

• 检验医师病例辨析 •

高效价抗-D 抗体导致新生儿 RhD 抗原遮蔽的处理方法及输血策略

骆园园 沈雨青 苏奶助 龚君顺 符虹 卢春敬 郑艳玲

作者单位: 361003 福建厦门, 厦门大学附属妇女儿童医院(厦门市妇幼保健院)输血科(骆园园、沈雨青、苏奶助、龚君顺、符虹、卢春敬)

361003 福建厦门, 厦门大学附属第一医院输血科(郑艳玲)

通信作者: 沈雨青, Email: syuqing@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2023.03.028

【摘要】 目的 分析 1 例 RhD 阴性母亲产生高效价免疫球蛋白 G (IgG) 抗-D 抗体致新生儿 RhD 抗原遮蔽的血清学特点, 讨论溶血病患儿的救治及输血对策。**方法** 采用盐水法、微柱凝胶卡法、热放散及酸放散试验和基因测序等方法检测患儿血型; 对患儿血液样本进行溶血病三项试验; 采用试管法对母亲和患儿进行抗体鉴定和抗体效价检测; 采用 IgG 分型试剂鉴定致病抗体 IgG 类型。**结果** 患儿直接抗球蛋白试验阳性, 血型初次鉴定为 O、dceEe, 采用酸放散试剂处理红细胞后与抗-D 试剂发生凝集。患儿 RhD 基因检测结果为 RhD⁺/RhD⁻ 杂合型 (阳性), 确诊母亲和患儿的血型分别为 O、dceee 和 O、DccEe。母亲及患儿血清中均存在 IgG1 和 IgG3 抗-D 抗体, 抗体效价均高达 2 048。患儿于 24 h 内及时接受换血治疗, 病情得到有效控制。**结论** 高效价的 IgG 抗-D 抗体能完全遮蔽新生儿 D 抗原, 可采用酸放散试剂处理红细胞鉴定抗原, 通过血型基因检测进行验证, 避免误判血型。因此对 RhD 阴性孕产妇早期进行血型鉴定, 纳入高危妊娠管理, 并提高实验室的检测水平, 对可能发生新生儿溶血病胎儿的救治具有非常重要的临床意义。

【关键词】 新生儿溶血病; 抗原遮蔽; 免疫球蛋白 G; 酸放散试验; 血型基因检测

基金项目: 福建省厦门市医疗卫生指导性项目 (3502Z20209206)

Treatment method and blood transfusion strategy for neonatal RhD antigen masking caused by high titer anti-D antibody

Luo Yuanyuan, Shen Yuqing, Su Naizhu, Gong Junshun, Fu Hong, Lu Chunjing, Zheng Yanling. Department of Blood Transfusion, Women and Children's Hospital, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian, China (Luo YY, Shen YQ, Su NZ, Gong JS, Fu H, Lu CJ); Department of Blood Transfusion, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian, China (Zheng YL)

Corresponding author: Shen Yuqing, Email: syuqing@163.com

【Abstract】 Objective To analyze the serological characteristics of neonatal RhD antigen masking caused by high titer immunoglobulin G (IgG) anti-D antibody produced by RhD-negative mother, and discuss the treatment of hemolytic disease and blood transfusion strategies in children. **Methods** The blood types of the children were detected by saline method, microcolumn gel card method, heat dissipation and acid dissipation test, and gene sequencing. Three tests of hemolytic disease were performed on blood samples of children. The antibody identification and antibody titer detection of mothers and children were carried out by the test tube method. The type of pathogenic antibody IgG was identified using IgG typing reagents. **Results** The child's direct antiglobulin test was positive, the initial blood type was O and dceEe, and the red blood cells were agglutinated with the anti-D reagent after treatment with acid-releasing reagent. The child's RhD gene test result was RhD⁺/RhD⁻ heterozygous (positive), and the blood types of the mother and child were O, dceee and O, DccEe, respectively. There were IgG1 and IgG3 anti-D antibodies in the serum of mother and child, and the antibody titer was as high as 2 048. The child was treated with transfusion in time within 24 hours, and the condition was effectively controlled. **Conclusions** The high titer of IgG anti-D antibody could completely conceal the D antigen of newborns. The red blood cells are treated with acid dispersal to identify the antigen and verified by blood group genetic testing to avoid misjudgment of blood type. Therefore, the early blood typing of RhD-negative pregnant women, the inclusion of high-risk pregnancy management, and the improvement of laboratory testing levels are of very important clinical significance for the blood transfusion treatment of hemolytic disease of newborn in the fetus.

【Key words】 Hemolytic disease of newborn; Antigen masking; Immunoglobulin G; Acid release test; Blood type gene detection

Fund Program: Medical and Health Guidance Project of Xiamen City, Fujian Province (3502Z20209206)

RhD 血型不合导致的新生儿溶血症(hemolytic disease of newborn, HDN)通常发生在第二胎及以后,一般病情严重,很容易导致胎儿出现黄疸、贫血、水肿、肝脾肿大,甚至死胎或新生儿死亡等,如治疗不及时,病死率极高^[1]。然而由于血液成分复杂多变,其中的纤维蛋白、药物或相关抗体都可能干扰检测结果^[2-3],因此如何准确鉴定血型 and 快速有效地确诊致病抗体类型对患儿的临床救治尤为关键。我们在工作中遇到了 1 例抗 -D 效价高达 2 048 的孕妇,新生儿出生后发生重度 HDN 并出现 RhD 抗原遮蔽现象,导致常规 RhD 抗原检测方法所得结果为阴性,通过酸放散试验和血型基因检测确诊患儿血型,及时配型换血使其成功获救,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患儿为女性,出生 6 h 后因皮肤黄染进行黄疸相关检测,总胆红素(total bilirubin, TBil) 382.89 $\mu\text{mol/L}$ 。母亲血型为 RhD 阴性,有妊娠史,无输血史。因患儿外院初检 ABO 和 RhD 同血型而出现其他病情无法解释的速发高胆红素血症而送检至本院。本研究已通过本院伦理委员会审批(审批号: KY-2023-088-K01)。

1.2 仪器与试剂 THZ-82 恒温震荡水浴箱(常州国华仪器有限公司), KA-2200 细胞洗涤离心机(久保田中国投资有限公司), 孵育器及离心机(北京斑珀斯技贸有限责任公司), Lab-Aid 824s 全自动核酸检测仪(厦门致善生物科技股份有限公司), IH1000 全自动血型检测仪(伯乐生命医学产品上海有限公司)。单克隆抗 -A、抗 -B(批号: 20201016)、抗 -D(批号: 20201810)、抗 -E(批号: 20203201)、抗 -e(批号: 20203301)、抗 -C(批号: 20203001)、抗 -c(批号: 20203101)、多特异性抗 -IgG、C3d(批号: 20201016)、抗体筛选细胞(批号: 20217014)均由上海血液医药有限责任公司提供; 抗体鉴定谱细胞(荷兰三昆试剂有限公司, 批号 8000452946), ABO/Rh 正反定型血型定型试剂卡(达亚美有限责任公司, 批号 50093.91.16), 微柱凝胶卡(北京斑珀斯技贸有限责任公司, 批号: 21072.01), 血液基因组 DNA 提取试剂(厦门致善生物科技股份有限公司, 批号: 21060901), Rh 血型分型检测卡(江苏力博医药生物技术股份有限公司, 批号: 202102014), 红细胞放散液(珠海贝索生物技术有限公司, 批号: 20201014), 人类红细胞 RhD 基因分型试剂盒(天津秀鹏基因科技有限公司, 批号: K210525002), BX1020 抗 IgG1、

抗 vG3 抗人球蛋白检测卡(长春博迅生物技术有限公司)。

1.3 血清学检测

1.3.1 血型鉴定、新生儿溶血病检测、抗体鉴定及抗体效价检测 ABO 血型鉴定、Rh 血型鉴定、Rh 血型分型、直接抗球蛋白试验、新生儿溶血病、抗体筛选与鉴定、抗体效价检测中使用的盐水试管法、聚凝胺法、抗人球蛋白法均参照输血科(血库)临床技术操作规范操作^[4]。不同品牌的凝胶卡及酸放散试剂使用方法参考试剂说明书。

1.3.2 患儿红细胞热放散处理 配制浓度为 1% 的患儿红细胞,用 37 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水洗涤 3 次后,于 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中热放散 10 min,取出后再用 37 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水洗涤 3 次,配制浓度为 3% 的红细胞与 IgM 抗 -D 试剂,采用盐水试管法检测 RhD 抗原。

1.3.3 患儿红细胞酸放散处理 酸放散试剂使用步骤参见试剂说明书。酸放散处理后的红细胞配制成 3% 浓度,用 37 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水洗涤至少 8 次,以洗涤液由淡红色转为清亮为节点,再配制成 3%~5% 红细胞后,采用 IgM 抗 -D 试剂和盐水试管法检测红细胞 RhD 抗原。

1.4 血型基因的分子生物学鉴定 采用全自动核酸检测仪提取 DNA,送检天津秀鹏生物有限公司,采用跨越断裂点聚合酶链反应(gap-polymerase chain reaction, GAP-PCR)分析 RhD 基因盒子,再进一步采用基因测序方法检测血型,具体检测方法步骤参见文献[5-6]。

1.5 抗体 IgG 分型检测 样本送检长春博迅生物技术有限公司,具体检测步骤参见文献[7]。

2 结果

2.1 患儿 RhD 抗原血清学鉴定 采用酸放散试验处理红细胞后,结果为 RhD 抗原阳性(2+)。见表 1。

表 1 不同方式处理红细胞后与抗 -D 试剂反应结果

试剂	未处理红细胞		热放散处理红细胞		酸放散处理红细胞
	盐水试 管法	微柱凝 胶卡法	盐水试 管法	微柱凝 胶卡法	盐水试管法
IgM 抗 -D 试剂	0	0	0	0	2+

注: IgM 为免疫球蛋白 M

2.2 分子生物学鉴定 患儿的 RhD 血型基因为 RhD⁺/RhD⁻ 杂合型(阳性)。

2.3 血型鉴定结果 母亲和患儿的血型鉴定结果分别为 O、dcee 和 O、DccEe。

2.4 抗体鉴定 将母亲和患儿的血浆及放散液分

表 2 母亲与患儿抗体鉴定表

序号	Rh-Hr						kell						Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Luther		Xg	实验结果(血清)				
																											母亲		患儿		
	C	D	E	c	e	C ^w	K	k	Kp ^a	Kpb	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P1	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Xg ^a	盐水	AHG	盐水	AHG	放散
1	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	3+	0	3+	4+
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	/	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	3+	0	3+	4+
3	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	/	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	3+	0	3+	4+
4	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	/	+	0	0	+	0	+	0	w	+	0	0	+	0	+	0	0	3+	0	3+	4+
5	+	0	0	0	+	0	0	+	0	+	/	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0
6	0	0	0	+	0	0	0	+	0	+	/	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	+	0	+	0	0	+	/	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0
8	0	0	0	0	+	0	+	0	0	+	/	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	+	0	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	+	0	+	+	0	+	/	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0
11	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+	0	3+	0	3+	4+
12	w	+	+	+	0	0	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	3+	0	3+	4+
13	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	/	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0
14	0	+	+	+	0	0	0	+	0	+	/	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	0	3+	0	3+	4+
15	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	/	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	w	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0

注: Rh-Hr 为 Rh 血型抗原检测, AHG 为抗人球蛋白试剂, + 为阳性, w 为弱阳性, / 为未检测

别与抗体鉴定谱细胞进行反应,结果显示母亲和患儿血清中均存在抗-D,反应格局见表 2。

2.5 抗体效价结果 母亲及患儿 IgG 抗-D 效价测定结果均为 2 048。

2.6 致病抗体 IgG 分型 母亲和患儿体内存在高效价 IgG1 和低效价 IgG3 抗体。

2.7 患儿换血及输血前后血红蛋白(hemoglobin, Hb)和 TBil 水平变化 患儿出生 6 h 内 Hb 仅为 82 g/L, TBil 为 382.89 μmol/L。使用 3 U 去白细胞悬浮红细胞(O 型, Rh 血型为 dcee)和 200 mL 血浆,于 24 h 内进行换血治疗。3 h 后复查 TBil 降为 221.5 μmol/L, Hb 升至 129 g/L,指标明显改善,与其他文献报道一致^[8]。持续进行光照和药物治疗,换血 48 h 后,复查 Hb 为 132 g/L。每日监测经皮胆红素,1 周后患儿体征平稳,已出院。

3 讨论

HDN 的发病率和严重程度除了与母亲 IgG 抗体效价呈正相关,也与致病抗体 IgG 类型相关^[9-11],一般认为 Rh 血型不合抗体效价在 16 时具有临床意义,需在孕期密切监测胎儿相关指标的变化^[12]。IgG 抗体是唯一能通过胎盘的抗体,胎盘上含有新生儿 Fc 受体(FcRn),IgG 可选择性地与 FcRn 结合,从而转运到胎儿的血液循环中^[13]。根据 r 链抗原性差异, IgG 抗体可分为 4 个亚型,在血浆中的浓度由高至低依次为 IgG1>IgG2>IgG3>IgG4^[14]。Rh 系统的血型抗体以 IgG1 和 IgG3 为主,而 IgG1、IgG3

较易通过胎盘,并具有细胞毒作用,可以促使巨噬细胞接触和吞噬红细胞,并促使 K 淋巴细胞、单核细胞破坏红细胞,因此由其引起的 HDN 发展迅速,溶血程度严重,病死率高^[15-16]。临床应积极对产前孕妇体内的 IgG1、IgG3 水平进行动态监测,为进一步保障 RhD 抗原阴性孕产妇生育和再次生育质量与输血安全,在《RhD 阴性孕产妇血液安全管理专家共识》^[17]中,制定详细的孕期抗-D Ig 使用指南,减少 RhD 阴性妇女由于怀孕、输血和有创诊疗导致的抗-D 抗体产生,降低孕产妇与围产儿死亡率。

本病例中,母亲体内的抗-D 效价高达 2 048,考虑与其多次妊娠相关。母亲为非厦门本地产妇,在初次妊娠时未能注射抗-D Ig 进行有效保护。腹中胎儿能存活至分娩,可能与胎盘的屏障作用、胎儿红细胞抗原强弱以及母体人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)抗体等因素有关。孕期胎儿体内的胆红素可经胎盘进入母体,由母亲肝脏处理后排出。当胎儿娩出后,新生儿产生的胆红素无法通过母体排出,而新生儿本身不成熟的肝脏缺少结合酶,导致其体内未结合胆红素升高,引起黄疸^[18]。也有可能是因为患儿母亲多次妊娠后,体内产生的抗 HLA 抗体封闭了胎儿巨噬细胞的 FcRn,阻止了胎儿致敏红细胞被破坏^[7]。胎儿分娩后,失去了母源性 HLA 抗体的保护,因此在出生 6 h 后 TBil 水平急速升至 382.89 μmol/L, Hb 降为 82 g/L。患儿血型鉴定采用盐水法、试管法、血型卡检测 RhD 抗原均

为阴性,鉴于其高胆红素血症的临床表现、直接抗人球蛋白试验强阳性,结合母亲及其血浆抗-D 效价为 2 048,考虑疑似出现 RhD 抗原“遮蔽现象”,即新生儿 D 抗原阳性红细胞完全被抗-D 抗体封闭,导致红细胞上没有 D 位点与血清试剂反应,从而呈现假阴性结果^[2]。本研究采用热放散处理患儿红细胞后进行 RhD 抗原检测,结果却仍为阴性,考虑是由于该患儿红细胞上高效价 IgG 型抗-D 抗体数量多,结合力强所致。因患儿病情危急,遂采取酸放散试剂对患儿红细胞进行洗脱,检测结果为 RhD 抗原阳性(2+)。在随后的血型基因检测中也证实该试验结果的准确性。根据患儿、母亲的血型和血站的血库情况急诊换血时,可直接选用 O、dccee 红细胞和血浆进行操作。

综上所述, RhD 阴性孕产妇应及早纳入高危妊娠管理系统,在孕期建立完备的产检资料,将 Rh 分型鉴定纳入必检项目,并持续定期监测 Rh 抗体效价。有文献指出常规检测 Rh 血型的必要性^[19],有条件的孕产妇应根据《RhD 阴性孕产妇血液安全管理专家共识》^[17]进行抗 D Ig 的预防注射。随着我国“三孩政策”的放开, RhD 阴性女性的妊娠概率将明显增高,医院在此类特殊孕产妇及新生儿的规范管理能力和实验室检测水平方面亟需加强。实验室应根据母婴就诊状况,及时选用合适的试剂和检测方法,快速正确地鉴定血型,为临床救治争取时间。有条件的实验室可根据 2021 年发布的《胎儿新生儿溶血病实验室检测专家共识》^[20]进行检测方法的指导,通过血型基因检测、孕母出血情况监测、IgG 亚型检测、母亲外周血非侵入性胎儿血型基因检测(cf-DNA)等方法来验证新生儿血型,预测胎儿血型,分析 HDN 的严重程度,制定个性化的诊疗方法,减少胎儿 HDN 的发病率,从而提高 HDN 新生儿的救治率。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- QUINN C T, EDER A F, MANNO C S. Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn [M]. San Diego: Academic Press, 2013: 423-425.
- 陆少燕,李洵璐,高家良. D 抗原遮蔽现象致新生儿 RhD 抗原假阴性的鉴定与分析 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25 (5): 91-92. DOI: CNKI:SUN:ZYAA.0.2017-05-040.
- 王丽娜,张勤,闫烨,等. 抗 M 抗体对新生儿溶血病实验室检测结果的影响:附 1 例病例分析 [J]. 实用检验医师杂志, 2018, 10 (3): 182-183, 186. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2018.03.017.
- 罗炎杰,高峰议. 输血科(血库)临床技术操作规范与标准化管理实用全书 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 97-100, 170-185.
- XIE H, YANG X, ZHU S, et al. A serologic weakly reactive RhD is caused by a novel RHD (c.722C>A, p.Thr241Asn) allele [J]. Transfusion, 2021, 61 (4): E31-E33. DOI: 10.1111/trf.16345.
- 宋艳艳,刘丽云,陈宣宇,等. 骨髓增生异常综合征致 RhD 抗原减弱 1 例分析 [J]. 中国输血杂志, 2020, 33 (2): 166-168. DOI: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2020.02.024.
- 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. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.027.
- 屈英晓. IgG 抗 E 抗体致新生儿溶血病换血成功 1 例 [J]. 实用检验医师杂志, 2018, 10 (4): 252-254. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2018.04.018.
- 王海娟,袁佳,凤婧,等. 高效价抗-D 致双胎新生儿 D 抗原遮蔽合并 HDFN 1 例 [J]. 中国输血杂志, 2017, 30 (8): 954-956. DOI: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.08.031.
- MOISE K J. Hemolytic disease of the fetus and newborn [J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2013, 11 (10): 664-666.
- 侯玉涛,童书青,刘凯,等. Rh 系统新生儿溶血病与 IgG 抗体亚类的相关性研究 [J]. 中国输血杂志, 2017, 30 (4): 366-368. DOI: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.04.013.
- 王婧,潘家华. 母婴 Rh 血型不合溶血病的诊治进展 [J]. 中国新生儿科杂志, 2016, 31 (2): 152-155. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6710.2016.02.019.
- 龚非力. 补体系统医学免疫学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 49-58.
- 毛雨生,汪意珍,吴静,等. IgG 型抗-D 引起的新生儿溶血病 1 例 [J]. 中国输血杂志, 2016, 29 (11): 1279-1280. DOI: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2016.11.024.
- VELKOVA E. Correlation between the amount of anti-D antibodies and IgG subclasses with severity of haemolytic disease of foetus and newborn [J]. Open Access Maced J Med Sci, 2015, 3 (2): 293-297. DOI: 10.3889/oamjms.2015.058.
- 叶海辉,黄洪海,王晓霖,等. 孕妇 IgG 效价与不同血型新生儿溶血并发症的相关性分析 [J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25 (5): 1532-1536. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2017.05.045.
- 《RhD 阴性孕产妇血液安全管理专家共识》制订协作组. RhD 抗原阴性孕产妇血液安全管理专家共识 [J]. 中国输血杂志, 2017, 30 (10): 1085-1091. DOI: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.10.001.
- 高海燕,马现君,王浩,等. RhD 新生儿溶血致 D 抗原的完全遮断 [J]. 临床血液学杂志(输血与检验版), 2016, 29 (3): 473-474. DOI: 10.13201/j.issn.1004-2806-b.2016.06.012.
- 王立人,段方. 手术备血常规 RH 抗原检测及自身输注 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9 (2): 120. DOI: CNKI:SUN:ZYXS.0.2002-02-032.
- 中国输血协会免疫血液学专业委员会. 胎儿新生儿溶血病实验室检测专家共识 [J]. 临床输血与检验, 2021, 23 (1): 20-23, 28. DOI: 10.3969/j.issn.1671-2587.2021.01.006.

(收稿日期: 2023-07-18)

(本文编辑: 邵文)