



新生儿溶血病产后实验室 诊断及研究进展

四川大学华西第二医院检验科血库

陈剑

2014-06-14

1

病因和发病机理

2

产后实验室诊断

3

病例分享

4

研究进展



认识新生儿溶血病的必要性



■ 中央电视台新闻报道：

四川某偏远地区一孕产妇，孕、产18胎，均发生流产或新生儿出生后2-5天黄疸死亡。孕第19胎，经过四川大学华西第二医院医护人员全力救治，获得一健康宝宝。



新生儿溶血病

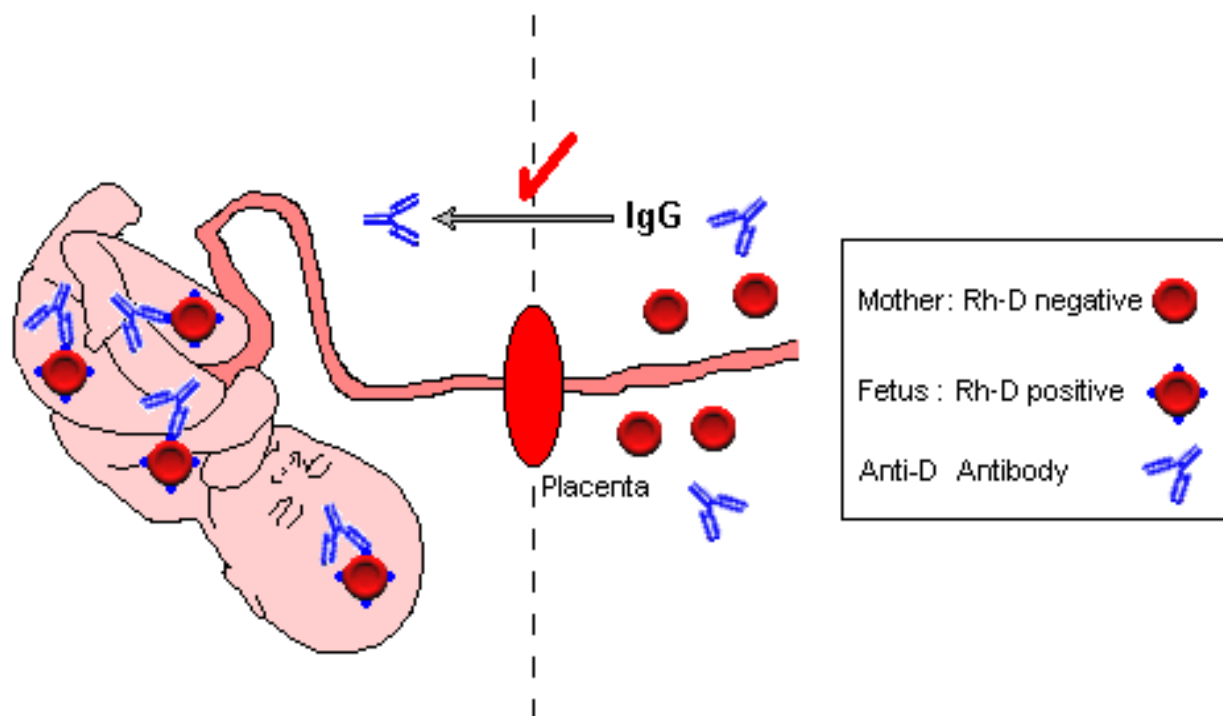
(Hemolytic Disease of the Newborn , HDN)



- **新生儿溶血病** (Hemolytic disease of newborn, HDN)
指因母、婴血型不合而引起的胎儿或新生儿同种免疫性溶血。
- **临床表现**
胎儿红细胞被破坏，引起死胎、流产或早产。出生后表现为贫血、黄疸，严重会导致心力衰竭及核黄疸。



Haemolytic Disease of the Newborn (HDN)



ABO HDN的病因和发病机理



□ ABO HDN可发生在怀孕第一胎



□ O型母亲A/B型新生儿



■ Rh血型系统：

- 最具遗传多肽性

■ Rh 血型抗原（经ISBT 确认）：

- 46 个
- 与临床有关的：C、c、D、E、e，**无d抗原**

■ Rh 系统抗原性：

- 强度顺序为D > E > C > c > e



Rh血型基因

1. D 阳性 (RH: 1)



2. D 阴性 (RH: - 1)

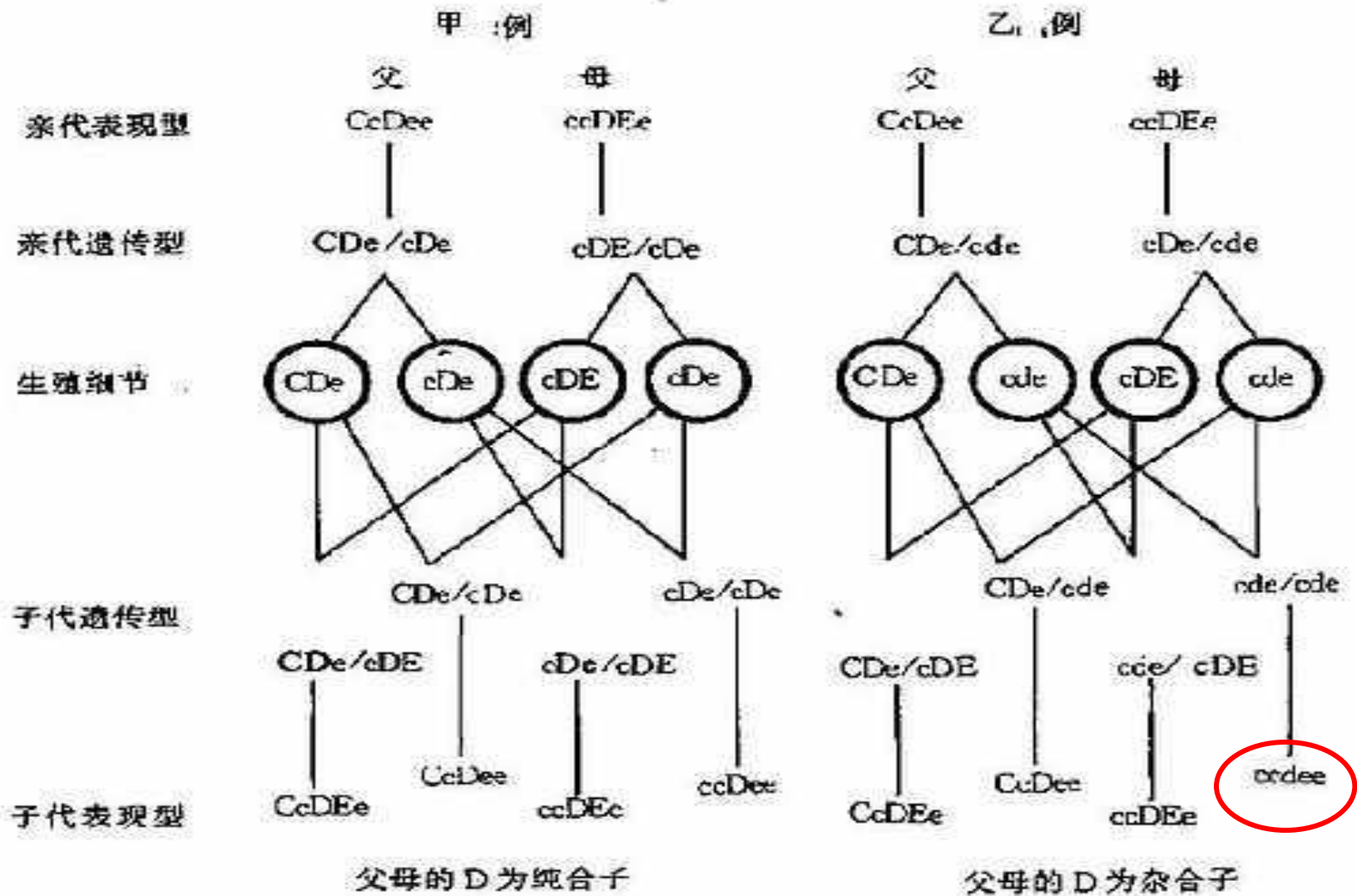
(1)



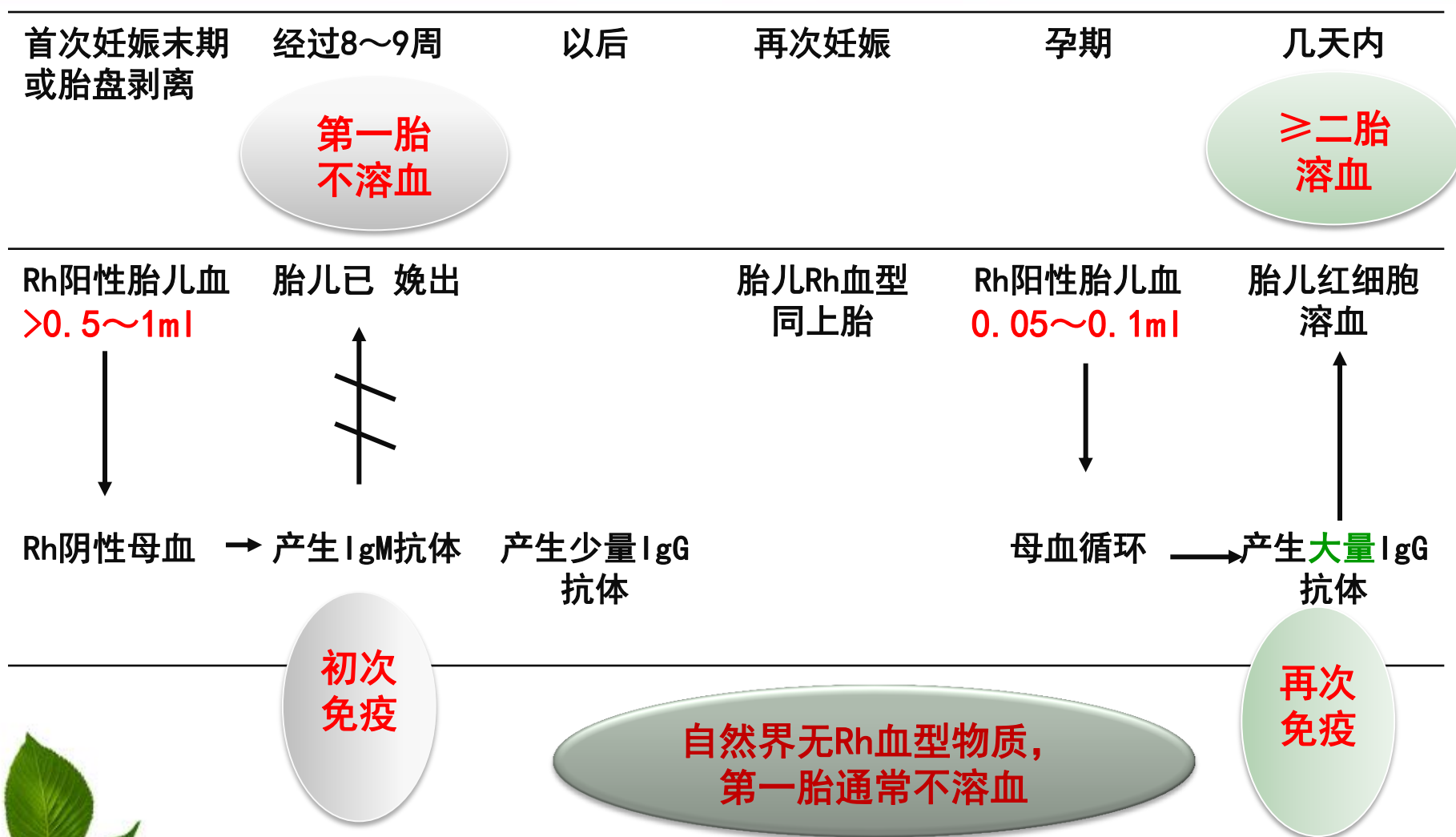
(2)



Rh系统遗传示意图



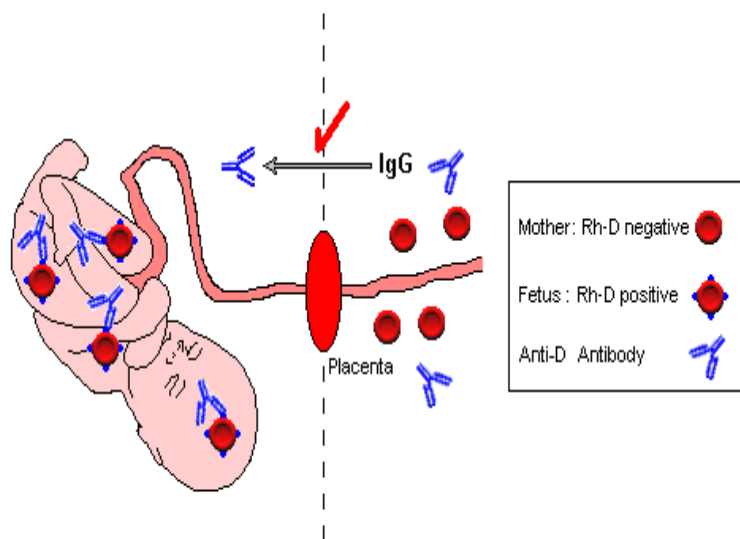
Rh HDN的病因和发病机理



HDN产后检测思路



Haemolytic Disease of the Newborn (HDN)



IMMUNORISE-DIMMED

- 胎儿血清：
游离抗体
- 胎儿红细胞：
致敏抗体



HDN产后实验室诊断—— 脐血/新生儿血型抗体



直抗 试验

- 检测胎儿红细胞是否被致敏

释放 试验

- 同直抗试验，但更敏感
- 确诊性实验

游离 试验

- 检测血浆中是否有血型抗体



脐血/新生儿血型抗体的检测



1. 标本准备

- 静脉/脐血：紫头管3ml
- 2-8℃保存
- 拒收：标识不清，少于2ml



2. 标本前处理

- 离心
- 初次血型
- 生理盐水洗涤3遍
- 再次复检血型

两次血型鉴定！

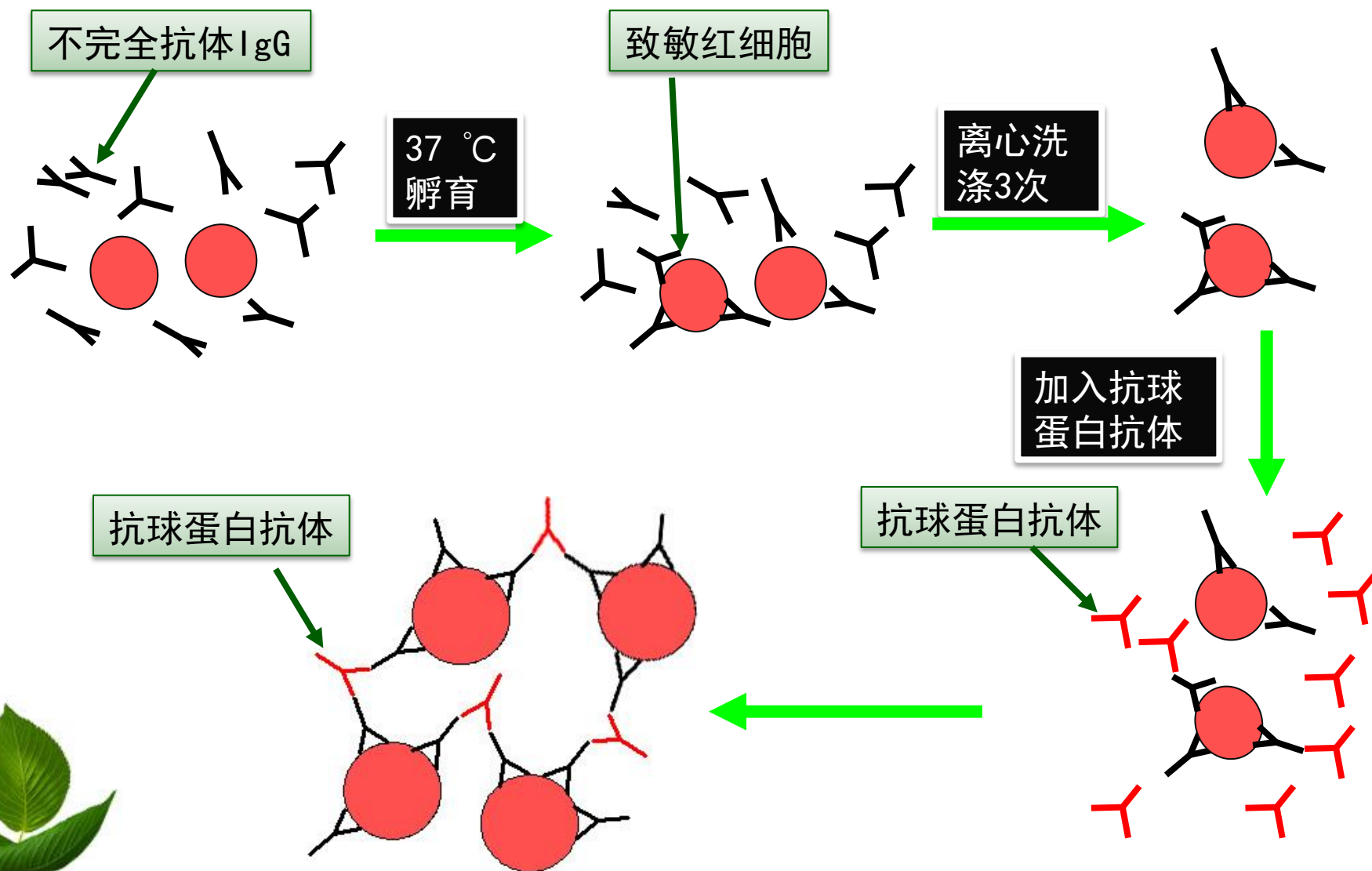


3. 实验的选择

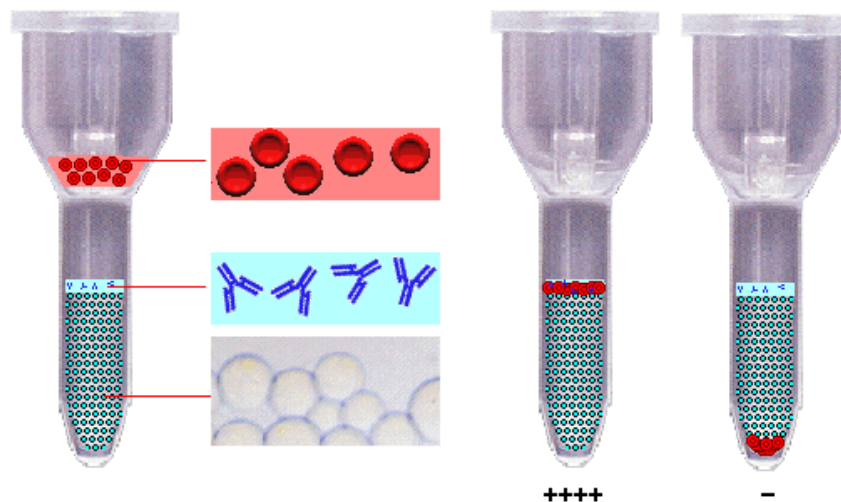
新生儿 血型	直抗	游离试验		放散试验	
		ABO	ABO外	ABO	ABO外
A	✓	✓	✓	✓	✓
B	✓	✓	✓	✓	✓
AB	✓	—	✓	—	✓
O	✓	—	✓	—	✓



传统的抗球蛋白(Coombs)试验



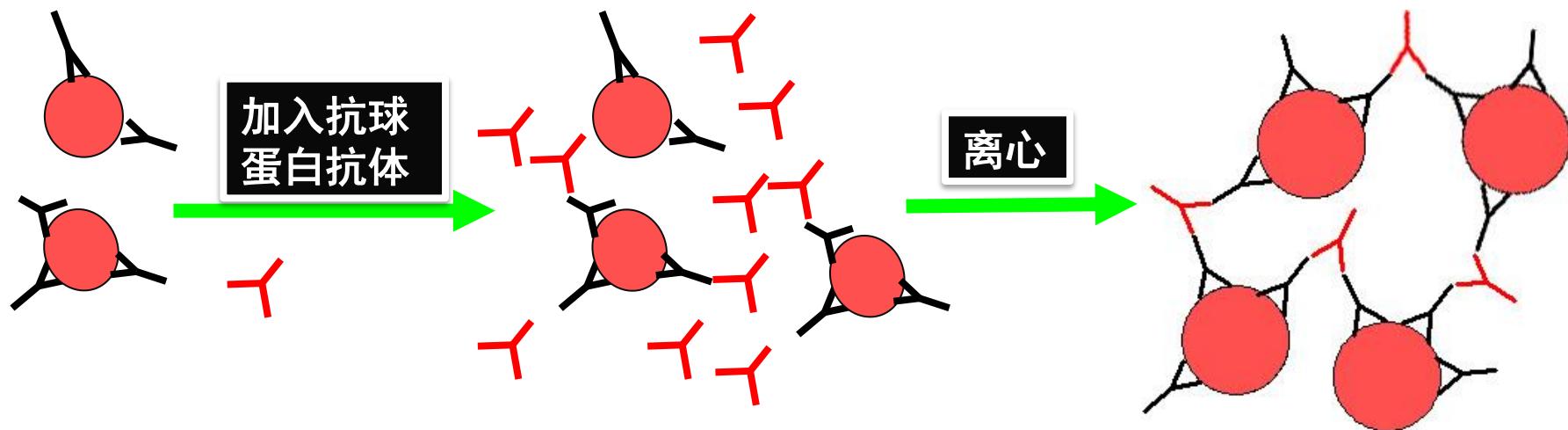
传统的抗球蛋白(Coombs)试验



适合大批量标本检测



直接抗人球蛋白实验



- 试剂：IgG，IgG+C3均可
- 试管法：三次洗涤RBC，配3-5%浓度，1滴RBC悬液+抗人球蛋白试剂2滴，血清学离心机1000g力离心15秒
- 微柱凝胶法：0.8% RBC 50 μ l，配套离心机离心



脐血/新生儿血型抗体检测



- 血型
- 直抗
- 游离抗-A/抗-B
- 抗-O/抗体筛查
- 放散试验
 - AB0内
 - AB0外

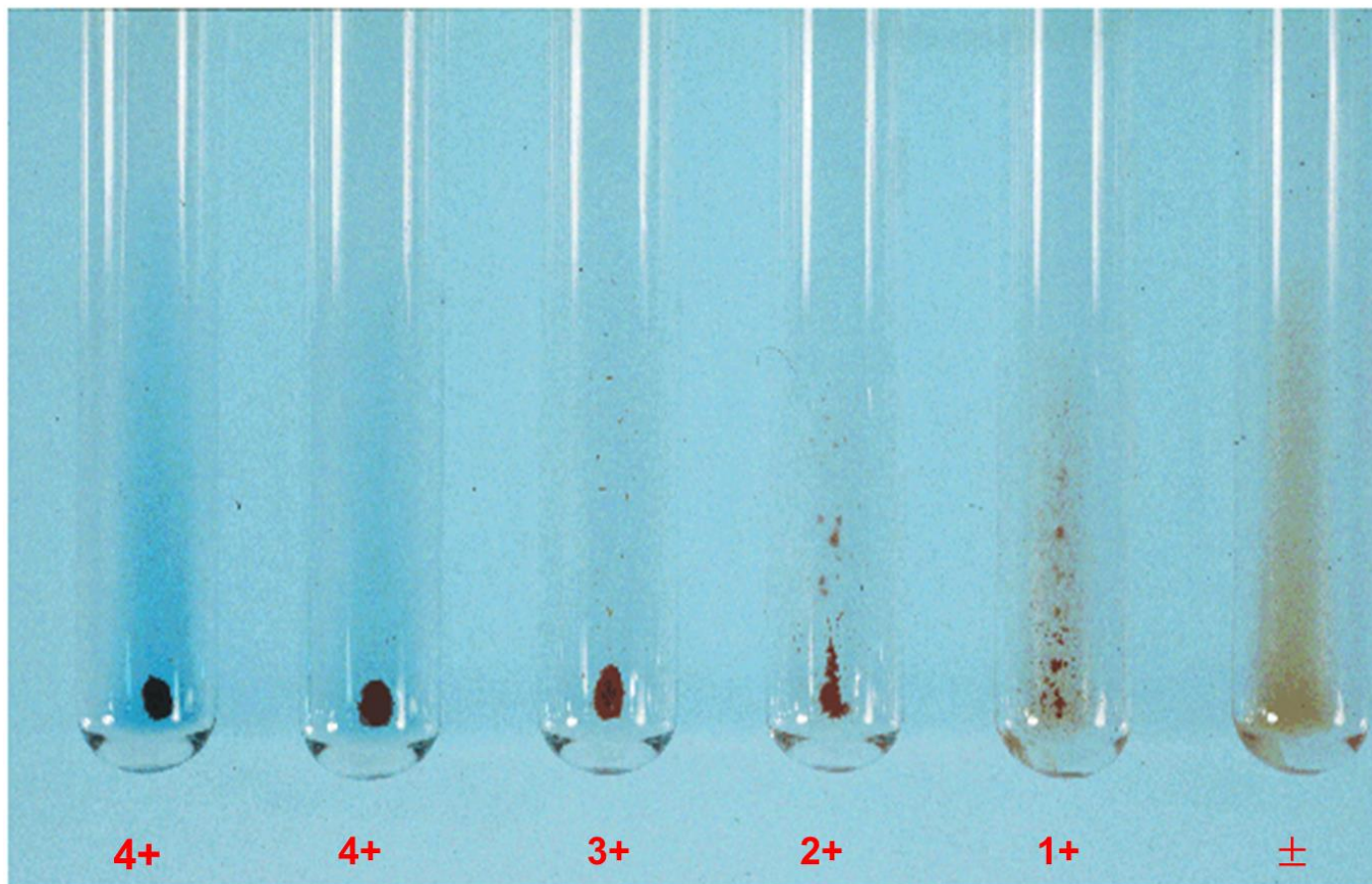
Test	Sheet	Reagents	Cards	Samples
				(7)自由项-抗A效价(32)
				(6)自由项-抗B
				(5)自由项-抗A
				(4)自由项-直抗
				(3)自由项-抗O



结果观察-试管法



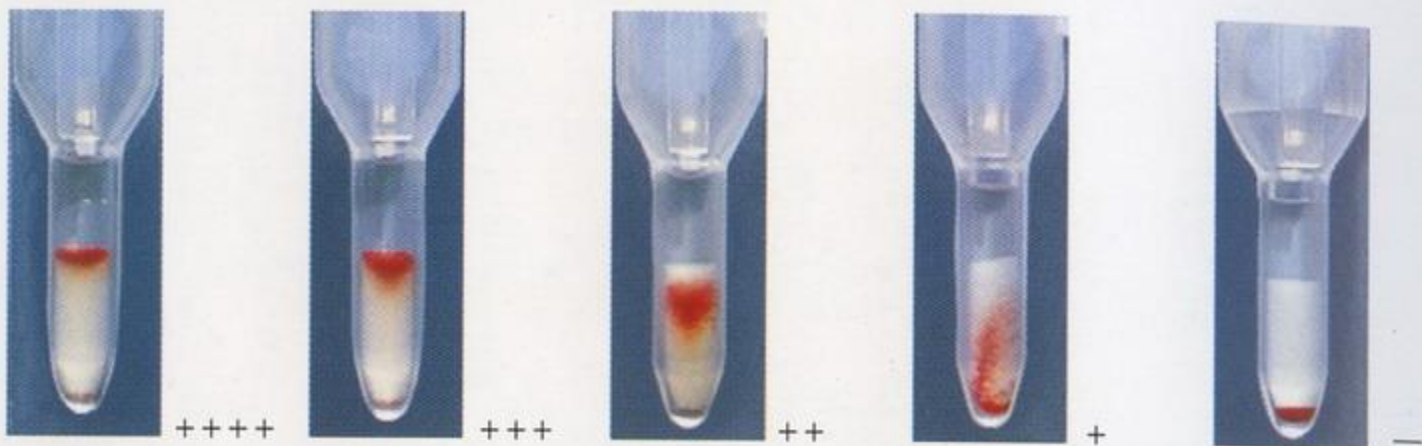
Tube Technique



结果观察-微柱凝胶卡法



血液样本检测结果判断标准：



- 单独直抗试验阳性：药物，感染、疾病等因素可导致直接抗人球蛋白实验阳性



- AB0抗体：抗-A, 抗-B
- AB0外抗体：抗体筛查实验
- 试管法
- 微柱凝胶法



游离抗体检测



与指示细胞反应			结果判断
Ac	Bc	0c	
+	-	-	有游离抗-A抗体
-	+	-	有游离抗-B抗体
+	+	-	有游离抗-A、抗-B 或抗-AB抗体
+/-	+/-	+	有游离的ABO系统 外的抗体
-	-	-	无游离抗体



- ABO血型抗体：
 - 冷放散
 - 热放散

- ABO外血型抗体：
 - 化学放散



- 洗涤后的红细胞吸取10滴至一次性塑料试管，保留最后一次洗液；
- 加入3滴生理盐水，混匀；
- 放入 -80°C 超低温冰箱冷冻15min或 -20°C 冰箱冷冻30min以上，确保细胞完全冰冻成块。
- 将充分冷冻后的红细胞取出，放入 37°C 水浴箱10min，使其融化。
- 将融化后的细胞用4000转/分离心5min，上层液即为放散液。
- 检测放散液并和最后一次洗液做平行比对



重点：结果观察！

氯仿/三氯乙烯放散技术

- 生理盐水洗涤三次待检细胞，保留最后一次洗液
- 压积红细胞加入等体积的生理盐水，混匀
- 加入与上述细胞悬液等体积的氯仿和三氯乙烯混合物
- 塞住试管口，用力摇动试管10s，倒置1min使之混合均匀
- 打开塞子，37℃水浴孵育5min，期间继续混匀
- 离心细胞悬液4000转5min
- 最上层即为放散液，注意不要混入中层或下层物
- 检测放散液并和最后一次洗液做比对



患儿红细胞抗体释放试验



与指示细胞反应			结果判断
Ac	Bc	0c	
+	—	—	释放出抗-A抗体
—	+	—	释放出抗-B抗体
+	+	—	释放出抗-A、抗-B 或抗-AB抗体
—	—	—	未释放出抗体
+	+	+	释放出ABO血型系 统外的抗体





华西第二医院血库检验报告单

姓名(Name): 克吉牛留莫

性别(Sex): 女

条码号(Code No): 1437165000

年龄(Age): 4天

病人类别(Type): 门诊

流水号(No): 20110603G0340410

病员号(Case No): 00879110

科别(Dept): JZEK-急诊儿科

床号(Bed No):

标本类型(Specimen): 全血

送检医生(doctor): 熊菲

诊断(Diag.): 新生儿黄疸

NO	项 目	结果	单位	参考值
【血型检查】				
1	新生儿ABO血型(ABO)	A型		
2	新生儿RH血型(Rh blood group)	D阳性		
【新生儿血型血清学检查】				
	直接抗球蛋白试验(DAT)	阴性		阴性
【ABO系统】				
3	游离抗体测定	阳性	↑	阴性
4	放散试验	阳性	↑	阴性
【ABO外系统】				
5	游离抗体测定	阴性		阴性
6	放散试验	阴性		阴性

--以下为空白--

项目前无*号表示该项目已经通过ISO 15189标准认可

项目前有*号表示该项目尚未通过ISO 15189标准认可

本检验结果仅反映送检标本的情况

备 注:

采样时间: 2011-06-02 09:25:00 检 验 者: 朱凯

打印时间: 2011-06-07 09:28

收样时间: 2011-06-02 09:29:41 审 核 者: 陈剑/李时芳

打印者签名:

审核时间: 2011-06-03 14:37:41

地址: 中国四川成都市人民南路3段20号 电话: 85503273(采血) 85502045(急检)
85501277(免疫) 85503044(生化) 85501201(微生物) 85501354(血库) 85501212(血液)



■ 室内质控：

- 国内没有现成的质控品
- 三天内标本平行检测，最好覆盖阴性，阳性，弱阳性

■ 室间质评

- 卫生部室间质评：输血相容性检测
- 美国CAP PT:J系列， DAT 系列，ELU 系列



- 产科、新生儿科、血库三科联合
- 高ABO外抗体效价孕产妇的备血
- 最快速度保障新生儿换血（2-3小时内）



- 患儿系第4胎，第二产孕39周剖宫产娩出（1天），体重3000克，Apgar评分9-9-10，入院前14小时患儿皮肤出现黄染，外院查HGB131g/L，血型O型Rh阳性，予兰光及白蛋白治疗后6小时查TBIL278 μ mol/L，DBIL:249 μ mol/L，转入我院进一步诊治，以“新生儿黄疸”收入我院新生儿科。



病例讨论1



时间	血液类型	Hb (g/L)	HCT (%)	TBIL (Umol/L)	BU (Umol/L)	BC (Umol/L)
4/11 15:30	末梢	136 (170-210)	41.7 (58-59)	289 (2-210)	269.1 (10-180)	8.8 (0-10)
5/11 00:05	静脉	93	28.4	254.5	218	11.4
5/11 08:20	末梢	103	31	193.2	181	11.9



 姓名：魏友君之子 性别：男 出生日期：2013-11-03 科室：10205 新生儿科 床号：非118床	 姓名：魏友君之子 性别：男 出生日期：2013-11-03 科室：10205 新生儿科 床号：非118床	 姓名：魏友君之子 性别：男 出生日期：2013-11-03 科室：10205 新生儿科 床号：非118床	四川大学华西第二医院 20131104 105							
血型：O型 Rh(D)：阳性 既往输血史：无 输血反应：无		出生日期：2013-11-03 登记号：01904871 科室：10205 新生儿科 床号：非118床								
输血时间：急诊用血（3小时内发血） 血液剂量：1.6单位 数量：2袋		血型：O型 Rh(D)：阳性 既往输血史：无 输血反应：无								
注：申请用血 ≥ 1600ml/次，报医务部审批 800ml/次 < 申请用血 < 1600ml/次。		PT：未测 APTT：未测								
主治及以上级别申请医生：王涛 采集时间：2013年11月4日17时25分 标本接收时间：11月4日17时45分		上级医生审核签名： 采集者（双签字）： 送检者：S.M.R. 接收者：J.Z.								
备注/追加血量： 时间：		联系医生： 记录者：								
以下由血库填写										
血型记录查询：				配血结果记录						
病人血型复检	ABO血型	Rh血型	抗体筛查	时间	检验者	复检者				
首次(输血前血型鉴定)	O	A	2.00 3(+) /	4/11 17:45	J.Z.	J.Z.				
第一批合血	O	A	/	4/11 17:45	J.Z.	J.Z.				
第二批合血										
血袋号	血型	主侧	次侧	配血时间	配血者/审核者	采血日期	发血时间	血量	发血者	取血者
162214	O	+	-	4/11 17:45	D.J.	30/10	4/11 10:40	1.5	J.Z.	J.Z.
162516	O	+	-	4/11 17:45	D.J.	30/10	4/11 10:40	1.5	J.Z.	J.Z.
配血不合格记录： S/M : 血清中检出抗-E, 抗-E 排除。 患者Rh血型：DCEe 162214 : DceE 162516 : DceE										
贴血袋联号处：										

病例讨论1：患儿实验室检查



BIO-RAD

CE
0123

IVD

Antikörper-Suchtest / Antibody screening / Recherche d'anticorps / Screening anticorpale / Escrutinio de anticuerpos irregulares /
Teste pesquisa de anticorpos

4/11 105 魏恩友

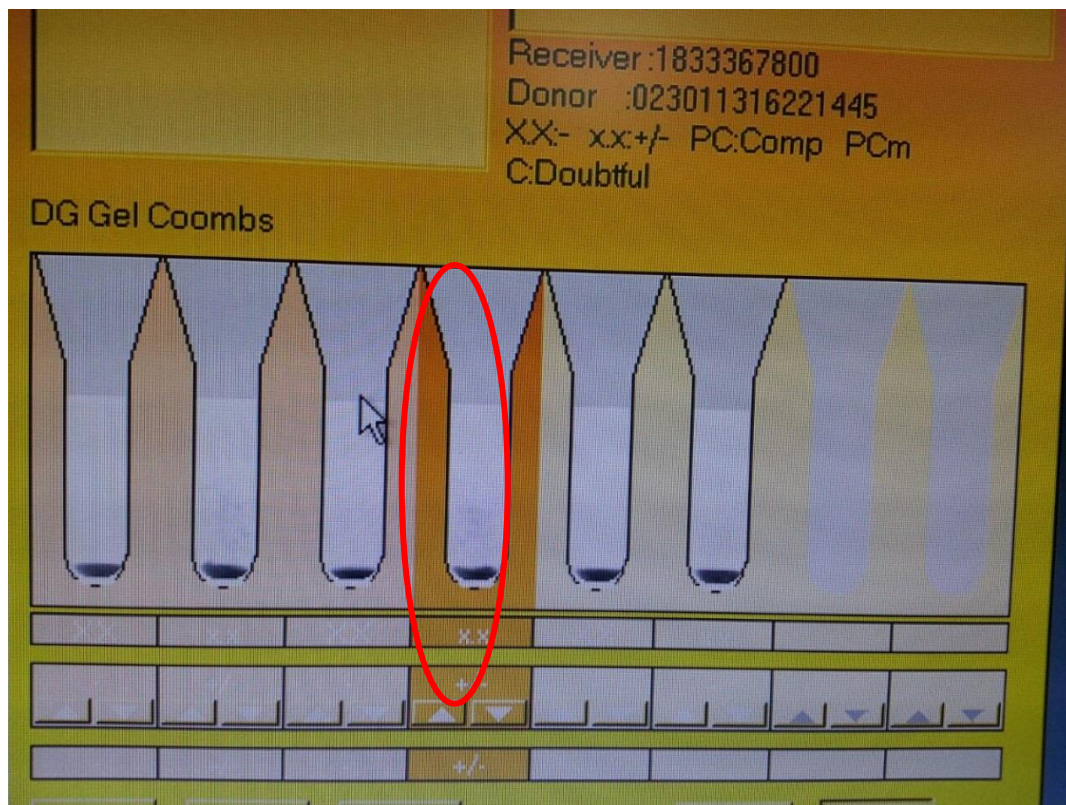
ID-DiaCell I-II-III Asia

Antigen-Tabelle / Antigen-Table / Table d'antigènes / Tabella antigenica / Tabla de antígenos / Tabela de antígenos

Rh-hr	Spender Donor Donneur Donatore Donante Dador	Rh-hr	D	C	E	c	e	C ^u	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ¹	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Xg ^a	Xg ^b	Spez. Antigene Special types Antigènes part. Antigeni particolari Otros Antígenos Tipos especiais	Resultat / Result / Résultat / Resultado / Resultado / Resultado			
																															USS / Coombs	Enzym	4°C	
I	CCD.ee	R ₁ R ₁	124110	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	nt	nt	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+						
II	ccD.EE	R ₂ R ₂	460462	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	nt	nt	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+						
III	CCD.ee	R ₁ R ₁	138244	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	nt	nt	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+						
																															Mi(a+)			
																															Eigenkontrolle / Autocontrol / Autocontrolle / Autocontrollo / Auto-control / Auto-control			



病例讨论1：交叉合血



- 主侧：相合
- 次侧：不相合
- 直接抗球蛋白实验：阳性



病例讨论1：血库夜班报告

- 血型：O，Rh阳性
- 抗体筛查：I，III号细胞阴性，II号细胞阳性（2+）
- 直接抗人球蛋白实验：阳性（4+）
- 交叉合血：主侧（相合），次侧（不相合）

■ 临床沟通：查出非特异性抗体？

■ 临床？？？

——坚持用洗涤红细胞

——洗涤两袋O型红细胞，交叉和血主侧阳性？？？



- 规则血型抗体（ABO血型抗体）
- 不规则血型抗体（ABO外血型抗体）
- 特异性抗体，非特异性抗体



规则/不规则 血型抗体

- 红细胞血型抗原共有30个血型系统（ISBT），240余种血型抗原。
- 规则血型抗体：即ABO血型系统抗体，抗体的产生有规律。
- **不规则抗体（ABO外血型抗体）**：除了ABO血型系统的抗-A, 抗-B以外，其他红细胞血型系统抗体的存在**无规律可循**（含ABO亚型），称为不规则抗体



特异性血型抗体/非特异性血型抗体

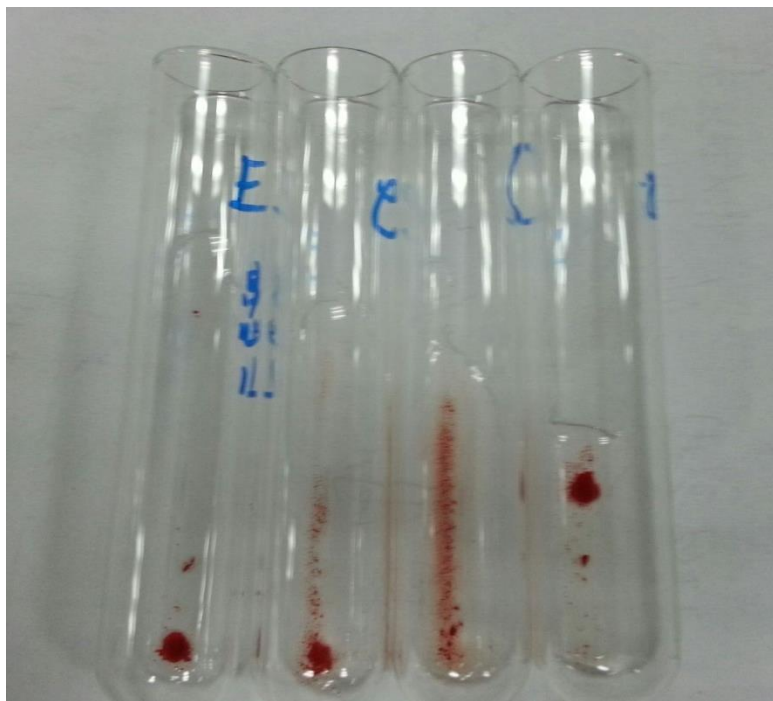
- 特异性血型抗体：某些抗体显示反应的特异性，仅与相应的抗原发生反应
- 非特异性血型抗体：与所有抗原都发生反应，常无特异性
- 血库的正确报告方式：患儿血清中检测出不规则血型抗体或患儿血清中检测出ABO外血型抗体



白班进一步检测

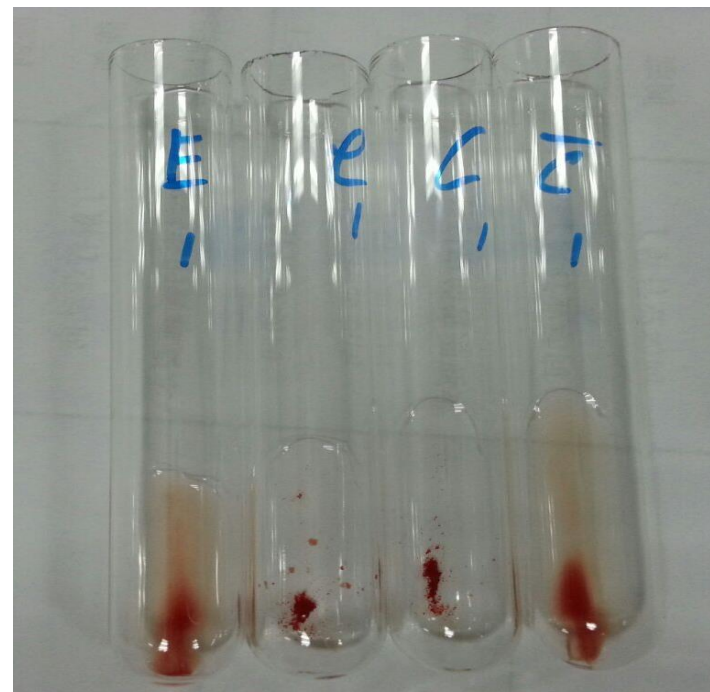


■ 患儿Rh分型：DCcEe



■ 母亲Rh分型：DCCee

■ 缺E, c抗原



患儿抗体鉴定



BIO-RAD

Set ID-DiaPanel: 45161.09.x (Japan: 4516.09.xx)
Set ID-DiaPanel: 45171.09.x (Japan: 4517.09.xx)

LOT

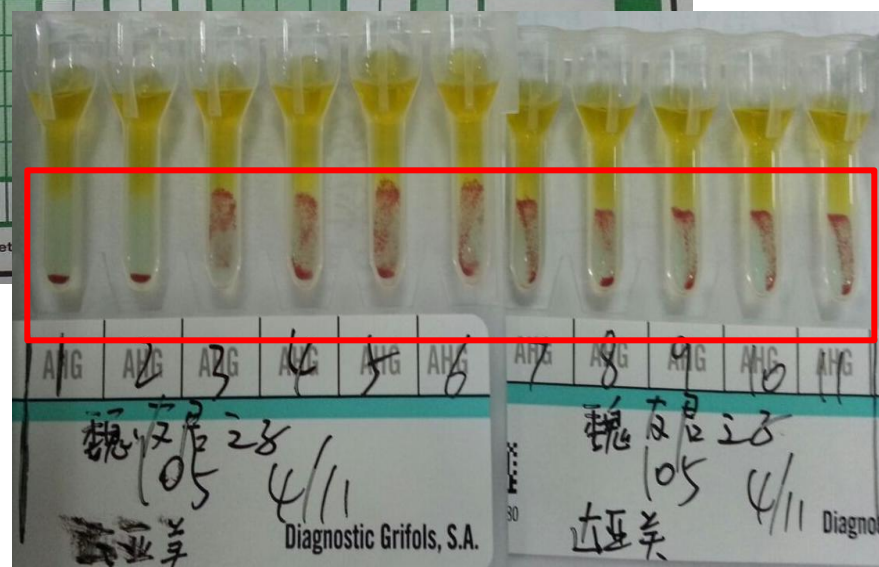
06171.09.x - 06271.09.x
(Japan: 0617.09.xx - 0627.09.xx)
05361.09.x - 05461.09.x
(Japan: 0536.09.xx - 0546.09.xx)

2013.09.09
(Japan: 09.09.13)

V.I.P. Software: P07

Antigen-Tabelle / Antigen Table / Table d'antigènes / Tabella antigenica / Tabla de antígenos / Tabela de antígenos / Identificación de anticorpos / Identificazione anticorpale / Identificación del anticuerpo / Identificação do anticorpos

Rh-hr		Spender Donor Donneur Donatore Donante Dador	Rh-hr						Kell					Duffy	Kidd	Lewis	P	MNS				Luth.	Xg	Spez. Antigene Special types Antigènes part. Antigeni particolari Otros Antígenos Tipos especiales	Result Ris						
			D	C	E	c	e	C ^w	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Xg ^a	Xg ^b		
1	CCC ^W D.ee R ₁ ^W R ₁	117980	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	nt	nt	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+			1
2	CCD.ee R ₁ R ₁	828964	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	nt	nt	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+		Bg(a+)	2
3	ccD.EE R ₂ R ₂	152941	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	nt	nt	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+		Bg(a+)	3
4	Ccddee r'r	318324	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+			4
5	ccddEe r''r	019755	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0			5
6	ccddee rr	212671	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	nt	nt	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+			6
7	ccddee rr	136043	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+			7
8	ccD.ee R ₀ r	123384	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	nt	0	0	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+			8
9	ccddee rr	540993	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+			9
10	ccddee rr	260693	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0			10
11	ccddee rr	508024	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	nt	nt	+	0	+	+	0	0	0	0	+	+	+	0	+	+			11

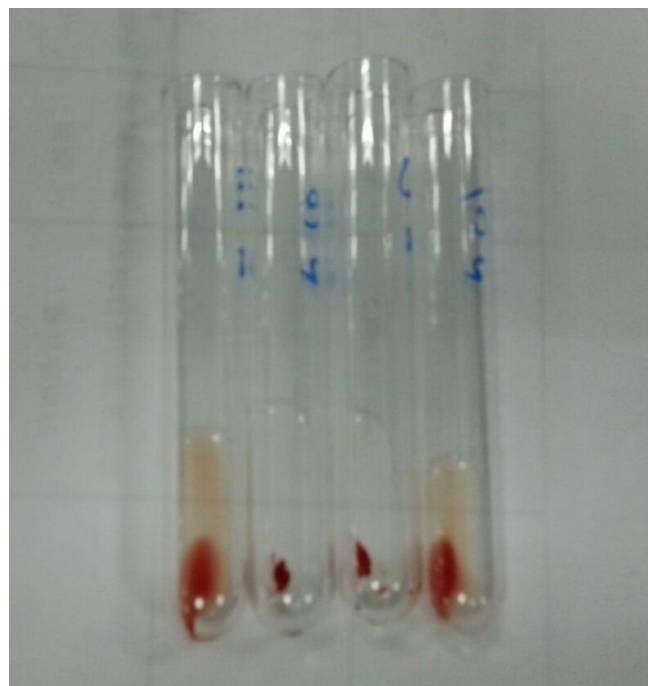
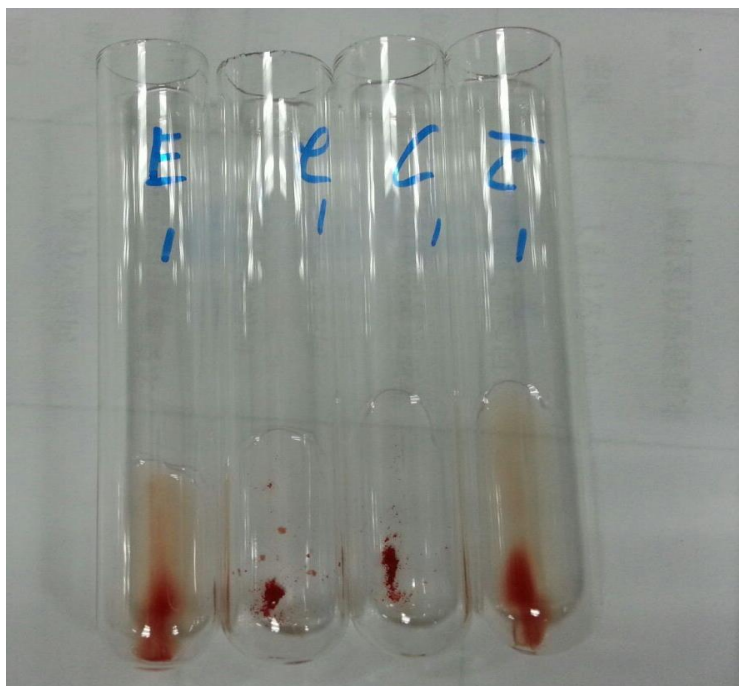


■ 抗-c

■ 抗-E待排



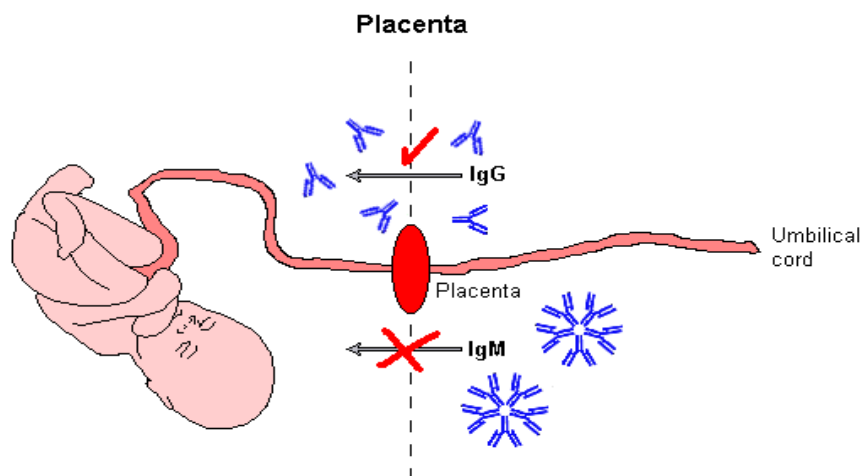
供者Rh分型：DCCee



实验室结果



	血型检测	抗体筛查	抗体鉴定	直接抗球蛋白实验
患儿	O, DCcEe	阳性	抗- c, 抗-E抗体	阳性
患儿母亲	A, DCCee	阳性	抗- c, 抗-E抗体	阴性



Rh血型抗体（抗-c，抗-E）导致Rh新生儿溶血病！

- 输RBC: ABO血型同患儿Rh分型同母亲（无c，E抗原）
- 输新鲜冰冻血浆: AB型RH**阴性**/阳性
- 输血小板: ABO及Rh血型均同患儿



新生儿用血推荐

	红细胞	血浆
常规	O型洗涤/同型去白	AB型血浆
ABO新生儿溶血	O型洗涤	AB型血浆
ABO外新生儿溶血	ABO血型同患儿、Rh血型同母亲 缺相应血型抗体抗原的红细胞	AB型Rh阴性/阳性血浆
ABO外溶血伴ABO 内容血	O型缺相应血型抗体红细胞的 洗涤红细胞	AB型Rh阴性/阳性血浆



洗涤红细胞的常规用法



- 新生儿ABO溶血病
- 对血浆蛋白过敏患者
- 肾病患者

临床医生通常 “认为的” 最安全的输血方式



- ABO新生儿溶血：O型洗涤
- ABO外新生儿溶血：缺相应血型抗体的抗原、主侧相合的红细胞
- ABO溶血合并ABO外溶血：送血液中心参比实验室选择相合RBC洗涤
- 标本采集注意：怀疑HDN尤其ABO外血型抗体致HDN，应第一时间采集母亲血液送检









- 换出85%的致敏红细胞和60%的胆红素及抗体
- 红细胞：血浆=2:1
- 换血量：150-180ml/kg
- 输血及换血指征：实验室检测及临床表现



- 患儿，男，1天1小时，因“发现皮肤黄染10+小时”于2012.4.17 18:20入院。
- 现病史：患儿系G4P2，孕40+6周产儿，于2012年4.16于院外行剖宫产娩出，羊水清亮，否认胎盘异常、脐带绕颈、宫内窘迫、胎膜早破等，Apgar评分1、5、10分钟均为10分，出生体重4170克。10+小时前即出生后15+小时发现患儿皮肤黄染，呈进行性加重且黄染范围逐渐扩大，血清胆红素TB 344.6 μ mol/L，BU 325 μ mol/L，无尖叫、抽搐、发热等，院外予光疗等对症治疗后患儿皮肤仍呈重度黄染，为求进一步诊治入我院治疗。



■ 家族史

- 母亲既往检测血型为“A型RH阳性”。
- 第一胎：女婴，12岁，体健，血型不详，无类似病史。
- 以后2次人流

■ 查体

- T36.6°C，P 142次/分，R 43次/分，Bp 68/43mmHg。入院体重4170g，反应一般，哭声稍弱，全身皮肤、巩膜重度黄染，皮肤弹性差，前囟平软，张力不高，心肺查体无特殊，肝脏肋下1cm，质软，脾脏肋下未及。原始反射正常引出。



■ 新生儿血型抗体检测

【血型检查】

- 1 新生儿ABO血型： A型
- 2 新生儿RH血型： D阳性

【新生儿血型血清学检查】

直接抗球蛋白试验： **阳性**

【ABO系统】

- 3 游离抗体测定： 阴性
- 4 放散试验： 阴性

【ABO外系统】

- 5 游离抗体测定： **阳性**
- 6 放散试验： **阳性**
- 7 新生儿血型抗体筛查试验： **阳性**
- 8 新生儿血型抗体鉴定试验： **抗-D**

■ 实验室检查

	入院	换血前	换血后
Hb (g/L)	119	108	195
TB (ummo l/L)	372	314	238
BU (ummo l/L)	354	289	232



■ 处理

- 光疗、白蛋白、丙种球蛋白
- 换血
 - O型RHD阴性洗涤红细胞700ml
 - AB型RHD阴性冰冻血浆350ml

- ## ■ 经上述临床综合治疗，Hb升至197g/L，胆红素恢复正常，7天后患儿治愈出院。



■ 母亲D?

■ treat



■ 人类红细胞血型系统：

- 30种不同的血型抗原系统（ISBT）
- 240个以上的血型抗原

■ Rh血型系统：

- 最具遗传多肽性，
- 表达的血型抗原多达55种，
- 其中与输血和新生儿溶血密切相关的抗原是D、E、C、e、c



- D: 常见的D抗原, 普通抗-D血清, 盐水法即可检出
- 弱D: D抗原数量减少或D抗原部分抗原表位缺失, 需用不同厂家的抗-D血清, 用盐水法和抗人球蛋白法确认
- D_{del} : 需用吸收放散的方法确认
- 增强D



- 患者和供者检测Rh血型的试剂卡不一样
- 患者：弱D检测为Rh**阴性**，应输入Rh阴性血
- 供者：弱D检测为Rh**阳性**，应作为Rh阳性血供者
- 弱D检测为Rh阳性：试剂问题，人员问题



- 患儿母亲为弱D，检测为D阳性导致纠纷
- 处理？



■ 免疫学：

- 免疫球蛋白亚类的定量检测

■ 分子生物学及免疫学方法检测胎儿血型：

- PCR技术孕16周的孕妇羊水细胞检出胎儿血型基因，如RH、Kell、JK、Fy
- 母体外周血分离胎儿细胞、血浆检测胎儿DNA

■ 羊水吸光值的检测：

- 预测胎儿溶血、水肿的可能性

■ 免疫学方法测定抗体活性

■ 超声检测



谢谢!

