

• 论 著 •

96 例 Rh 血型抗体检测及分析*

方晓蕾,梅礼军,刘 锋,张 杰,禹 梅,陈 蕾
(安康市中心医院输血科,陕西安康 725000)

摘 要:目的 调查 Rh 血型抗体的检出率及其特异性分布特点,分析 Rh 血型抗体的临床意义及产生规律。方法 采用微柱凝胶抗球蛋白技术筛查和鉴定红细胞血型不规则抗体,对鉴定为 Rh 血型抗体者,采用单克隆抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e 鉴定红细胞 Rh 血型抗原,以确认抗体的准确性;检测抗体的效价、Ig 类型及 37 ℃ 反应性,以明确其临床意义;询问孕产史、输血史,如果为新生儿,检测其母亲血浆中是否有相同特异性的抗体,以分析抗体产生的原因。结果 就诊者 109 000 例,共检出 Rh 血型抗体 96 例,检出率为 0.088%,其中有妊娠史者 68 例,有输血史者 5 例,既有妊娠史又有输血史者 6 例,抗体来自母体的新生儿 17 例;抗体的特异性为:抗-E 65 例(67.710%)、抗-cE 12 例(12.500%)、抗-D 8 例(8.330%)、抗-c 7 例(7.291%)、抗-C 2 例(2.083%)、抗-e 2 例(2.083%);96 例 Rh 血型抗体均为 IgG,或 IgG+IgM 类,37 ℃ 均可与具有相应抗原的红细胞反应,抗体效价介于 4~2 048。结论 抗-D 的检出率呈逐步降低趋势;在检出的 Rh 血型抗体中,抗-E 和抗-cE 占绝大多数;妊娠和输血引起的同种免疫是 Rh 血型抗体产生的主要原因;新生儿自母体被动获得的 Rh 血型抗体是 Rh-新生儿溶血病最主要的致病抗体。

关键词:Rh 血型抗体; 不规则抗体; 新生儿溶血病; 微柱凝胶抗球蛋白试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.003 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)19-2782-03

Detection and analysis on 96 cases of Rh blood group antibody*
Fang Xiaolei, Mei Lijun, Liu Feng, Zhang Jie, Yu Mei, Chen Lei
(Department of Blood Transfusion, Ankang Central Hospital, Ankang, Shaanxi 725000, China)

Abstract: **Objective** To analyze the positive rate of specific distribution characteristics in Rh blood group antibody, analyze the clinical significance of Rh blood group antibody and rules. **Methods** The micro column gel anti globulin technique was used to screen and identify irregular red blood cell antibodies, for patients with Rh blood group antibody, monoclonal anti-D, anti-C, anti-c, anti-E, anti-e were used to identify Rh blood group antigen to confirm the accuracy of detection. The antibody titer, Ig-type and 37 ℃ reactive were used to determine its clinical significance. Through asking pregnancy history, history of blood transfusion, understanding whether the same specificity of the antibody in maternal plasma if the patient was newborn, the causes of antibody were analyzed. **Results** In 109 000 patients, Rh blood group antibodies were detected in 96 cases, the positive rate was 0.088%, which has a history of pregnancy in 68 cases, 5 cases had history of blood transfusion, both pregnancy history and history of blood transfusion in 6 cases, 17 cases of neonatal maternally derived antibody. Antibody specificity: 65 cases of anti-E (67.710%), 12 cases of anti-cE (12.500%), 8 cases of anti-D (8.330%), 7 cases of anti-c (7.291%), 2 cases of anti-C (2.083%), 2 cases of anti-e (2.083%). 96 cases of Rh blood group antibodies were IgG or IgG+IgM class, 37 ℃ reaction could be with the corresponding antigen of red blood cell, antibody titer between 4—2 048. **Conclusion** Anti-D detection rate shows a trend of gradually decreasing. In Rh blood group antibody detection, anti-E and anti-cE account for an absolute majority. Alloimmune caused by pregnancies and blood transfusion is the main reason of Rh blood group antibody production from Rh blood group antibody. Neonatal maternal passive getisa Rh-HDN is the main pathogenic antibody.

Key words: Rh blood group antibody; irregular antibody; hemolytic disease of the neonatus; microcolumn gel coombs experimentation

临床上除了 ABO 血型系统外, Rh 血型抗体也是重要的血型抗体。Rh 血型不合妊娠会产生新生儿溶血病(HDN); Rh 血型不合输血常引起免疫溶血性输血反应(HTR)。本研究历时 5 年,检测了 109 000 例就诊者的 Rh 血型不规则抗体,旨在了解本地区 5 种 Rh 血型抗体的检出率及分布情况,为预防 HTR 及 HDN 提供依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 1 月至 2014 年 6 月,本院住院部及门诊就诊患者 109 000 例,其中男 53 630 例,女 55 370 例,年龄 1 d 至 92 岁。

1.2 仪器与试剂 仪器为瑞士达亚美生产专用孵育器、离心

机及微柱凝胶抗球蛋白卡。上海市血液生物技术有限公司生产的二巯基乙醇(2-Me)、单克隆抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e 及 I、II、III 3 支装不规则抗体筛选细胞和 10 支装谱红细胞。

1.3 方法

1.3.1 不规则抗体筛查 采用微柱凝胶抗球蛋白技术,使被检者血清与抗筛细胞反应,检查血型不规则抗体。将被检者 3 mL 血标本离心分离,分别取血清 50 μL,加入到微柱凝胶卡相应 3 孔中,然后依序加入 I、II、III 号筛选红细胞 50 μL,孵育 15 min,离心 10 min 观察反应结果。被检者血清与 I、II、III 号筛选红细胞都无凝集者为阴性,与任何一号抗筛红细胞有凝集者为阳性。

* 基金项目:陕西省科技厅科研课题项目(2013AKZD03-07)。 作者简介:方晓蕾,男,主管检验师,主要从事输血管理、临床输血及血清免疫学研究。

1.3.2 不规则抗体特异性鉴定与确定 采用微柱凝胶抗球蛋白技术。将红细胞血型不规则抗体筛查结果为阳性的标本设为研究对象,取其血清 50 μL ,加入到标示清楚的微柱凝胶卡相应孔中,再分别加入 50 μL 10 支谱细胞及自身红细胞(浓度均为 2%),孵育反应 10 min 后,离心判读结果。与自身红细胞不凝集,与任何一个谱细胞或数个谱细胞凝集者,根据与谱红细胞的反应格局判定抗体的特异性,确认为相应抗体。对鉴定为抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e、抗-Ec 者,采用单克隆抗血清试剂分别检测其血型抗原,以确认所检抗体的准确性,并询问孕产史、输血史。

1.3.3 5 种不规则抗体类型及效价鉴定 取检出抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e 的血清各 100 μL 加入等量 2-Me 后密封,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后,取 2-Me 中和后抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e 血清,用生理盐水倍比稀释,用有相应 Rh 血型抗原的红细胞反应检测其效价,效价与 2-Me 处理前无变化者,为 IgG 类抗体;效价与 2-Me 处理前有所降低,但仍有反应者为 IgG+IgM 抗体;2-Me 处理后与具有相应血型抗原的红细胞无反应者为 IgM 类抗体。

1.3.4 新生儿血型血清学试验 对检出抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e 的新生儿,做红细胞直接抗球蛋白试验(DAT)及红细胞放散试验,鉴定 Rh 血型,并鉴定放散液中的抗体及其特异性。

1.4 统计学处理 采用 Excel2007 软件进行数据处理及统计学分析。

2 结果

2.1 不规则抗体检出率及分布情况 109 000 例就诊者中,检出抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e、抗-Ec 者共 96 例,检出率为 0.088%,其中男 27 例,占被检男性 0.050%,女 69 例,占被检女性的 0.125%。检出抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e 的 96 例患者中,79 例为成人(占 82.29%),17 例为出生 1~3 d 的新生儿,占 17.71%。79 例检出抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e 的成人中,有妊娠史者 68 例,占 86.075%,其中孕妇 52 例,占 65.823%;有输血史者 5 例,占 6.329%;既有妊娠史又有输血史者 6 例,占 7.595%。17 例新生儿的抗体均来自母体,其母亲均为以上检出抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e 抗体的孕妇,新生儿抗体特异性与其母亲抗体特异性完全一致,新生儿 DAT 及红细胞放散试验均为阳性,符合 Rh-HDN 诊断,占同时期检出的 26 例 Rh-HDN 患儿的 65.545%。52 例 Rh 血型抗体阳性的孕妇中除 17 例所产新生儿被诊断为 Rh-HDN 外,另有 3 例发生了宫内死胎,1 例多次习惯性流产,1 例出现 2 次以上晚期妊娠终止(孕龄大于 7 个月),其余 4 例孕妇 Rh 血型抗体效价均小于或等于 16,所产新生儿血浆中均未检出 Rh 血型抗体。除新生儿外,既无妊娠史又无输血史者有 1 例检出 Rh 血型抗体,其原因尚不明确。

2.2 不规则抗体分布的特异性 检出抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e、抗-Ec 抗体共 96 例,其特异性分布为抗-E 65 例(67.710%)、抗-D 8 例(8.330%)、抗-cE 12 例(12.500%)、抗-c 7 例(7.291%)、抗-C 2 例(2.083%)、抗-e 2 例(2.083%)。

2.3 不规则抗体的效价及特性 检出的 47 例抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e、抗-Ec 抗体效价介于 4~2 048,其中效价为 2 048 者 2 例(均为抗-D),效价为 1 024 者 4 例(抗-D、抗-E、抗-c、抗-cE 各 1 例),效价为 512 者 7 例(抗-D 5 例、抗-E 2 例),效价为 256 者 6 例(均为抗-D),效价为 128 者 10 例(均为抗-cE),效价为 64 者 7 例(均为抗-E),效价为 32 者 15 例(抗-D 6 例、抗-E 7

例、抗-cE 2 例),效价介于 4~16 者 45 例(抗-E 19 例、抗-D 14 例、抗-cE 6 例、抗-c 4 例、抗-C 2 例)。96 例抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e 抗体均为 IgG,或 IgG+IgM,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 均可与具有相应抗原的红细胞反应。

3 讨论

在人类已经发现的 30 多个红细胞血型系统中,Rh 血型系统是最为复杂的血型系统,其表达的血型抗原多达 53 个^[1],其中 D 抗原性最强,其次为 E、C、c、e 等,因输血或妊娠等同种免疫产生同种抗体,当再次 Rh 血型不相容输血或妊娠,就可引起严重的 HTR 及 HDN^[2]。在临床输血中 Rh 血型相容性的意义仅次于 ABO 血型,而由于 Rh 血型抗原表位是多肽,在胎儿出生时已发育成熟,与相应的 IgG 抗体亲和力较强,严重的 HDN 病例多由 Rh 血型抗体引起,在 HDN 的发病方面,Rh 血型抗体较 ABO 血型抗体更为重要^[3]。因此,调查 Rh 血型抗体的检出率及特异性分布情况,了解 Rh 血型抗体产生的规律对预防 HTR 及 HDN 具有重要的临床意义^[4]。

本研究中 109 000 例就诊者 Rh 血型抗体的检出率为 0.088%,抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e 抗体所占比率依次为:抗-E(67.710%)、抗-cE(12.500%)、抗-D(8.330%)、抗-c(7.291%)、抗-C(2.083%)、抗-e(2.083%)。本研究中抗-E 的比率较高,抗-D 的比率较低,这可能是因为国内人群 Rh(E)阴性频率远高于 Rh(D)阴性频率,Rh(E)阴性输血又没纳入到临床输血技术规范中来,Rh(E)同种免疫概率较高而又没有采取有针对性的预防措施^[5]。

输血和妊娠是产生红细胞血型免疫抗体的重要原因。本研究中检出的 96 例 Rh 血型抗体中,除 17 例新生儿抗体来自母体外,79 例成人均有妊娠史或输血史,抗体来自母体的 17 例 Rh-HDN 患儿占同期检出 Rh-HDN 患儿的 65.545%,而其他所有无妊娠史及输血史的被检者中均未检出 Rh 血型抗体。表明妊娠和输血引起的同种免疫是 Rh 血型抗体产生的原因,新生儿自母体被动获得的 Rh 血型抗体是 Rh-HDN 最主要的致病抗体。

本研究中采用微柱凝胶抗球蛋白技术检出的 96 例 Rh 血型抗体均为 IgG 类,或 IgG+IgM 类,并且在 37 $^{\circ}\text{C}$ 都可与相应抗原发生凝集反应,表明所检出的 Rh 血型抗体均具有临床意义。除血型抗体的 Ig 类型及 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应性外,红细胞血型抗体的效价与临床意义也密切相关,抗体效价越高致敏红细胞的能力越强,其导致 HTR 及 HDN 的程度也越严重。研究中检出 52 例孕妇血浆中有 Rh 血型抗体,其中 3 例发生了宫内死胎,1 例多次习惯性流产,1 例出现 2 次以上晚期妊娠终止(孕龄大于 7 个月),分娩的新生儿有 17 例被证实其红细胞被来自母体的 Rh 血型抗体致敏,其余 4 例红细胞未被抗体致敏的新生儿母亲血浆 Rh 血型抗体效价均小于或等于 4。因此对检出 Rh 血型抗体的孕妇进一步检测 IgG 抗体的效价,可为评估胎儿发生 HDN 的严重程度、制定合理的干预措施提供参考^[6]。

国内 1981~2012 年报道的 HTR 及 HDN 病例中由抗-D 引起的病例高达 48.38%(224/463)^[7],而本研究抗-D 只占检出 Rh 血型抗体的 8.33%,这是因为近年来我国实行了 Rh(D)相容性输血,绝大多数 Rh(D)阴性受血者都能接受 Rh(D)阴性血的输注,因输血所致同种免疫性抗-D 越来越少;另一方面,中国实行计划生育政策,育龄妇女的平均妊娠次数减少也可能是 Rh 血型抗体检出率较低的原因之一。但值得重视的是,随着抗-D 检出率的逐渐减少,抗-E 及抗-cE 已成为最常见的 Rh 血型抗体,由抗-E 及抗-cE 致 HTR 及(下转第 2786 页)

3 讨 论

本研究建立了一种采用干血斑进行地贫基因检测的方法,并对干血斑洗脱条件和基因组 DNA 提取方法做了优化。采用此方法可以准确、方便、快捷地进行干血斑标本的地贫基因检测,适用于临床使用的多种地贫基因检测方法。干血斑标本在常温下可以稳定保存,保存 9 个月后依然可以稳定地进行地贫基因检测。该方法为地贫基因检测提供了一种方便的标本采集方式,特别适用于标本采集困难的检测对象,如新生儿,也是基层医院和边远山区的地贫基因标本转诊的理想方式。

干血斑采集血液标本具有很多优点:需要标本量少;便于采集,末梢血即可;占用空间小,无需低温保存,便于运输,快递邮寄即可;血斑干燥后,生物危害性减低。所以干血斑标本采集方式已广泛应用于苯丙酮尿症(PKU),先天性甲状腺功能减低症(CH)等新生儿筛查项目^[4],另外在新生儿 HIV 抗体和核酸^[5-7]、巨细胞病毒(CMV)DNA 等检测中也发挥了重要作用^[8-9]。

一种分子诊断方法是否适用于干血斑标本取决于该方法对核酸浓度(总量)和质量的要求。目前,临床地贫基因检测试剂盒由于其检测体系较为复杂,对核酸的浓度和质量要求较高,生产厂家基本上都没提供干血斑标本的检测方式。保证干血斑提取 DNA 的浓度和质量的关键步骤是干血斑打孔后的洗脱,本研究结果显示,55 ℃振荡洗脱 1 h 可以达到较好的洗脱效果;而洗脱时间太长则容易导致提取的 DNA 质量差或试验失败,这可能与本研究采用磁珠法提取 DNA 有关,由于制备干血斑的滤纸片含有大量纤维素,干血斑浸泡时间长会导致滤纸纤维大量脱落在洗脱液中,对后续磁珠吸附 DNA 的过程造成严重影响,可能导致 DNA 质量差或试验失败。另外,本研究将提取 DNA 用的血斑数量增多,但得到 DNA 的量并没有明显提高,究其原因是血纸片洗脱时,在同样体积的洗脱缓冲液中圆纸片越多,洗脱的效率越差;另外滤纸片具有很强的吸水性,圆纸片越多将造成洗脱后上清液的损失量增大。所以,在对干血斑进行基因组 DNA 提取时,一定要结合选取的 DNA 提取方法对干血斑的洗脱方法进行优化。

目前,临床实验室主要采用的都是商品化的 DNA 提取试剂盒,各种不同的试剂盒的 DNA 提取质量和效率有差别。要从干血斑中获得高质量和高浓度的基因组 DNA,试剂盒的选择也非常关键。本研究也采用了多种磁珠法的试剂盒,提取的 DNA 质量差别很大,本研究选用的这种磁珠可以得到高质量的 DNA,并且这种基于磁珠的方法可以应用在自动核酸提取工作stations上,大大地提高了干血斑标本提取 DNA 的效率,特别适合大样本批量检测。

干血斑提取 DNA 的第一步是采用打孔设备打下血斑圆纸片,由于打孔设备不是采用一次性刀头,所以需要注意标本间的交叉污染。本研究结果显示,打孔仪在正常使用情况下,

在对不同的干血斑进行连续打孔不会造成标本间的地贫基因检测的交叉污染,这也可能与地贫基因检测灵敏度有关,即使刀头上有少许的滤纸纤维残留,提取 DNA 后也无法检测出来。要防止标本间交叉污染,打孔设备的清洁尤为重要,所以为避免干血斑间的交叉污染,必须对打孔设备经常清洁,并定期维护保证其能正常稳定工作。

近年来,地贫防控工作得到了各级政府的高度重视,在广东、广西和海南等省正在实施政府为主导的地贫防控项目^[10]。由于地贫基因检测在基层单位尚难普及,所以地贫防控中的一项重要工作就是建立地贫基因标本转诊网络。干血斑由于标本采集和运输方便,将是地贫基因标本转诊的首选方式。另外,现在不少单位已在新生儿中采用干血斑进行血红蛋白地贫筛查,对于筛查阳性的标本可以直接采用干血斑进行地贫基因诊断,不用再次采集标本。采用干血斑进行地贫基因检测的方法将在地贫标本转诊网络建设中发挥重要的作用。

参考文献

- [1] 徐湘民.地中海贫预防控制操作指南[M].北京:人民军医出版社,2011.
- [2] Yin A, Li B, Luo M, et al. The prevalence and molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China[J]. PLoS One, 2014, 9(2): 89855.
- [3] 李亚红, 梁玉全, 岑妙珍, 等. 地中海贫基因携带者产前筛查及实验室指标的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(8): 673-677.
- [4] 马燮琴, 孙文英, 李小雅, 等. 滤纸干血斑新生儿三种遗传代谢病筛查(广州地区初步报)[J]. 广州医药, 1992, 23(2): 24-27.
- [5] Varnier OE, Lillo FB, Reina S, et al. Whole blood collection on filter paper is an effective means of obtaining samples for human immunodeficiency virus antibody assay[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1988, 4(2): 131-136.
- [6] Evengard B, Ehrnst A, von Sydow M, et al. Effect of heat on extracted HIV viral infectivity and antibody activity using the filter paper technique of blood sampling[J]. AIDS, 1989, 3(9): 591-595.
- [7] Cassol S, Gill MJ, Pilon R, et al. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA from dried plasma spots collected on filter paper[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(11): 2795-2801.
- [8] Shibata M, Takano H, Hironaka T, et al. Detection of human cytomegalovirus DNA in dried newborn blood filter paper[J]. J Virol Methods, 1994, 46(2): 279-285.
- [9] 孟璐璐, 王琳琳, 宴亚玲, 等. 巢式 PCR 检测滤纸血片 CMV DNA 方法的建立及评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(16): 1990-1992.
- [10] 张小庄, 冯占春, 叶宁. 地中海贫血的预防控制[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014.

(收稿日期: 2015-06-20)

(上接第 2783 页)

HDN 的报道较多, 是否有必要同预防抗-D 一样采用 Rh(E) 相容输血有待研究。

参考文献

- [1] 杰夫·丹尼尔. 人类血型[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 232.
- [2] 王培华. 输血技术学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 160.
- [3] Marion ER, Ragnhid O, Marsh WL. The clinical significance of alloantibodies of blood group system[J]. Semin Hematol, 2000, 37(2): 197-203.
- [4] 张杰, 方晓蕾, 禹梅, 等. Rh 血型系统在安全输血中的意义[J]. 河

北医学, 2013, 19(2): 302-304.

- [5] 吴远军, 刘兴玲, 刘彦慧, 等. 孕妇 IgG 类红细胞血型不规则抗体对早期诊断 Non-ABO-HDN 的意义[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(6): 406-408.
- [6] 方晓蕾. 与丈夫血型不合 O 型和/或 RhD(-) 孕妇产前血型免疫学抗体与 HDN 的关系[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(2): 122-123.
- [7] 陈忠, 张莉尼. 溶血性输血反应与非 ABO 新生儿溶血病不规则抗体的综合分析[J]. 临床检验杂志, 2001, 19(6): 377-378.

(收稿日期: 2015-05-25)