

# RhD 阴性患者的弱 D、DEL 的分布及 RhCE 表型分析

陈 丽,管 政,周 浩,刘凯

**[摘要]** **目的:**研究 RhD 阴性患者的弱 D、DEL 的分布比例,并对 RhCE 的表型进行分析。**方法:**选取常规血清学方法初筛 RhD 阴性的标本,用抗人球蛋白试验检测弱 D,阴性情况下应用吸收放散试验检测 DEL。**结果:**在 129 例 RhD 阴性患者标本中经抗人球蛋白试验确认为弱 D 型者 9 例(6.9%),其表型分别为 ccD<sub>uee</sub> 型 5 例,CcD<sub>uee</sub> 型 3 例,ccD<sub>uEe</sub> 型 1 例。经吸收放散试验确认为 Del 者 24 例(18.6%),其表型分别为 CcDELee 型 12 例,CcDELEe 型 7 例,CCDELee 型 2 例,CCDELEe 型 3 例。**结论:**在采集的初筛为 RhD 阴性的标本中,DEL 阳性标本所占的比例高,应引起重视,其 RhCE 表型比例符合相关文献报道。故于常规血清学检测 RhD 阴性者,应当再用抗人球蛋白试验及吸收放散试验检测是否为弱 D 及 DEL。

**[关键词]** Rh 血型;D 抗原;Del;吸收放散试验

**[中国图书资料分类法分类号]** R 457.11 **[文献标志码]** A

Rh 血型系统是目前已被确认的 29 个血型系统中仅次于 ABO 血型系统的重要血型系统,是人类红细胞血型系统中最为复杂、最具多态性的系统,主要包括 D、C、c、E、e 五种抗原,其中 D 抗原免疫原性最强,是引起新生儿溶血病、溶血性输血反应以及自身免疫性贫血的重要抗原<sup>[1]</sup>。根据红细胞上是否存在 D 抗原,可将红细胞分为 RhD 阳性和 RhD 阴性。常规血清学方法初筛为阴性的个体,大部分可以通过间接抗人球蛋白试验或吸收放散试验测出 D 抗原,分别称为弱 D(或部分 D)或 DEL。虽然弱 D(或部分 D)和 DEL 的 D 抗原表达都极弱,但研究证实可能具有一定的免疫原性<sup>[3]</sup>,因此,开展 Rh 血型系统的弱 D(或部分 D)及 DEL 的筛选与研究对于临床安全用血具有重要意义。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** RhD 初筛试验标本来源于 2012 年 6 月至 2014 年 2 月在我院需进行血型鉴定的住院患者,共检测 51 956 例。弱 D(或部分 D)及 DEL 鉴定标本来源于 2012 年 6 月至 2014 年 2 月 RhD 初筛试验为阴性的住院血型鉴定患者,共 129 例。

**1.2 试剂和仪器** 诊断血清:单克隆抗 D 血清(IgM + IgG),购自德国 Biotest 公司。不完全抗 D(IgG):由上海血液生物有限责任公司提供。IgM 型抗-C、抗-c、抗-E、抗-e 诊断血清:购自上海血液生物有限责任公司。O 型 RhD 阳性试剂红细胞:由本科制作。离心机:购自长春博德公司。微柱凝胶血型正反定型卡:购自长春博迅公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 Rh(D)常规血型血清学初筛** 操作方法遵照长春博迅微柱凝胶血型卡操作说明书。对于初筛为 D 阴性的标本,继续用 IgM 型抗-C、抗-c、抗-E、抗-e 检测其表型,方法参照试剂操作说明。

**1.3.2 弱 D(或部分 D)检测** 用单克隆抗 D(IgM + IgG)及不完全抗 D 血清(IgG)对初筛试验结果为 RhD 阴性的患者标本做间接抗人球蛋白试验,同时设阴性及阳性对照。操作步骤:各取 50 μl 不完全抗 D 血清及单克隆抗 D 血清分别加入微柱凝胶反应卡孔内,并加入 5% 被检红细胞 50 μl,37 °C 孵育 15 min,900 r/min 离心 2 min,1 500 r/min 离心 3 min,观察结果。结果判断:与 2 种抗 D 全部凝集或部分凝集者判定为弱 D(或部分 D),并重复试验验证。

**1.3.3 DEL 检测** 将被检 RhD 阴性压积红细胞与不完全抗 D(两种批号同时试验)血清按 1:1 混匀,37 °C 孵育 1 h,然后洗涤 6 次,末次洗涤后移取部分上清液至另外标记试管中,其余弃尽上清液,加入与之等体积的 0.9% 氯化钠注射液,再加入与之等量的三氯甲烷或三氯乙烯(1:1)混合液,加盖振摇 10 s,倒置 1 min 使之混匀,开盖后 37 °C 水浴 5 min;1 000 r/min 离心 5 min,取上层深红色放散液 100 μl 加 5% O 型 RhD 阳性红细胞 50 μl,37 °C 孵育 30 min,0.9% 氯化钠注射液洗涤 1 次,末次洗涤后弃尽上清液,加入少量稀释液,加入微柱凝胶反应卡中,900 r/min 离心 2 min,1 500 r/min 离心 3 min,观察结果,阳性者经重复试验验证后确定为 DEL。

## 2 结果

在 51 956 例患者中,RhD 初筛阴性者 249 例,阳性率 4.8‰。在 129 例 RhD 初筛阴性患者中共检

出弱 D(或部分 D)型 9 例,Del 型 24 例,阳性率分别为 6.9% 和 18.6%。9 例弱 D 型患者的 Rh 血型的表型分别为 ccD<sup>uee</sup> 型 5 例,CcD<sup>uee</sup> 型 3 例,ccDuE<sup>e</sup> 型 1 例。24 例 Del 型患者的 Rh 血型的表型分别为 CcDELee 型 12 例,CcDELEe 型 7 例,CCDELee 型 2 例,CCDELEe 型 3 例。

### 3 讨论

Rh 血型系统是除 ABO 血型系统之外的临床意义最重要的血型系统,已经成为近年来的研究热点。RhD 基因位于人 1 号染色体上,由紧密连锁的 RHD 基因和 RHCE 基因串联排列组成,RHD 基因由 10 个外显子及 10 个内含子组成。某些情况由于 RhD 基因的重组、突变、缺失及 mRNA 的表达水平下降,可导致红细胞的 RhD 血型出现许多变异型,其中弱 D(或部分 D)型(又称 Du 型)及 DEL 最为常见<sup>[2]</sup>。

RhD 阴性的阳性率因地区和民族差异而不同,汉人阳性率为 2%~5%<sup>[5]</sup>。本研究结果显示 RhD 阴性的阳性率为 4.8%,与文献报道相符。

正常 RhD 阳性的红细胞,其抗原的表达数量正常且无缺失表位,用盐水法即可检出 D 抗原。而弱 D 由于抗原数量少,只有间接抗人球蛋白试验才能检出。本研究对盐水法初筛为 RhD 阴性者 129 例进行间接抗人球蛋白试验,共检测出弱 D(或部分 D)型 9 例。部分 D 是红细胞上 D 表位部分缺失,其体内能产生针对缺失表位的抗体,可与具有相应表位的红细胞结合。因为 RhD 分子至少有 30 个抗原表位<sup>[6]</sup>,所以要想完整地检测部分 D 就需要用一组针对所有的 D 表位的单抗来检测。但由于本研究条件所限(由于采用间接抗人球蛋白试验的方法可以证明红细胞上具有 D 抗原,分类中可以有 D 抗原数量减少,表位减少和数量、表位同时减少等情况),仅采用 2 种 IgG 及 2 种 IgM + IgG 单克隆抗体,未出现单克隆抗体部分凝集的现象,故结果无法确定部分 D,仅表示无法排除部分 D,因此,在条件具备时需用一套针对 D 抗原不同表位的单克隆抗血清试验,才能检出部分 D。

红细胞上存在的只有用吸收放散试验才能检出的非常弱的 D 抗原称为 DEL,其红细胞膜表面 D 抗原表位表达基本完整,但其 D 抗原强度极低,仅含有微量的抗原分子数目<sup>[7]</sup>。文献<sup>[8-9]</sup>报道 RhD 初筛阴性中国人中 DEL 阳性率不尽相同,且差别较大。本研究阳性率为 18.6%,与相关报道相比偏低。分析认为除地区人口 DEL 本身的频率不同原因外,检测方法和诊断试剂的千差万别是主要原因,

因此,弱 D 和 DEL 的诊断试剂需要建立统一的质量标准且要建立标准的诊断程序,只有这样实验结果才具有可比性。不过血清学诊断方法受其技术限制,仍然会出现漏检。近年来由于分子生物学的快速发展,对 D 基因的多态性研究<sup>[10]</sup>已相当深入,基因技术用于弱 D 和 DEL 的检测已成为一个重要的参考方法。

另外,本研究还发现 RhD 初筛为阴性的患者其主要基因型为 ccdee (44.2%) 和 Ccdee (21.2%)。有报道<sup>[11]</sup>发现弱 D 和 DEL 多不带 CE 抗原,本研究并未发现此规律。但是本研究样本过少,弱 D 和 DEL 与 CE 抗原的关系还有待于大样本的研究。

RhD 血型初筛时一般为阴性,如果不进一步做间接抗人球蛋白试验及吸收放散试验便会漏检。有报道<sup>[3]</sup>弱 D 型献血者的红细胞,输给 RhD 阴性患者,可刺激患者发生同种免疫反应而产生 IgG 抗 D。另据报道<sup>[4]</sup>,将 DEL 献血者的红细胞,输给 RhD 阴性的患者,可刺激患者发生同种免疫反应而产生 IgG 抗 D。为确保临床输血安全,如果献血者是弱 D(或部分 D)型及 DEL 时,其血液应当作 RhD 阳性血使用;如果患者是弱 D(或部分 D)型及 DEL,则应视作 RhD 阴性而输注 D 阴性血,因此,对初筛 RhD 为阴性者应进一步作间接抗人球蛋白试验及吸收放散试验判定是否为弱 D(或部分 D)型及 DEL。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review[J]. Blood, 2010, 95(2): 375-387.
- [2] 陆松松, 陈静娴. Rh(D) 变异体的研究进展[J]. 临床输血与检验, 2010, 12(4): 374-378.
- [3] Wagner T, Komoczi GF, Buchta C, et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells[J]. Transfusion (Paris), 2011, 45(4): 520-526.
- [4] Wagner FF, Gassner C, Muller TH, et al. Molecular basis of weak D phenotypes[J]. Blood, 2009, 93(1): 385-393.
- [5] 陈荣仓, 陈筱华, 林碧, 等. RhD 阴性血型抗原分析在临床输血安全中的应用研究[J]. 检验医学, 2011, 26(2): 105-107.
- [6] 刘达庄. 免疫血液学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 30-68.
- [7] 王敏, 王保龙, 蒋光明, 等. Del 红细胞膜表面 D 抗原表位及抗原强度分析[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(1): 23-26.
- [8] 浑守永. 山东汉族 RhD 阴性个体基因多态性研究[J]. 检验医学, 2009, 24(7): 493-496.
- [9] Sun CF, Chou CS, Lai NC, et al. RHD gene polymorphisms among RhD-negative Chinese in Taiwan[J]. Vox Sang, 2009, 75(1): 52-57.
- [10] 周华友, 兰炯采, 王晓珠, 等. 人 RHD 基因外显子多态性研究[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(5): 513-516.
- [11] 王晓珠, 兰炯采, 吴绪华, 等. Rh 弱 D 及 Del 样本的检测研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(3): 509-511.