with high-titer RhD antibodies leading to haemolytic disease of foetus and newborn and formation of RhD antigen "Blocking"

CHEN Wei LI Fei MA Xiaojie QIU Jin LI Huijun WEN Jun

(Department of Blood Transfusion, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, 830001, China)

Corresponding author: WEN Jun, E-mail: 418216181@qq.com

Abstract Objective: To retrospectively investigate the medical history of the hemolytic disease of fetus and newborn(HDFN) caused by high-titer RhD antibodies in our hospital, and understand the blood type identification of neonates and the related conditions of haemolytic disease of newborn. **Methods:** Nine neonates with anti-D-HDFN and anti-D antibody titers greater than 1:256, using automatic blood type analyzer and saline test tube method, were detected blood group, irregular antibodies, antibody titers and hemolysis three tests, and neonatal hemolysis disease onset time, detection data of total serum bilirubin, serum indirect bilirubin and hemoglobin were recorded. **Results:** Among 9 newborns, there were 3 cases of ABO blood group A type, 4 cases of B type, and 2 cases of O type; 3 cases of RhD blood group screening and re-examination; 3 cases of irregular antibodies were positive; antibody titer 1 : 512~4096. The three DAT, free test, and release test of neonatal hemolysis were positive(3+~4+); onset time was 6.2 h, total serum bilirubin was (125.2±31.3) μmol/L, indirect serum bilirubin was (111.7±30.2) μmol/L, and hemoglobin was (115.2±6.9) g/L. **Conclusion:** High titer RhD antibodies could cause severe HDFN, which could form an antigen "Blocking" phenomenon, which would cause problems for newborn RhD blood group identification. Comprehensive testing and analysis may be required to ensure the reliability of test results.

Key words high titer; RhD antibody; blocking phenomenon; hemolytic disease of fetus and newborn; blood group identification

根据国际输血协会(ISBT)最新公布,红细胞 39 个血型系统及 330 个抗原中,Rh 血型系统有 55 个抗原,是抗原最多的血型系统。Rh 血型系统存在单核苷酸遗传的多态性,复杂性,其位于 1 号染

色体上,现已发现 RHD 等位基因 500 多个,RHCE 等位基因 150 多个,RHD 和 RHCE 基因编码 417 个氨基酸,其表达分子量为 30 000~32 000 kDa^[1]。RhD 表型依据红细胞 D 抗原存在或缺失来确定结果,但由于 D 抗原表位存在高度三维构象,而非单一线性氨基酸残基组成,所以氨基酸的变化会影响 D 抗原的表达,最终导致 D 抗原的变异^[1]。RhD 抗原早在妊娠后第 38 天存在胎儿红细

*基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(No: 2019D01C145)

¹新疆维吾尔自治区人民医院输血科(乌鲁木齐,830001)
通信作者:文军,E-mail:418216181@qq.com

胞膜上,妊娠第 11~13 周孕妇血液中利用高通量基因技术检出胎儿红细胞 D 抗原^[2]。RhD 抗原还存在于有核前体红细胞膜上,其成熟红细胞上抗原密度最高^[3]。除 ABO 血型导致胎儿新生儿溶血病(hemolytic disease of fetus and newborn, HDFN)外, Rh 血型引起 HDFN 最多见,其发病率为 14.6%,其中抗 D-HDFN 发病率为 65.63%^[4],在本区域发病率会更高。由高抗-D 效价导致 HD-FN,让新生儿 RhD 抗原形成遮蔽现象,使血型鉴定困难,最终误导医生的判断与治疗,此种情况在新疆地区时有发生,但未引起足够重视。本次回顾性分析 9 例高效价 RhD 抗体导致 HDFN,形成新生儿 RhD 血型抗原遮蔽现象,描述血型鉴定与 HDFN 的现况,目的是减少血型误判与 HDFN 早发现、早治疗。

1 资料与方法

1.1 对象

调取我院 2010—2019 年 9 例新生患儿资料,其中男 5 例,女 4 例;年龄 2 h~7 d;汉族 1 例,维吾尔族 8 例;母亲妊娠次数≥3 次。纳入标准:新生儿,孕妇为 RhD 抗原阴性,新生儿为 RhD 抗原阳性,不规则抗体鉴定结果为抗-D 抗体,抗-D 效价大于 256,直接抗人球蛋白试验(DAT)凝集强度 3+~4+,诊断为高胆红素血症和免疫溶血性贫血。发病时间从病历中获取。排除标准:感染,胆汁淤积,红细胞膜病,血色素病等其他因素导致高胆红素血症和免疫溶血性贫血。

1.2 样本采集

用 EDTA-K₂ 抗凝剂真空采血管,采集新生儿静脉全血大于 3 mL。

1.3 仪器与试剂

全自动血型分析仪(Auto Vue Innova),孵育器和离心机(Workstation),ABO 血型及 RhD 血型鉴定玻璃微柱卡,抗人球蛋白(IgG)玻璃微柱卡(奥森多医疗器械贸易有限公司);低离子抗人球蛋白卡(美国 Bio-Rad),白洋离心机,久保田血清学离心机(KA2200,日本),玻璃试管,微量移液器(Eppendorf,德国),56℃ 恒温水浴箱。抗-D(IgM+IgG)单克隆试剂(DBL,美国);单克隆抗 C、c、E、e、D 试剂(IgM)和抗 D 血清(IgG),A1c、Bc、Oc 反定红细胞, I、II、III 抗体筛查红细胞,抗体鉴定谱细胞(上海血液生物技术有限公司);抗-D(IgG),抗体鉴定谱细胞(Sanquin);生理盐水,木瓜酶,酸放散试剂,二磷酸氯喹(长春博德生物技术有限责任公司),凝聚胺(珠海贝索生物技术有限公司),血型鉴定及不规则抗体筛查质控品(北京金豪制药股份有限公司)。

1.4 方法

取血标本,利用全自动血型分析仪和血型定型

及不规则抗体筛查质控品,先做室内质控,结果符合标准后,检测 ABO 血型、RhD 血型及不规则抗体筛查,不规则抗体为阳性的,使用两套谱细胞(抗原)和相应单克隆血清试剂(抗体)鉴定不规则抗体类型,利用抗人球蛋白法和凝聚胺方法,血清(或血浆)和放散液同时做抗体鉴定试验。利用盐水倍比稀释和间接抗人球蛋白法(IAT)检测患者效价,3%浓度新鲜红细胞悬浮(R₂),效价测定以 1+为稀释的观察终点。三洗患者的红细胞,配成 1%红细胞悬液做 DAT;收集压积红细胞 1 mL 以上,利用酸放散试剂,放散红细胞上的抗体,形成抗体富集的洗脱液;利用 2 步木瓜酶法处理 A1c、Bc、Oc 细胞,完成溶血 3 项试验。记录血清总胆红素、间接胆红素、血红蛋白、发病时间及换血等情况。RhD 抗原阴性孕妇利用 3 个厂家的 RhD 试剂和抗人球蛋白卡(IgG)复检,均为阴性记录结果。检查孕妇与新生儿的 C、c、E、e 抗原表型,挑选谱细胞中的红细胞做阴性和阳性对照,记录结果。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 17.0 软件,分析血清总胆红素、间接胆红素、血红蛋白等计量资料,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。发病时间,抗体效价,孕产史,换血次数,住院天数等用均数表示。

2 结果

本次回顾性研究 9 例新生患儿存在抗-D 抗体高效价,导致红细胞 RhD 抗原遮蔽现象及严重的 HDFN。案例 1 新生儿血型微柱卡与不规则抗体筛查结果的格局图,见图 1;新生儿放散液抗体鉴定谱细胞在抗人球蛋白卡(Anti-IgG+C3 d)的格局图,见图 2。

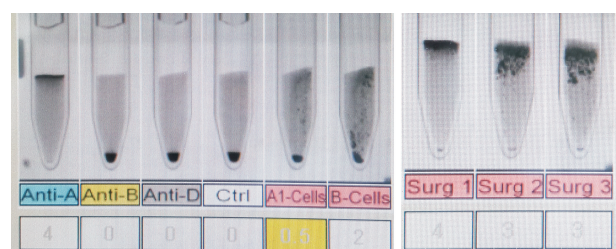


图 1 案例 1 新生儿血型微柱卡与不规则抗体筛查结果



图 2 案例 1 新生儿放散液(酸放散)抗体鉴定谱细胞在抗人球蛋白卡的结果

9例新生儿血型鉴定和不规则抗体筛查(全自动血型分析仪)的结果见表1;血型鉴定(盐水试管法)的结果见表2;溶血3项(试管和IAT卡)的结果见表3;患儿和母亲的室实验室血清学检测(试管和IAT卡)结果见表4;实验室指标(血浆/血清)和换血治疗及结果见表5。

果见表3;患儿和母亲的室实验室血清学检测(试管和IAT卡)结果见表4;实验室指标(血浆/血清)和换血治疗及结果见表5。

表1 9例新生儿血型鉴定和不规则抗体筛查(全自动血型分析仪)结果

序号	正定型		抗D	Control	反定型		抗体筛查			初始血型结果	
	抗A	抗B			A ₁ c	Bc	I	II	III	ABO	RhD
1	4+	0	0	0	0.5+	2+	4+	3+	3+	A	阴性
2	4+	0	3+mf	3+mf	3+	3+	4+	3+	3+	A	阳性
3	0	4+	3+s	4+	3+s	2+s	3+	2+s	2+s	B	阳性
4	0	0	4+	4+	4+	3+s	3+	3+	3+	O	阳性
5	0	4+	0	3+mf	4+	3+	3+	3+	3+	B	阴性
6	4+	0	3+mf	3+s	3+	3+	3+	3+	3+	A	阳性
7	0	4+	3+mf	4+	3+s	2+s	4+	3+s	3+s	B	阳性
8	0	0	0	3+	3+	3+	3+	3+	3+	O	阴性
9	0	4+	3+	4+	4+	3+	3+s	3+	3+	B	阳性

检测卡凝集强度:0(阴性)、0.5+、1+、2+、3+、4+、s(strong)、w(weak)、mf(混合凝集);反定A₁c和Bc的RhD血型均为阳性,Control:阳性,说明试验处于失控状态,结果需要人工复查后判读。

表2 9例新生儿血型鉴定(盐水试管法)的结果格局分布

序号	正定型		抗D	自身细胞	反定型		红细胞D抗原		复查血型结果	
	抗A	抗B			A ₁ c	Bc	45℃热放散	磷酸氯喹放散	ABO	RhD
1	4+	0	0	0	0	0	1+s	2+s	A	阳性
2	4+	0	1+w	0	0	0	2+s	3+	A	阳性
3	0	4+	0	0	1+w	0	2+	3+w	B	阳性
4	0	0	0	0	0	0	2+	2+	O	阳性
5	0	4+	1+w	0	1+w	0	2+	2+	B	阳性
6	4+	0	1+w	0	0	0	2+w	3+	A	阳性
7	0	4+	0	0	1+w	0	2+w	2+	B	阳性
8	0	0	0	0	0	0	2+	2+s	O	阳性
9	0	4+	0	0	0	0	2+	2+	B	阳性

检测卡凝集强度:0(阴性)、0.5+、1+、2+、3+、4+、s(strong)、w(weak)、mf(混合凝集);反定A₁c和Bc的RhD血型均为阳性。

表3 9例新生儿溶血3项(试管和IAT卡)结果

序号	DAT	游离试验	放散试验
1	4+	3+	4+
2	4+	3+	4+
3	4+	3+	4+
4	4+	3+	4+
5	4+	3+	4+
6	4+	3+	4+
7	4+	3+	4+
8	4+	3+	4+
9	4+	3+	4+

检测卡凝集强度:0(阴性)、0.5+、1+、2+、3+、4+、s(strong)、w(weak)、mf(混合凝集);反定A₁c、Bc、Oc的RhD血型抗原均为阳性;放散试验使用木瓜酶处理A₁c、Bc、Oc的细胞细胞。

3 讨论

HDFN是一种潜在的威胁生命的疾病,胎儿或新生儿的红细胞被动接受母体来源的红细胞同种抗体的破坏,可能导致胎儿流产、早产、贫血、黄疸、积液综合征、胎动减少、胎心增快甚至死胎等,可能导致新生儿免疫性溶血性贫血,肝脏肿大、脾脏肿大,水肿,甚至核黄疸或死亡等不良结局^[5]。由于抗D-HDFN的发病率和死亡率非常高,引起医学界的广泛关注,为了减少抗D-HDFN,欧美国家在1960年开始逐步应用RhD免疫球蛋白(RhIG)预防抗D-HDFN,发病率从未使用前的16.0%下降到0.3%,效果非常明显^[6]。国内至今尚无此类商品药物,我地区极少使用RhIG预防抗D-HDFN。

表 4 9 例患儿和母亲的实验室血清学检测(试管和 IAT 卡)结果

序号	母亲孕产史	母亲效价	患儿效价	母亲 Rh 表型	患儿 Rh 表型	母亲血浆抗体鉴定	患儿血浆和放散液抗体鉴定
1	G5P2	1 : 2048	1 : 512	ccdee	CcDee	抗-D	抗-D
2	G3P2	1 : 2048	1 : 2048	ccdee	ccDEE	抗-D	抗-D
3	G4P2	1 : 1024	1 : 1024	ccdee	CcDEe	抗-D	抗-D
4	G5P3	1 : 2048	1 : 512	ccdee	CcDEE	抗-D	抗-D
5	G3P2	1 : 1024	1 : 1024	ccdee	CcDEe	抗-D	抗-D
6	G3P1	1 : 2048	1 : 512	ccdee	CcDEe	抗-D	抗-D
7	G3P2	1 : 1024	1 : 1024	Ccdee	CCDEe	抗-D	抗-D
8	G3P1	1 : 2048	1 : 1024	ccdee	CcDee	抗-D	抗-D
9	G3P0	1 : 2048	1 : 1024	ccdee	CcDEe	抗-D	抗-D
均值	3.6/1.7	1934.2	967.1	/	/	/	/

/为未执行此项操作。

表 5 9 例新生儿溶血病的实验室指标(血浆/血清)和换血治疗结果

序号	发病时间/h	总胆红素 /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	间接胆红素 /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	血红蛋白 /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	血液选择		换血次数	住院天数/d	患儿结局
					红细胞	新鲜血浆			
1	4	153.8	138.6	89	O 阴性	AB 阳性	2	7	随访
2	6	127.4	113.5	128	A 阴性	A 阳性	3	8	痊愈
3	5	142.9	130.3	101	B 阴性	B 阳性	2	6	痊愈
4	6	136.0	125.8	96	O 阴性	AB 阳性	2	10	痊愈
5	5	128.3	111.5	110	O 阴性	AB 阳性	1	6	痊愈
6	7	118.1	102.7	132	O 阴性	AB 阳性	2	7	痊愈
7	14	53.4	41.8	168	/	/	0	15	痊愈
8	5	108.6	99.4	130	O 阴性	AB 阳性	2	9	痊愈
9	4	158.3	141.6	83	O 阴性	AB 阳性	2	8	痊愈
均值	6.2	125.2±31.3	111.7±30.2	115.2±6.9	/	/	1.4	8.4	/

/为未执行此项操作。

新生儿不规则抗体筛查及鉴定和新生儿溶血 3 项,是临床诊断新生儿溶血病(HDN)的重要依据,其中新生儿 DAT 和放散试验是直接证据。本次调研中发现,新生儿例 5 和例 7 还存在抗-B 抗体导致 HDN,换血选择上需考虑此因素。9 例新生患儿均是高效价 Rh-D 抗体(≥ 512),其 HDN 的发病率 100%,这与宋小川等^[7]报道本地区阴性孕妇主要为维吾尔族(RhD 阴性 5.22%),抗-D 效价达到 512 及以上 HDN 的发病率相一致,其中 8 例新生儿发生严重 HDN 且起病早,症状重,通过积极换血疗法、蓝光照射及肾上腺皮质激素等治疗,患者生命体征平稳达到出院标准,但有 1 例患儿起病晚,症状轻,通过蓝光照射及肾上腺皮质激素等相关治疗,患儿病情平稳痊愈出院。高效价 Rh-D 抗体并不总是与严重 HDFN 具有相关性,有时,一些轻微的 HDFN 患儿也抗体效价水平较高,而在一些严重的患儿抗体效价水平较低,而此患儿的发生可能由于母体存在竞争或阻断 FcR 的 HLA-DR 抗体,也可能是 IgG 亚类抗体的缘故。在严重的

HDN 中,换血疗法已经是很成熟的治疗。对于新生儿的换血次数、住院天数、患儿结局影响最直接的是血液制品和供给及时性,2 次换血可以去除 70%~90%的致敏细胞和 50%的总胆红素^[1],如在 HDN 起病初期,甚至到中期进行换血治疗,其结果比较乐观,但到后期即使执行换血治疗其疗效和并发症,结果不容乐观,例 1 的患儿虽然出院但是仍要密切观察及时随访。

红细胞 RhD 抗原遮蔽现象,是抗体(抗-D)过剩的前带现象,即抗原空间位置被抗体阻断,无法与单克隆抗体试剂结合,从而导致血型假阴性的结果。正常情况下,每个 RhD 阳性红细胞上 D 抗原密度为 15 000~33 000 个,但也有抗原密度从十几到几千,这取决于基因单倍型^[8]。高效价抗体产生可能是多个因素,极其复杂的过程,但可能主要有 2 个因素,第一母体被致敏及对抗原易感;第二抗原异源性的程度,即在应答个体中外源性给予的蛋白质与其最接近的同源物之间的氨基酸(AA)序列异质性的数量,是免疫原性的最重要决定因素之

—^[9]。本次回顾性研究中母亲的怀孕和妊娠次数为3.6/1.7次,均为多次怀孕,且有不良妊娠史,由于是回顾性调查无法获知不良妊娠原因;母亲效价与新生儿效价为1934.2/967.0,母亲高效价是产生抗原遮蔽现象的前提,这与Wang等^[10],刘玉敏^[11]报道相一致,但IgG抗体亚型组合与胎盘通过率,都决定新生儿体内的抗体含量,具有一定的量差。在全自动血型仪鉴定ABO及RhD血型中,出现致敏红细胞(通常Control阳性)导致血型鉴定困难的情况时有发生,解决办法就是三洗红细胞并盐水试管法重新复查,因为IgG抗体在盐水试管方法中不会产生明显凝集(认识局限),新生儿ABO及RhD血型鉴定中却又遇到新问题,在高效价IgG抗体致敏红细胞前提下,用这种方法复查血型可能得到错误结果。新生儿案例4是引起重点关注的第一个案例,起因是临床医生质疑血型结果与临床症状不相符,补充红细胞热放散和二磷酸氯喹放散试验,加做酸放散液抗体鉴定,综合各项数据进行分析确定结果有误,Fung等^[1]报道4个月以内的新生儿,不需检测ABO反定试验,但通过长期结果观察发现,反定细胞格局和凝集强度可以提供重要信息,初步判定是由ABO抗体和(或)不规则抗体影响,预测新生儿溶血3项结果。通常全自动血型仪鉴定ABO及RhD血型,非正常格局都会给予提示,复查血型并手动编辑结果,但新生儿案例1又给我们提出新的问题,其血型(Control阴性)和不规则抗体筛查格局与正常血型基本相符,这对今后的工作具有警示作用。

综上所述,对于高效价RhD抗体导致RhD抗原遮蔽现象的出现,首先制定标准操作流程,再次加强输血科的培训,对于临床质疑的结果必须给予足够重视。鉴于本地区的人口比例和多次妊娠的现状,提高产前检查覆盖率,期待RhIG商品药物早日获批,减少由抗体导致HDFN的发病率。

参考文献

[1] Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, et al. Technical Manual[M]. 19th ed. Bethesda: American Association

of Blood Banks(AABB),2017;317-592.

[2] Webb J, Delaney M. Red Blood Cell Alloimmunization in the Pregnant Patient[J]. Transfus Med Rev, 2018, 32(4):213-219.

[3] Dorn I, Schlenke P, Härtel C. Prolonged anemia in an intrauterine-transfused neonate with Rh-hemolytic disease: no evidence for anti-D-related suppression of erythropoiesis in vitro[J]. Transfusion, 2010, 50(5): 1064-1670.

[4] 高婉卿,郑必霞,杨劲,等.新生儿Rh溶血病与IgG1、IgG3相关性分析[J].安徽医科大学学报,2019,54(5):789-792.

[5] Zwiers C, van Kamp I, Oepkes D, et al. Intrauterine transfusion and non-invasive treatment options for hemolytic disease of the fetus and newborn-review on current management and outcome[J]. Expert Rev Hematol, 2017, 10(4):337-344.

[6] Andersson L, Szabo F. The incidence and outcome of clinically significant antibodies detected in Rhesus-D positive pregnant women of the Northern Territory [J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2018, 58(5): 514-517.

[7] 宋小川,居敏,许洁,等.新疆地区RhD阴性孕妇血清IgG抗-D筛查与效价检测的分析[J].中国输血杂志, 2015,28(11):1374-1376.

[8] Jakobsen MA, Nielsen C, Sprogøe U. A case of high-titer anti-D hemolytic disease of the newborn in which late onset and mild course is associated with the D variant, RHD-CE(9)-D[J]. Transfusion, 2014, 54(10): 2463-2467.

[9] Howe JG, Stack G. Relationship of epitope glycosylation and other properties of blood group proteins to the immunogenicity of blood group antigens [J]. Transfusion, 2018, 58(7):1739-1751.

[10] Wang H, Chen J, Jiang Y. A Case of a Newborn With Blocked RhD Antigen and HDFN[J]. Lab Med, 2017, 48(4):381-383.

[11] 刘玉敏. RhD新生儿溶血病D抗原遮蔽的实验室诊断及治疗效果的观察[J].临床血液学杂志, 2019, 32(8):590-592.

(收稿日期:2020-10-27)