

• 综 述 •

新生儿溶血病产前诊断的研究现状和进展

刘榕孜 综述, 刘 峰[△] 审校

广西医科大学第一附属医院输血科, 广西南宁 530021

摘 要: 胎儿及新生儿溶血性疾病(HDFN)是由于母体先天或后天出现针对胎儿及新生儿红细胞抗原的致病性抗体,通过胎盘进入胎儿及新生儿体内引起的同种免疫性溶血。当前针对 HDFN 的妊娠管理包括产前孕妇及配偶血型表型鉴定、母体致病性抗体的检测及其效价滴定,高风险时进行羊膜穿刺等侵入性诊断操作或实施宫内输血治疗。目前已出现许多新技术,非侵入性诊断技术如利用孕妇外周血胎儿游离 DNA (cff-DNA) 进行胎儿血型基因分型、多普勒检测胎儿大脑中动脉峰值流速(MCA-PSV)诊断胎儿贫血等已在临床使用。本文将对国内外 HDFN 产前诊断技术现状及其研究新进展做一综述,以利于实施更安全有效的 HDFN 诊断治疗和妊娠管理。

关键词: 新生儿溶血病; 红细胞抗原和抗体; 诊断技术; 妊娠管理; 胎儿基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.17.023 **中图法分类号:** R714.5

文章编号: 1673-4130(2022)17-2161-04 **文献标志码:** A

Research status and progress of prenatal diagnosis of hemolytic disease of newborn

LIU Rongzi, LIU Feng[△]

Department of Blood Transfusion, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University,
Nanning, Guangxi 530021, China

Abstract: Hemolytic disease of the fetus and newborn(HDFN) is an autoimmune hemolysis caused by the presence of pathogenic antibodies against fetal and neonatal erythrocyte antigens in the mother, which enter the fetus and newborn through the placenta. Current pregnancy management for HDFN includes prenatal blood type and phenotype identification of pregnant women and their spouses, detection and titer titration of maternal pathogenic antibodies, amniocentesis and other invasive diagnostic procedures or intrauterine blood transfusion treatment in high-risk cases. At present, many new techniques have emerged. Non-invasive diagnostic techniques such as fetal blood type genotyping using cell-free fetal DNA (cff-DNA) in pregnant women's peripheral blood, detection of the middle cerebral artery peak systolic velocity (MCA-PSV) by Doppler in the diagnosis of fetal anemia, have been used in clinics. This article will review the research status and new research progress of prenatal diagnosis technology of HDFN at home and abroad, in order to implement more safe and effective diagnosis and treatment of HDFN and pregnancy management.

Key words: hemolytic disease of newborn; erythrocyte antigens and antibodies; diagnosis technology; pregnancy management; fetal genotyping

胎儿及新生儿溶血病(HDFN)是指因母婴血型不合,母体天然存在或经输血、妊娠等后天免疫刺激产生的针对胎儿红细胞血型抗原的抗体,经胎盘进入胎儿血液循环,导致胎儿或新生儿同种免疫性溶血^[1-2],轻者可出现贫血、水肿、肝脾肿大,重者可能导致胎儿早期流产、胎儿发育停止和死亡,出生后的新生儿亦可以出现严重的核黄疸甚至死亡^[1]。考虑到 HDFN 的发病会贯穿整个妊娠过程,因此,如何尽早且精准地筛查出具有高风险的 HDFN 妊娠事件,实

施科学有效的妊娠监管以保护胎儿顺利生长发育,实现优生优育,仍是当前该领域研究的主流和热点。

1 HDFN 的分类

临床上依据致病性血型抗体的不同,通常可分为 ABO-HDFN 和非 ABO-HDFN; (1) ABO-HDFN 多发生于血型为 O 型的母亲,因其体内天然存在 IgG 抗 A 及抗 B,而胎儿遗传了父系的 A 或 B 基因后可表达出相应的 A 或 B 型抗原,母体 IgG 抗 A 和/或抗 B 透过胎盘后攻击表达 A/B 抗原的胎儿红细胞以及组织

[△] 通信作者, E-mail: liu_feng_email@126.com。

细胞,导致 ABO-HDFN 发病。目前国内以 ABO 血型不合引起的 HDFN 多见。ABO-HDFN 在母亲首次怀孕即可发生。(2)非 ABO-HDFN 除了输血导致孕妇产生相应的非抗 A/B 即意外抗体产生外,孕妇在妊娠期会出现胎儿母体出血(FMH)现象,胎儿红细胞可进入母体血液循环后,引发母体非 ABO 血型抗原同种免疫,产生相应的意外抗体,最常见于抗 Rh 抗体^[3],临床上非 ABO-HDFN 以 Rh-HDFN 常见。Rh 阴性女性首次怀孕 Rh 阳性胎儿时,通常产生 IgM 抗体,不能穿过胎盘导致胎儿溶血;而再次怀孕 Rh 阳性胎儿时,母体则会迅速产生 IgG 抗体,其能有效穿过胎盘导致胎儿溶血反应^[3]。MNS、Kell、Kidd 及 Duffy 等其他血型系统不合亦可引起 HDFN^[4-5]。

2 红细胞同种抗体特异性与 HDFN 发病风险、严重程度的相关性

发生 HDFN 的风险取决于几个因素:红细胞同种异体抗体的特异性、所涉及的血型抗原在胎儿红细胞的表达水平等^[2]。ABO 血型系统中,抗 A/B 抗体是临床上常见导致 HDFN 发病的原因,疾病多为轻度^[6]。Rh 血型系统中,抗 D/C/c/E/e/G/C^W/hr^S/hr^B/E^w/Go^a/Rh32/Bea/Evans/Tark 等抗体与 HD-FN 发病相关,严重者可导致胎儿死亡^[6-7]。MNS 血型系统中,抗 M/S/s/U/En^a/Mi^a/Mur/Vw 抗体与 HDFN 发病相关,其中抗 M/Mia/Mur/Vw 抗体可导致严重 HDFN^[6]。P1PK 血型系统 HDFN 发病风险低,但抗 PP1PK 抗体(特别是抗 P 成分)与早期自然流产有关^[6-8]。Kell 血型系统中,所有的抗 Kell 抗体都可能导致 HDFN,如抗 K/k/Kp^a/Kp^b/Js^a/Js^b/Ui^a/KEL5/KEL11/KEL18/KEL22/KEL28 抗体等,同时该抗体可通过抑制胎儿红细胞生成导致胎儿贫血^[6]。Duffy 血型系统中,抗 Fy^a/Fy^b 抗体与 HDFN 发病相关^[6]。Kidd 血型系统中,抗 Jk^a/Jk^b 抗体与 HDFN 发病相关^[6]。Diego 血型系统中,抗 Di^a/Di^b/Wr^a/ELO 抗体与 HDFN 发病相关,其中抗 Di^a/Wr^a/ELO 抗体可导致严重 HDFN^[6]。JR 血型系统中,抗 Jr^a 抗体与严重的 HDFN 有关^[9]。LAN 血型系统中,抗 LAN 抗体多导致轻度 HDFN^[11]。国际输血学会(ISBT) 200 系列,抗 i 抗体可引起轻度 HDFN,其机制是母体自身抗 i 抗体可穿过胎盘,从而导致新生儿轻度黄疸^[10]。ISBT 700 系列,抗 Bi/Re^a/Li^a/Kg/JONES/HJK/HOFM/REIT 抗体与 HDFN 发病相关^[10]。ISBT 901 系列,抗 MAM 抗体与 HDFN 发病相关^[10]。考虑到众多的致病性血型抗体均可导致 HDFN,临床上如何提高抗体检出率和准确性,对于明确 HDFN 的诊断及后续的治疗至关重要。

3 妊娠期红细胞同种抗体的诊断策略

3.1 ABO-HDFN 的诊断策略 当前常规的试验诊断策略是依据孕妇及配偶 ABO 血型组合及相应妊娠期 IgG 抗 A/B 的效价测定。IgG 抗 A/B 是衡量 ABO-HDFN 发病风险高低的重要因素,但其是否能成为致病性抗体,必须要以真实存在母婴血型不合即胎儿及新生儿上表达对应阳性 ABO 抗原作为发病基础。2021 年国内专家共识针对 ABO-HDFN 产前监测仍以亲代血型表型不合结合 IgG 抗 A/B 的效价为主要临床风险预测的技术手段^[1]。

3.2 非 ABO-HDFN 的诊断策略 国内有研究报道关于抗 D 效价与 HDFN 发病率的统计分析结果显示:IgG 抗 D 效价<16,发病率 5.40%(低风险);16≤IgG 抗 D 效价<32,发病率 33.33%(中等风险);32≤IgG 抗 D 效价<64,发病率 81.81%(高风险);64≤IgG 抗 D 效价<128,发病率 92.11%(高风险);128≤IgG 抗 D 效价<256,发病率 95.65%(高风险);IgG 抗 D 效价≥256,发病率 100.00%(高风险)^[11]。值得说明的是,部分临床医生在妊娠管理时比对过孕妇及配偶双方血型结果后会直接开具检测某一稀有血型抗体效价测定,这其实是不严谨的,科学的诊断策略是首先通过意外抗体筛查和鉴定试验明确诊断出血型抗体类型后方能对其进行效价的测定。因此,血型意外抗体的实际检出率成为制约致病性抗体诊断及非 ABO-HDFN 诊断的重要因素。一方面,当前国内外大多数实验室采用 8~16 人份不等的商品化的抗体鉴定谱细胞,然而不同厂家的谱细胞覆盖血型抗原的种类和纯杂合子特征差异非常大,同时复杂的抗体鉴定过程中通常还需要联合复杂的血型血清学技术,甚至血型基因分型才能做到精准的抗体鉴定,因此对鉴定人员的理论知识和技术水平要求非常高。另一方面,许多稀有血型表型诊断的抗体试剂因为价格昂贵、极难甚至无法获得商品化的试剂,因此,很多文献报道的非 ABO-HDFN 的血型诊断都需要对孕妇、配偶和新生儿进行基因分型鉴定,这也导致这些非 ABO-HDFN 在常规和基层医院的实验室无法开展,客观上也弱化了基层医疗机构对非 ABO-HDFN 的认识、有效妊娠管理和精确诊断。

4 妊娠期无创产前诊断技术研究进展

针对高危孕妇,早期的产前诊断为有创诊断,即通过羊膜腔穿刺术、绒毛膜绒毛穿刺术和经阴道灌注术等获取到胎儿标本进行血型基因分型。羊膜腔穿刺术可导致自发性流产和羊水渗漏^[14]。侵入性操作都会增加 FMH 的风险,导致同种免疫发生并产生抗体^[15]。因此,非侵入性检测技术成为目前研究热点。

4.1 胎儿游离 DNA(cff-DNA)

4.1.1 cff-DNA 在预测胎儿血型中的运用 妊娠期母体血浆中可检测到 cff-DNA, cff-DNA 来源于滋养细胞, 滋养细胞通过胎盘转移, 发生凋亡, 释放 DNA 进入母体^[16]。cff-DNA 在妊娠早期占母体血浆 DNA 水平约为 3.40%, 在孕晚期约占 6.20%^[17]。目前胎儿基因分型技术已广泛应用于胎儿 ABO、Rh 血型筛查、性别连锁疾病和染色体非整倍体诊断等^[18]。我国已有使用 cff-DNA 技术报道, 马红丽等^[19]报道利用 PCR-RFLP 技术建立从 O 型孕妇外周血中提取 DNA 检测胎儿血型的实验方法, 39 例新生儿出生前后血型检测符合率为 94.24%, 孕中期血型检测符合率为 91.95%, 孕晚期的血型检测符合率为 98.00%。于洋等^[20]使用从孕妇外周血中分离胎儿 ABO 血型基因 DNA, 运用 PCR-SSP 技术进行胎儿血型基因型鉴定, 预测胎儿的 ABO 血型表型, 符合率为 100.00%。马玲等^[21]使用 Y 染色体相关基因(SRY)及甲基化表观遗传标志 RASSF1A 作为胎儿 DNA 内参基因, 运用 PCR-SSP 及实时荧光 PCR 技术在 O 型孕妇外周血浆中检测胎儿 ABO 基因型, 其预测胎儿血型与胎儿出生后 ABO 血型表型一致。对于存在抗 D 的 RhD 阴性母亲, 采用 RhD 杂合子检测和 cff-DNA 技术检测胎儿 RhD 基因型, 对高风险的 Rh 血型不合的 HDFN 进行早期干预, 如注射抗-D 免疫球蛋白^[22]。

4.1.2 运用血型基因检测技术应注意的问题 目前确认了 43 个血型系统, 抗原数 345 个, 继 PCR 检测血型技术以来, 二代测序成为新型检测手段, 具有高通量、自动化的显著特征, 但二代测序存在假阳性的问题。由于血型抗原基因多态性, 基因检测技术仍面临特异性引物设计困难。如 MNS 血型系统糖蛋白 A、B 和 E(分别为 GPA、GPB 和 GPE)的基因包含跨越前四个外显子 9~15 的高度同源区域^[23]。外显子碱基互换、内含子碱基互换、单碱基突变、不同血型糖蛋白基因在序列各个部分之间的交换等都可导致新抗原的出现。同时, 基因重排可能会影响引物序列, 使引物不表达, 导致假阴性。胎儿遗传的部分 D 或弱 D 表型可导致 RhD 假阴性^[17], RhD 阴性男性胎儿的 Y 染色体基因序列(SRY、DBY 和 TTTY2)、短串联重复序列和低甲基化启动子序列等内参基因可有效地用作胎儿内部标记^[17]。有观点认为, 基于 RT-PCR 的胎儿 RhD 检测分析应重复多次, 至少两个 RhD 特异性外显子引物(最常见的外显子 5、7 和/或 10)进行 3 次重复, 可提高检测的准确性^[17]。另一方面, cff-DNA 在母体循环中数量低, 且标本采集、运输、储存和处理过程中, 母体血细胞裂解、释放的 DNA 不断增

加, 使循环中胎儿 DNA 被稀释。血浆 DNA 酶降解胎儿 DNA, 使胎儿血浆 DNA 高度碎片化。另外, 标本中大量的母体 DNA 使胎儿 DNA 分析更加困难。低水平的 cff-DNA 可导致 RhD 假阴性^[17], 因此, 取样后 6 h 内处理标本, 可有效提高检出效率。

4.1.3 血型表型与基因型可能存在的差异 HDFN 发病前提是以表型的抗原抗体为基础。ABO 血型与 H 血型有密切关系, 孟买血型是 H 基因突变的结果, 因其上位效应影响 ABO 基因产物, 造成了 ABO 血型异常表现^[24]。因此, 进行 ABO 血型基因分型时, 应加做 H 基因检测以提高表型预测的准确率。RhAG 蛋白虽然自身不产生抗原, 但是它可以辅助 RhD 及 RhCE 蛋白锚定在红细胞膜上, 形成 Rh 蛋白复合体, 并且参与 RhD 抗原的缺失和表达^[25]。因此, 在进行 RhD/RhCE 基因检测时, 也要进行 RhAG 基因检测。

4.2 大脑中动脉收缩期峰值流速(MCA-PSV) 其他非侵入性诊断技术如胎儿 MCA-PSV, 通过 MCA-PSV 测量更准确评估胎儿贫血。2021 年专家共识提出^[1]: IgG 抗体效价明显升高时, 采用多普勒超声技术进行胎儿 MCA-PSV 测定, 根据胎儿贫血的病理生理改变, 包括胎儿形态学及血流动力学变化有效监测胎儿贫血程度, 当 MCA-PSV > 1.5 MoM(中位数)时, 即需要进行临床干预。

5 小 结

综上所述, HDFN 是一种多层面疾病, 不能简单依赖抗体为主的当前诊断策略, 一方面需要提高致病性抗体鉴定的技术条件和水平, 另一方面还是需要扩大孕妇及配偶的血型鉴定, 尤其是当稀有血型表型诊断存在困难时, 可以充分利用血型基因分型技术进行产前诊断, 对于存在高风险的孕妇则可以利用母体血浆 cff-DNA 实现早期诊断母婴血型不合是否存在及类型, 同时动态评估致病性抗体的效价及危害程度, 才能在真实意义上实现血型不合 HDFN 的早期诊断和精准的妊娠管理。

参考文献

- [1] 中国输血协会免疫血液学专业委员会, 李翠莹, 李小薇. 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.
- [2] HAAS M D, THURIK F F, KOELEWIJN J M, et al. Haemolytic disease of the fetus and newborn[J]. Vox Sanguinis, 2015, 109(2): 99-113.
- [3] MURRAY N A, ROBERTS I A. Haemolytic disease of the newborn[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2007, 92(2): 83.
- [4] MOINUDDIN I, FLETCHER C, MILLWARD P. Preva-

- lence and specificity of clinically significant red cell alloantibodies in pregnant women - a study from a tertiary care hospital in Southeast Michigan[J]. *J Blood Med*, 2019, 10:283-289.
- [5] DAJAK S, I PAVEC N, CUK M, et al. The outcome of hemolytic disease of the fetus and newborn caused by anti-Rh17 antibody : analysis of three cases and review of the literature[J]. *Transfus Med Hemother*, 2020, 47(3): 264-271
- [6] DENOMME H A, NOLLET S E. Three non-classical mechanisms for anemic disease of the fetus and newborn , base donmaternal anti-Kell , anti- Ge3, anti-M, and anti-Jra cases[J]. *Transfus Apher Sci*, 2020, 59(5):102949.
- [7] FRANKLIN I M. Prevention of rhesus haemolytic disease of the fetus and newborn[J]. *Lancet*, 2009, 373(9669): 1082.
- [8] THORNTON N M, GRIMSLEY S P. Clinical significance of antibodies to antigens in the ABO, MNS, P1PK, Rh, Lutheran, Kell, Lewis, Duffy, Kidd, Diego, Yt, and Xg blood group systems [J]. *Immunohematology*, 2019, 35(3):95-101.
- [9] KOLLAMPARAMBIL T G, JANI B R. Anti-C(w) alloimmunization presenting as hydrops fetalis[J]. *Acta Paediatr*, 2005, 94(4):499-501.
- [10] MOGHADDAM M, NAGHI A A. Clinical significance of antibodies to antigens in the Raph, John Milton Hagen, I, Globoside, Gill, Rh-associated glycoprotein, FORS, JR, LAN, Vel, CD59, and Augustine blood group systems [J]. *Immunohematology*, 2018, 34(3):85-90.
- [11] STENFELT L, HELLBERG Å, WESTMAN J S, Olsson ML. The P1PK blood group system; revisited and resolved[J]. *Immunohematology*, 2020, 36(3):99-103.
- [12] LOMAS-FRANCIS C. Clinical significance of antibodies to antigens in the International Society of Blood Transfusion collections, 700 series of low-incidence antigens, and 901 series of high-incidence antigens[J]. *Immunohematology*, 2018, 34(2):39-45.
- [13] 肖军, 郑飞天, 陈柄瀚, 等. O 型孕产妇 IgG 抗体效价与胎儿新生儿溶血病关系的 Meta 分析[J]. *中国输血杂志*, 2020, 33(9):925-928
- [14] ALFIREVIC Z, NAVARATNAM K, MUJEZINOVIC F. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 9(9): CD003252.
- [15] DZIEGIEL M H, KROG G R, HANSEN A T, et al. Laboratory monitoring of mother, fetus, and newborn in hemolytic disease of fetus and newborn[J]. *Transfus Med Hemother*, 2021, 48(5):306-315.
- [16] BREVEGLIERI G, D' AVERSA E, FINOTTI A, et al. Non-invasive prenatal testing using fetal DNA[J]. *Mol Diagn Ther*, 2019, 23(2):291-299.
- [17] FASANO R M. Hemolytic disease of the fetus and newborn in the molecular era[J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2016, 21(1):28-34.
- [18] GUSEH S H. Noninvasive prenatal testing, from aneuploidy to single genes[J]. *Hum Genet*, 2020, 139(9): 1141-1148.
- [19] 马红丽, 杨波, 王志红, 等. 139 例 O 型孕妇外周血 DNA 检测胎儿血型准确度分析[J]. *医学研究杂志*, 2012, 41(7):82-83
- [20] 于洋, 冯倩, 林子林, 等. 孕妇外周血胎儿 ABO 血型基因分型技术的建立[J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(5): 1363-1367
- [21] 马玲, 刘衍春, 张若洋, 等. RASSF1A 在无损性孕妇外周血浆中胎儿 ABO 基因分型中的运用[J]. *中国实验血液学杂志*, 2016, 24(4):1211-1215.
- [22] RUNKEL B, BEIN G, SIEBEN W, et al. Targeted antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative pregnant women; a systematic review[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2020, 20(1):83.
- [23] REID M E. MNS blood group system; a review[J]. *Immunohematology*, 2009, 25(3):95-101.
- [24] SCHARBERG E A, OLSEN C, BUGERT P. An update on the H blood group system[J]. *Immunohematology*, 2019, 35(2):67-68.
- [25] WALTERS T K, LIGHTFOOT T. A delayed and acute hemolytic transfusion reaction mediated by anti-c in a patient with variant RH alleles[J]. *Immunohematology*, 2018, 34(3):109-112.

(收稿日期:2021-12-18 修回日期:2022-04-28)