新生儿 Rh 溶血病与 IgG1、IgG3 相关性分析

高婉卿¹, 郑必霞², 杨 劲³, 李凌波⁴, 孙喜东⁵

摘要 目的 研究 Rh 血型系统新生儿溶血病与 IgG1、IgG3 的相关性。方法 研究 Rh-HDN 患儿 64 例。新生儿出生后抽取患儿及其母亲外周静脉血, 检测患儿母亲 Rh 系统抗体、患儿 IgG 亚型以及血清总胆红素、间接胆红素水平, 分析患儿不同 IgG 亚型与其血清总胆红素、间接胆红素水平的关系, 并分析不同 Rh 系统抗体对患儿血清总胆红素、间接胆红素水平的影响。结果 Rh 系统抗 - D 占 65.63%, 抗 - E (包括 Rh-E、Rh-cE) 占 26.56%, 引起新生儿 Rh-HDN 发病的 IgG 抗体亚型主要为 IgG1 (23 例, 35.94%)、IgG1,3 (35 例, 54.68%) 两类。IgG1,3 组患儿血清总胆红素、间接胆红素水平明显高于 IgG1 或 IgG3 组 ($P < 0.05$)。Pearson 相关性分析显示: 患儿血清总胆红素、间接胆红素水平与患儿 IgG1 水平和 IgG1,3 水平呈显著正相关 ($P < 0.05$), 与患儿 IgG3 水平无显著相关性; 抗 - D 组患儿血清总胆红素、间接胆红素水平明显高于非抗 - D 组 ($P < 0.05$)。结论 新生儿 Rh 溶血症患儿黄疸严重程度与 IgG 水平呈显著正相关, 对于疑有 Rh 溶血症的患儿, 进行 IgG1 或 IgG1,3 水平的检测, 对该类患儿早期治疗有指导意义。

关键词 Rh 血型; 新生儿溶血病; IgG1; IgG3; 抗 - D

中图分类号 R 722.18

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)05-0789-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.027

新生儿溶血病 (hemolytic disease of newborn, HDN) 是新生儿期最为常见的疾病之一, 主要包括 ABO 溶血和 Rh 溶血两大类, 前者约占 85.8%, Rh 溶血约占 14.2%^[1]。而临床中 Rh-HDN 较 ABO 溶血起病急, 病情重, 溶血程度重, 病情发展迅速, 患儿可在生后 24 h 内出现黄疸, 并呈进行性加重, 同时可有程度的贫血、心力衰竭和呼吸窘迫等, 重者可导致核黄疸并造成核黄疸后遗症, 严重影响患儿的生

命健康^[2-3]。因此, 提高产前 Rh-HDN 诊断率, 并积极进行产前预防和产后的及时治疗是降低患儿死亡率、致残率的关键。该研究对 64 例 Rh-HDN 患儿的血型进行筛选、鉴定, 检测患儿 IgG 抗体亚型, 并分析 Rh-HDN 与患儿不同 IgG 亚型的相关性以及不同制备抗体对 Rh-HDN 的影响, 旨在为临床提供参考。

1 材料与方法

1.1 病例资料 本研究病例均来自 2014 年 6 月 ~ 2018 年 6 月合肥市第二人民医院儿科及南京市儿童医院收治的 64 例 Rh-HDN 患儿, 患儿母亲产前抗体鉴定确定为 Rh 系统同种抗体。治疗纳入标准: ① 患儿与母亲 Rh 血型不符; ② 患儿出生后 24 h 内出现黄疸, 并呈进行性加重; ③ Coombs 试验、游离抗体试验中至少一项为阳性; ④ 均为单胎患儿。排除标准: ① 诊断为 ABO 溶血的患儿; ② 患儿合并先天性疾病; ③ 合并心、肝、肾等实质性器官病变的患儿; ④ 合并凝血功能障碍的患儿。64 例患儿中, 男 38 例, 女 26 例; 平均体质量 (3.52 ± 1.36) kg; 入院时间产后 3 ~ 76 h, 平均日龄 1.6 d; 自然分娩 35 例, 剖宫产 29 例; 母亲妊娠次数 ≤ 1 次 16 例, > 1 次 48 例。本研究经合肥市第二人民医院及南京市儿童医院医学伦理委员会批准进行。

1.2 仪器与试剂 筛选细胞、谱细胞、抗 - C、抗 - e、抗 - E、抗 - e、抗 - IgG1、抗 - IgG2、抗 - IgG3、抗 - IgG4 均购自 Sanquin 公司; 抗 - D、Rh 分型卡、LISS-Coombs 卡、空白微柱凝胶卡均购自 BIO-RAD 公司。

1.3 检测方法

1.3.1 Rh 系统抗体检测 将准备好的不规则抗体筛检卡做好标记, 将配好的筛检细胞或谱细胞悬液加入标好的微管中, 各 1 滴 (或 50 μ l), 并立即分别加入待测血清 1 滴 (或 50 μ l); 将加样后的试剂卡在专用 37 $^{\circ}$ C 孵育箱中孵育 15 min; 使用专用离心机离心 5 min (900 r/min, 2 min; 1 500 r/min, 3 min), 取出直接肉眼观察结果。所有操作均严格按照仪器与试剂盒说明书进行。

1.3.2 直接 Coombs 试验、游离抗体试验 将患儿

2019-02-18 接收

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (编号: 20160204016SF)

作者单位: 合肥市第二人民医院¹ 儿科、³ 输血科, 合肥 230000

² 南京市儿童医院儿科学重点实验室, 南京 210008

⁴ 长春博迅生物技术有限责任公司, 长春 130102

⁵ 中国人民解放军第二〇八医院, 长春 130000

作者简介: 高婉卿, 女, 住院医师;

郑必霞, 女, 硕士, 助理研究员, 责任作者, E-mail: zbx-88117@163.com

压积红细胞与适量红细胞稀释液混合配制成 0.8%~1% 的红细胞悬液,采取患儿外周静脉血置于无抗凝剂试管中,并于 37℃ 下放置 2 h,2 000 r/min 离心 10 min,取上清液(该上清液不得有絮状物或沉淀)。充分洗涤红细胞至少 3 次,取同体积洗涤后的压积血和 6% 牛血清白蛋白(或生理盐水)混匀,置于 56℃ 孵育 10 min,期间不断摇动,1 000 r/min 离心 2~3 min,取上清液,即放散液。直接 Coombs 试验、游离抗体试验均按照实验标准进行。

1.3.3 IgG 亚型检测 将 IgG 1、2、3、4 抗体加入到空白 LISS-Coombs 卡中,按直接 Coombs 试验方法检测患儿红细胞上包被的相应 IgG 亚型。所有操作均严格按照仪器与试剂盒说明书进行。

1.3.4 血清胆红素检测 患儿血清总胆红素、间接胆红素水平采用贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪进行检测。所有操作均严格按照仪器与试剂盒说明书进行。

1.4 观察指标 ① 患儿母亲 Rh 系统抗体筛查、鉴定以及患儿红细胞 IgG 抗体亚型检测结果;② 患儿直接 Coombs 试验、游离抗体试验结果;③ 不同 Rh 系统抗体组患儿血清总胆红素、间接胆红素水平。

1.5 诊断标准 Rh-HDN 诊断标准^[1]:① 母婴 Rh 血型不合;② 新生儿出生后 24 h 内出现黄疸,并呈进行性加重;③ 新生儿溶血 3 项试验即直接 Coombs 试验、游离抗体检测、抗体释放试验中至少一项为阳性。

微柱凝胶法测定 Rh 系统抗体效价较传统方法(聚凝胺法、抗人球蛋白试管法)高出 1~2 个滴度,故抗体效价 ≥32 时评价为有临床意义。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行数据统计分析。定量资料符合正态分布时,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行独立样本 *t* 检验,组内比较行配对样本 *t* 检验;定性资料组间比较采用 χ^2 检验;患儿血清胆红素水平与其 IgG 亚型水平的相关性采用 Pearson 相关性分析。取双侧 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 患儿母亲 Rh 系统抗体筛查、鉴定以及患儿红细胞 IgG 抗体亚型检测结果 Rh 系统 D、C、c、E、c 5 种抗原对应的抗体均可导致新生儿 Rh-HDN 发病,以抗 -D 和抗 -E 最为常见,引起新生儿 Rh-HDN 发病的 IgG 抗体亚型主要包括 IgG1(23 例,35.94%)、IgG1、3(35 例,54.68%),另外,有 2 例患儿同时存在 IgG1~3,1 例同时存在 IgG1~4,表明 IgG2、IgG4 也能通过胎盘并包被胎儿红细胞,见表 1。

2.2 患儿直接 Coombs 试验、游离抗体试验结果 患儿直接 Coombs 试验结果:均为阳性;患儿游离抗体试验结果:4 例为阳性 -/+、6 例为阳性 1+、33 例为阳性 2+、21 例为阳性 3+。

2.3 患儿不同 IgG 抗体亚型与其血清总胆红素、间接胆红素水平相关性分析 IgG1、3 组患儿血清总胆红素、间接胆红素平均水平明显高于 IgG1 或 IgG3 组($P < 0.05$);分别以患儿血清总胆红素、间接胆红素水平作为因变量,以患儿不同 IgG 抗体亚型水平作为自变量行 Pearson 相关性分析,患儿 IgG1 水平与患儿血清总胆红素、间接胆红素水平呈显著正相关($P < 0.05$);患儿 IgG3 水平与患儿血清总胆红素、间接胆红素水平无明显相关性($P > 0.05$);患儿 IgG1、3 水平与患儿血清总胆红素、间接胆红素水平呈显著正相关($P < 0.05$);见表 2、3。

2.4 不同 Rh 系统抗体组患儿血清总胆红素、间接胆红素水平比较 抗 -D 组患儿血清总胆红素、间接胆红素平均水平明显高于非抗 -D 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

3 讨论

在 HDN 发病过程中,IgG 抗体发挥了关键作用。IgG 是人体免疫球蛋白之一,主要由脾、淋巴结中的浆细胞合成和分泌,以单体形式存在,是血清主要的抗体成分,约占血清 Ig 的 75%,其中 40%~

表 1 患儿母亲 Rh 系统抗体筛查、鉴定以及患儿红细胞 IgG 抗体亚型检测[n(%)]

项目	抗 -D	抗 -E	抗 -cE	抗 -C	抗 -c	抗 -Ce	合计
IgG1	16(25.00)	5(7.81)	1(1.56)	1(1.56)	0	0	23(35.94)
IgG3	2(3.16)	1(1.56)	0	0	0	0	3(4.69)
IgG1、3	23(35.94)	7(10.94)	2(3.13)	1(1.56)	1(1.56)	1(1.56)	35(54.68)
IgG1~3	1(1.56)	1(1.56)	0	0	0	0	2(3.16)
IgG1~4	0	0	1(1.56)	0	0	0	1(1.56)
合计	42(65.63)	14(21.86)	4(6.25)	2(3.13)	1(1.56)	1(1.56)	64(100.00)

表2 不同 IgG 抗体亚型组患儿血清总胆红素、间接胆红素水平比较 ($\mu\text{mol/L}$ $\bar{x} \pm s$)

指标	IgG1、3	IgG1 或 IgG3	t 值	P 值
例数	35	26		
总胆红素	376.55 ± 108.06	268.20 ± 99.06	13.98	<0.05
间接胆红素	337.85 ± 104.65	247.75 ± 101.72	3.38	<0.05

表3 患儿不同 IgG 抗体亚型与其血清总胆红素、间接胆红素水平相关性分析

组别	总胆红素		间接胆红素	
	r 值	P 值	r 值	P 值
IgG1 (n=23)	0.682	<0.05	0.543	<0.05
IgG3 (n=3)	0.165	0.27	0.134	0.47
IgG1、3 (n=35)	0.618	<0.05	0.486	<0.05

表4 不同 Rh 系统抗体组患儿血清总胆红素、间接胆红素水平比较 ($\mu\text{mol/L}$ $\bar{x} \pm s$)

指标	抗-D 组	非抗-D 组	t 值	P 值
例数	42	22		
总胆红素	369.94 ± 105.36	255.54 ± 96.38	5.51	<0.05
间接胆红素	341.75 ± 103.44	237.52 ± 93.65	4.08	<0.05

50% 分布于血清中,其余分布在组织中^[4-5]。根据 IgG 分子中的 r 链抗原性差异,人 IgG 有四个亚型: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4,在血清中浓度 IgG1 > IgG2 > IgG3 > IgG4^[6]。IgG 在人体抗感染免疫尤其是再次免疫应答中发挥重要作用,包括激活补体经典途径,介导溶菌和细胞毒作用;介导 ADCC 效应;结合 SPA;中和毒素和病毒等^[7-8]。另外,IgG 是唯一可以通过胎盘的免疫球蛋白,是胎儿免疫的重要组成部分。出生前,胎儿 IgG 主要来自母体,在孕前期 22~28 周间,胎儿血 IgG 浓度与母体血 IgG 浓度相等,出生后母体 IgG 逐渐减少,到第 3、4 月胎儿血 IgG 降至最低,随后胎儿逐渐开始合成 IgG,血清 IgG 逐渐增加^[9]。在 HDN 发病中,由于母体内产生了大量针对胎儿血型的 IgG 抗体,通过胎盘进入胎儿血液循环,并与胎儿红细胞表面抗原相结合,导致胎儿红细胞被吞噬、破裂,最终引起 HDN。因此,分析不同 IgG 亚型与 Rh 血型系统新生儿溶血病的关系,检测 Rh 系统致病抗体,对预防和治疗 Rh-HDN 具有重要临床意义。

本研究就 Rh 血型系统新生儿溶血病与 IgG1、IgG3 的相关性及其致病抗体展开研究,结果显示: IgG1 与 IgG1、3 血型抗体是引起 Rh-HDN 最主要的 IgG 亚型,而 IgG3 单独存在时较少引起 Rh-HDN。通过 Pearson 相关性分析显示: Rh-HDN 的病情与患儿 IgG 水平呈明显正相关,患儿 IgG1 与 IgG1、3

水平越高,其血清总胆红素和间接胆红素水平越高,病情越严重。国外报道 1:32 的抗体效价是胎儿溶血病严重程度的临界值,当母亲 IgG 抗体效价 > 1:32 时,需高度关注并严密监测胎儿溶血状况。本研究 64 例 Rh-HDN 患儿,出生时 IgG 抗体效价大多 > 1:32,大部分患儿表现为中度以上溶血,与文献^[7]报道形似。本研究 24 例患儿发生了宫内溶血,其 IgG 抗-D 抗体效价平均 > 1:1024,但值得注意的是 1 例患儿 IgG 抗-D 抗体效价达 1:1024 但并没有发生宫内溶血,且出生时 Apgar 评分为 10 分,可能是患儿母亲多次妊娠后,体内产生抗 HLA 抗体,阻止单核细胞与抗-D 抗体致敏红细胞之间的结合,即母源性 HLA 抗体封闭了胎儿巨噬细胞的 Fc 受体,阻止了胎儿致敏红细胞的破坏。而当胎儿出生后,失去了母体 HLA 抗体的保护,高效价抗-D 抗体使胎儿迅速发生严重的 HDN。母亲 Rh 血型系统筛选、鉴定结果显示:导致新生儿 Rh-HDN 发病 Rh 系统血型抗体包括抗-D、抗-CD、抗-DE、抗-E、抗-cE、抗-C、抗-Ce 抗-c、抗-e 等,但主要以抗-D 和抗-E 为主要致病抗体,本研究中,抗-D 占 34.15%,抗-E 占 28.05%,与文献^[10]报道相符。通过对比不同 Rh 系统血型抗体患儿血清胆红素水平发现,抗-D 较其他 Rh 抗体引起的 HDN 严重,有研究显示,Rh 血型系统多重抗体比单一抗体更易引起 HDN,且症状更严重。目前,国外学者认为 Rh 抗体效价 ≥ 16 有较大的临床意义,本研究采用微柱凝胶法与传统方法相比高出 1~2 个滴度,因此以 Rh 抗体效价 ≥ 32 判断临界值。但本研究认为不论 Rh 抗体效价高低,只要母亲体内存在此抗体,特别是含有抗-D 类的 Rh 抗体,临床都应警惕 HDN 的发生,如抗体效价伴随妊娠周龄的增加而不断升高,临床上应高度重视,产后婴儿应立即做 HDN 血清学检测,病情严重者应及早进行换血治疗。

综上所述,在 Rh-HDN 的临床预防和诊断中,不仅要加强对 RhD 抗原的检测,同时也不能忽略 Rh 其他类型抗原的检查的重要性,特别是对抗-E 和抗-cE 的检测。Rh 血型系统抗体主要是 IgG 抗体,其中以 IgG1 和 IgG1、3 为主,并且 Rh-HDN 病情与 IgG1 和 IgG1、3 水平呈明显正相关关系,因此,临床应积极对产前孕妇体内 IgG1、IgG3 水平进行动态监测。另外,胎儿出生后,及时检测其 IgG1、IgG3 水平,有利于准确评估患儿病情,为患儿的治疗方案选择提供指导。

参考文献

- [1] 邵肖梅. 诸福堂实用儿科学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版, 2011: 477-80.
- [2] Fasano R M. Hemolytic disease of the fetus and newborn in the molecular era[J]. *Semin Fetal Neonatal Med* 2016 21(1): 28-34.
- [3] 刘淑均, 沈继龙, 卞茂红, 等. 利用噬菌体随机肽库筛选 Rh(D) 血型抗原的模拟表位[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(7): 817-20.
- [4] Strauss R G, Storry J R. More data needed to establish maternal breast milk IgG as cause for anti-D hemolytic disease of fetus and newborn[J]. *Transfusion* 2018 58(3): 828-33.
- [5] 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): 1532-6.
- [6] 毛雨生, 陈靖, 王从刚, 等. IgG 型抗-D 引起的新生儿溶血病 1 例[J]. *中国输血杂志* 2016 37(21): 417-22.
- [7] Quantock K M, Lopez G H, Hyland C A, et al. Anti-D in a mother, hemizygous for the variant RHD* DNB gene, associated with hemolytic disease of the fetus and newborn [J]. *Transfusion*, 2017 57(8): 245-8.
- [8] 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): 366-8.
- [9] 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): 1374-6.
- [10] 安莹花, 刘莹, 刘小艳, 等. O 型血孕妇 IgG 抗 A(B) 效价检测与新生儿溶血病相关性分析[J]. *临床医学研究与实践* 2017, 68(13): 174-8.

Correlation analysis between neonatal Rh hemolytic disease and IgG1 and IgG3

Gao Wanqing¹, Zheng Bixia², Yang Jin³, et al

(¹Dept of Pediatrics, ³Dept of Blood Transfusion, The Second People's Hospital of Hefei, Hefei 230000;

²Nanjing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008)

Abstract Objective To study the correlation between hemolytic disease and IgG1 and IgG3 in Rh blood group system. **Methods** The subjects were Rh-HDN children. The newborn venous blood of the child and its mother was taken after birth, and the mother Rh system antibody, the IgG subtype of the child, the serum total bilirubin and the indirect bilirubin level were detected, and the different IgG subtypes and serum totals were analyzed. The correlation between bilirubin and indirect bilirubin levels, and the effects of different Rh system antibodies on serum total bilirubin and indirect bilirubin levels in children. **Results** Anti-D of Rh system accounted for 65.63%, anti-E (including Rh-E, Rh-cE) accounted for 26.56%, and the IgG antibody subtype of neonatal Rh-HDN was mainly IgG1 (23 cases, 35.94%), IgG1, 3 (35 cases, 54.68%) two categories. Serum total bilirubin and indirect bilirubin levels were significantly higher in IgG1 and 3 groups than in IgG1 or IgG3 groups ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that there was a significant positive correlation between serum total bilirubin and indirect bilirubin levels and IgG1 levels and IgG1 and 3 levels ($P < 0.05$), and no significant correlation with IgG3 levels in children. Serum total bilirubin and indirect bilirubin levels were significantly higher in the anti-D group than that in the non-anti-D group ($P < 0.05$). **Conclusion** The severity of jaundice in neonates with Rh hemolytic disease is significantly positively correlated with IgG level. For children with suspected Rh hemolytic disease, IgG1 or IgG1 and 3 levels are detected, which is helpful for early treatment of this type of children.

Key words Rh blood type; hemolytic disease of newborn; IgG1; IgG3; anti-D