

RH 最近研究

2020 年 11 月

编者导读:

2020 年 9 月期刊与大家分享了 ABO 血型系统的最近研究, 本期分享临床输血中仅次于 ABO 的一个重要血型系统——Rh。Rh 血型系统是最复杂的血型系统, 于 1940 年由 Landsteiner 和 Wiener 首先发现。目前已知由 49 个明确的血型抗原组成, 其中 D 抗原为 Rh 血型系统中最重要抗原。Rh 血型不合引起的新生儿溶血症最为严重。本月期刊检索了近 3 年国内外公开报导的 Rh 血型系统相关多篇优秀文献, 发现针对 Rh 的最近研究主要包括以下几个方面: Rh 与输血、Rh 与疾病、RH 基因新变异鉴定以及 RH 基因分型方法。每个方面挑选几篇文献, 以便阅读。在此郑重感谢所有文章作者所做出的努力及贡献。编者仅为收录方便学习, 无观点诱导及评判, 亦无商业目的。

共计 16 篇文献, 主要内容如下:

(1) Rh 与输血: 3 篇 (1-3)

1: RH 基因型匹配输血研究进展综述——Rh 表型同型的输血可以产生同种免疫抗体, 更为精准的 Rh 基因型匹配输血有取代之势。基因分型是鉴定疑难血型的金标准。

2: 镰状细胞病 (SCD) 输血——SCD 患者输血清学 Rh 抗原匹配红细胞可产生 Rh 同种免疫。变异 RH 等位基因导致约 1/3 的 SCD 患者输血后 Rh 抗体阳性。根据 RH 基因型匹配患者与供体可能减轻 Rh 同种异体免疫, 且可行。

3: RhD 状态可以预测输血结果——与阴性 RhD 状态相比, 供者或受者阳性 RhD 状态与更大的血红蛋白增量相关。

(2) Rh 与疾病: 7 篇 (4-10)

4: Rh 与骨髓增生异常综合征——骨髓增生异常综合征致 RhD 抗原减弱。

5: Rh 与肝硬化肝癌——Rh 阳性患者肿瘤多中心定位明显升高。

6: Rh 与 COVID-19——Rh 阳性与检测 COVID-19 阳性率较高相关。

7-10: Rh 与新生儿溶血病 (HDN) ——抗 RhD 抗体治疗 HDN 的机理研究 (7); 对孕妇 (8) 和胎儿 (9-10) 进行 RH 基因分型, 以预防 HDN。

(3) RH 基因新变异鉴定: 3 篇 (11-13)

11: RHD 基因新变异鉴定。

12: RHCE 基因新变异鉴定。

13: RHAG 基因新变异鉴定 (导致血清学弱 D)。

(4) RH 基因分型方法: 3 篇 (14-16)

14: 多重连接依赖探针扩增法 (MLPA) ——MLPA 法正确检测 D 阴性韩国人的 RHD 基因型, 包括 RHD-CE-D 杂交等位基因或 RHD(1227G>A)等位基因, 以及其他 17 个血型系统的临床相关血型基因型。在血清学 D 阴性个体上使用 MLPA 分析可能有助于通过预防抗 D 同种免疫来提高输血安全性。

15: 自定义下一代测序(NGS)法——从 NGS 数据中自定义分析方法来估计 RhD 和 RHCE 特异性拷贝数, 可以准确检测 RH 结构变异 (SV)。

16: 分子基因分型平台 ID RhD XT——鉴定 6 种 RhD 等位基因变体和人血小板抗原 HPA-1a/1b, 可用于对 RhD 血清学差异患者的正确管理和妊娠期 RhIG 的合理使用。

目录

| | |
|--|----|
| 1 《RH 基因型匹配输血研究进展》 | 3 |
| 2 《RH genotype matching for transfusion support in sickle cell disease》 | 7 |
| 3 《Effect of donor, component, and recipient characteristics on hemoglobin increments following red blood cell transfusion》 | 9 |
| 4 《骨髓增生异常综合征致 RhD 抗原减弱 1 例分析》 | 9 |
| 5 《Prognostic role of ABO blood group and Rhesus factor in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma》 . | 11 |
| 6 《Blood type and outcomes in patients with COVID-19》 | 11 |
| 7 《Anti-RhD antibody therapy modulates human natural killer cell function》 | 12 |
| 8 《RhD 阴性孕妇的 RHD 基因分型及 Rh 表型分析》 | 12 |
| 9 《Prenatal non-invasive foetal RHD genotyping: diagnostic accuracy of a test as a guide for appropriate administration of antenatal anti-D immunoprophylaxis》 | 14 |
| 10 《Amplicon Sequencing-Based Noninvasive Fetal Genotyping for RhD-Positive D Antigen-Negative Alleles》 .. | 15 |
| 11 《A novel RhD allele caused by c.739 G>C mutation was identified in a Chinese individual》 | 17 |
| 12 《A novel silent RHCE allele in Chinese population》 | 17 |
| 13 《A variant RhAG protein encoded by the RHAG*572A allele causes serological weak D expression while maintaining normal RhCE phenotypes》 | 18 |
| 14 《Application of Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay for Genotyping Major Blood Group Systems Including DEL Variants in the D-Negative Korean Population》 | 19 |
| 15 《Genomic characterization of the RH locus detects complex and novel structural variation in multi-ethnic cohorts》 | 20 |
| 16 《A multi-centre study on the performance of the molecular genotyping platform ID RhD XT for resolving serological weak RhD phenotype in routine clinical practice》 | 21 |

RH 最近研究专刊

(编辑: 艾丽萍, 张悦, 陈悦妍)

1 《RH 基因型匹配输血研究进展》

作者: 赵桐茂

来源: 精准医学杂志 2019 年 8 月第 34 卷第 4 期

摘要: Rh 是临床输血中仅次于 ABO 的一个重要血型系统。目前使用特异性抗体鉴定出来的 Rh 抗原已有 50 多个, 使用基因分型检测出的 Rh 抗原变异体有数百种之多。近年发现 Rh 表型同型的输血可以产生同种免疫抗体, 颠覆了实施将近 80 年的 Rh 同型输血原则, 而更为精准的 Rh 基因型匹配输血有取代之势。虽然在紧急情况下, **血清学是鉴定血型唯一实用方法, 但是基因分型是鉴定疑难血型的金标准**。本文主要介绍 Rh 基因型匹配输血的原理及其临床应用。

从免疫学角度看, 输血是一种同种免疫作用, 供受者之间红细胞血型抗原不匹配的输血, 可能使受者产生同种免疫抗体, 导致危及生命的溶血性输血反应和新生儿溶血病。红细胞血型是使用特异性抗体检测出来的红细胞表面抗原的遗传多态性, 在目前已经检测出来的 36 个人类血型系统中, Rh 是临床输血中仅次于 ABO 的一个重要的、也是迄今所知最为复杂的血型系统, 它包含 50 多个 Rh 抗原。自 1939 年发现 Rh 血型以来, 选择 Rh 同型血液输注的原则一直沿袭至今, 然而近年来发现, **Rh 同型输血也可以产生同种免疫抗体**, 这对于如何优化 Rh 配型, 改善安全输血提出了挑战。于 21 世纪诞生的“血型基因组学”新学科, 为在基因组水平上研究血型多态性的分子基础, 并**发展出一整套以 DNA 为检材的血型基因分型技术**。通过对 Rh 血型基因组结构的研究, 发现了大量目前血清学方法还不能检测的 Rh 抗原变异体, 采用 Rh 基因型匹配的输血, 可以有效地避免 Rh 血型系统引起的输血相关同种免疫反应。

1 Rh 抗原及其变异体

Rh 血型抗原活性是由红细胞表面上的 Rh 蛋白和 Rh 相关糖蛋白组装而成的复合物所决定, 它们分别受控于 1 号染色体上两个紧密连锁的 RHD 和 RHCE 遗传位点, 以及 6 号染色体上的 RHAG 位点。**RHD 和 RHCE 是两个紧密相连且高度同源的基因, 各包含 10 个外显子**, 在基因组 DNA 中相向排列, 跨越约 75000 bp DNA 序列, 编码 Rh 抗原蛋白质分子的氨基酸序列。RHAG 位点等位基因通常与红细胞不表达 Rh 抗原的 Rh 无效型相关。RHD 位点编码 RhD 抗原, 具有较强的免疫原性。**根据红细胞表面是否表达 RhD 抗原, 被分为 Rh 阳性和 Rh 阴性两大类**。由于 RhD 抗原不合的输血或妊娠等同种免疫作用, 可以产生 Rh 抗体并导致溶血性输血反应和新生儿溶血病, 因此鉴定 RhD 表型被列为临床输血检测常规。**RHCE 位点以 4 种常见等位基因形式存在, 分别编码 Ce、ce、CE 和 cE 等 4 种抗原组合**, 在输血前的 Rh 血型常规检测一般鉴定 D、C、c、E 以及 e 等 5 个抗原。除此之外, 在 RHD 和 RHCE 位点还检测出了大量的等位基因, 它们编码 Rh 抗原变异体。截至 2018 年 12 月, 在 RhesusBase 资料库已经收集到 334 个 RhD 变异体, RHD 位点上检测出 481 个等位基因, RHCE 位点上检测出 150 个, RHAG 位点上检测出 27 个。虽然在 RHD 和 RHCE 位点上的等位基因数量超过 600 个, 但是目前使用特异性抗体检测出来的、被正式命名的 Rh 抗原只有 55 个, 提示使用血清学方法不能检测出所有的 Rh 抗原变异体。

在 RhD 抗原变异体中, 绝大多数属于“血清学弱 D 表型”, 它们与 IgM 抗 D 抗体呈 ≤ 2+ 弱凝集反应, 或是无凝集反应, 但是在抗人球蛋白试验中均呈阳性反应。根据凝集反应强度以及基因突变位点所在位置, 弱 D 变异体表型被分为部分 D、弱 D 和 DEL 等 3 类: ① RhD 抗原是由 30 余种不同的表位镶嵌而成, 部分 D 表型缺少某些表位而影响到抗原结构, 因此不被某些抗 D 抗体所识别。RHD 基因内单核苷酸和多核苷酸碱基取代, 以及 RHD 和 RHCE 交换重组产生的 RHD-CE-D 杂交基因, 都可以导致位于细胞膜外部分的 RhD 蛋白分子氨基酸改变。部分 D 表型个体接受正常 RhD 阳性血液可以产生针对所缺少表位的抗体。目前检测出 118 个弱 D 变异体。② 弱 D 表型红细胞表面 D 抗原数量减少, 与 IgM 抗 D 抗体无凝集反应, 采用间接抗球蛋白试验才能检测出 D 抗原。在 D 抗原蛋白分子的跨膜区或胞内区发生 1 个氨基酸错义取代, 目前已

经检测出了 171 个弱 D 表型等位基因。③DEL 表型红细胞表面 D 抗原数量比弱 D 型还要少，而且抗原结构也有所变化，只能使用吸收放散方法检测出。RHD 基因内单核苷酸碱基突变、核苷酸片段插入和缺失以及 RHD 基因剪接位点突变等均可以产生 DEL 表型。目前已检测出 45 个 DEL 表型，某些 DEL 型个体可以产生抗 D 抗体。中国人弱 D 变异体中以 DEL 表型居多。

2 Rh 抗原同种免疫作用

虽然至今被 ISBT 正式命名的红细胞抗原有 346 个之多，但是输注红细胞产生的同种免疫抗体主要是由 Rh 血型抗原所引起。不同种族群体中 Rh 血型抗原分布不尽相同，同种免疫 Rh 抗体的发生率也不相同。在中国输血患者中也是以产生 Rh 同种免疫抗体居首位。一项对近 610 万例中国输血患者的不规则抗体筛查报告显示，共检测出 14095 例 ABO 血型以外的抗体，其中 9589 例为 Rh 抗体，约占 68%。其中在 9589 例 Rh 抗体中，抗 E 和抗 D 抗体分别占 41%和 30%；在 718 例抗体特异性明确的溶血性输血反应中，约 85%是由于 Rh 系统抗体所造成；在 1663 例新生儿溶血病患者中，1566 例是由于 Rh 血型系统的抗体所致，其中抗 D 和抗 E 抗体分别占 61%和 23%。另一份对近 15 万例中国辽宁省输血患者进行的回顾性分析研究显示，在检测出的 1200 例 ABO 以外的不规则抗体中，Rh 抗体 534 例，占 45%。在 534 例 Rh 抗体中，抗 E、抗 cE、抗 D 抗体分别占 56%、14%和 12%。

目前我国实施的《临床输血技术规范》规定输血前必须检测 RhD 抗原，但是并未要求检测 RHCE 位点抗原，因此由于 RHCE 位点抗原引起的同种免疫抗体数量较多。在上述的 2 份报告中，**抗 E 抗体占有检测出的 Rh 抗体的 41%与 56%；而抗 D 抗体只占 12%与 30%。**提示对于中国输血患者，在输血前除了做 RHD 位点抗原配型之外，还有必要对 RHCE 位点抗原进行配型。

3 RH 基因分型及其应用

使用红细胞凝集技术检测血型抗原和抗体已经有 100 多年历史，它成为鉴定血型抗原的金标准。可是随着血型基因分型技术在全球变得越来越普遍，都认知单独血清学方法不能正确鉴定所有已知的血型抗原。虽然血清学仍然是在紧急情况下鉴定血型抗原的唯一实用方法，**但是分子检测是鉴定疑难血型的金标准。**

大多数的 RH 变异体都表现为单核苷酸多态性 (SNP)，检测 SNP 的分子生物学技术都可以用于检测 Rh 抗原变异体。目前报告的方法多以聚合酶链反应 (PCR) 为基础，所不同的只是检测 PCR 扩增产物的方法。采用序列特异性引物 (SSP) 进行 PCR 扩增，然后电泳分析扩增产品的 PCR-SSP 基因分型技术最为常见。PCR 扩增产物和携带顺序特异性寡核苷酸探针 (SSOP) 的基因芯片杂交，适合高通量 RH 基因分型。但是以上这些技术只能检测已知突变位点的变异体，不能检测尚未被发现的基因突变。近年来新发展出来的下一代测序 (NGS)、全外显子测序 (WES) 技术以及全基因组测序 (WGS) 基因分型技术克服了检测等位基因的局限性，可以成功地检测出所有 RH 位点变异体，WES 已经被用于镰状细胞疾病患者的 RH 基因分型。WHEE-LER 等使用 NGS 技术，检测了世界卫生组织的 4 例基因分型参考品、11135 例亚裔和美洲原著民以及 1715 例非裔美国人样品的 RH 位点基因组序列。发现在每组样品中都检测出 RH 基因结构变异；基因分型和 RhD、Rhc 抗原血清学分型吻合度大于 99%；RhC 抗原表达与 RHCE*D(2)ce 杂交分子相关；在非裔美国人中，比较常见外显子 4-7 的杂交基因 RHD*dCE(4-7)-d，以及外显子 9 杂交基因 RHCE*D(9)-ce。这些结果表明 NGS 可以准确鉴定 RH 基因的结构变异体。

RH 基因分型的另一个用途是鉴定 Rh 疑难血型，下面仅举一例说明。DENOMME 等报道一名 29 岁的非洲裔美国孕妇，无输血史，也未接受抗 Rh 免疫球蛋白处理，ABO 正反定型和抗体筛查表明其为 O 型、RhD 阳性，血清含有抗 D 抗体。该孕妇红细胞与用于研究的 12 份单克隆抗 D 试剂无凝集反应，但是与 FDA 批准的 4 份单克隆抗 D 试剂中的 2 份发生凝集反应，提示该红细胞携带一种罕见的 RhD 变异体。为了确认该变异体的特性，进一步进行了基因分型，结果发现该患者缺失 RHD 基因，在 RHCE 位点存在 RHCE*ce697C>G 以及 RHCE*ce733C>G 单核苷酸取代。虽然基因分型预测该红细胞不表达 D 抗原，但是观察到与 2 份单克隆抗 D 试剂发生凝集反应。DENOMME 等又注意到这个凝集反应格局类似于 Rh 系统中的 RH43 (Crawford) 抗原，并且该抗原只与一份含有抗 RH43 抗体的多克隆抗 D 试剂发生反应。基因分型示 RH43 表型个体携带 RHCE*ce48G>C、RHCE*ce697C>G 和 RHCE*ce733C>G 等 3 个核苷酸取代，使 RHCE 突变基因产生 1 个类 D 表位，该表位可以被一些 FDA 批准的单克隆分型试剂所识别，据此 DENOMME 等

判断该孕妇实际上携带 1 个 RH43 抗原的变异体。

4 RH 同型输血产生 Rh 抗体

自从 80 年前 Rh 血型被发现以来，为避免发生同种免疫反应，临床输血一直采用 Rh 同型相输的原则。但是越来越多的循证医学证据表明，**Rh 同型输血仍然不能避免产生同种免疫抗体**。2015 年 IPE 等报道一例 5 岁男性镰状细胞贫血患者，2 年前曾接受 O 型、RhD 阳性输血，在 10d 前输注 1 个单位的 O 型、RhD 阳性红细胞后出现腹痛、黑尿和疲劳等症状。实验室检查表明严重贫血，伴有血红蛋白尿；血型鉴定为 O 型、RhD 阳性；血清含有抗 D 抗体。为了解释为什么该 RhD 阳性患者产生抗 D 抗体而进行了 Rh 基因分型。结果表明患者为 RHD*DAU4 纯合子，并携带 1 个 RHCE*ce48C 核苷酸取代，这 2 个等位基因分别编码部分 D 抗原以及 1 个弱 e 抗原。由此可见，该患者是受到正常 RhD 抗原的同种免疫作用而产生抗 D 抗体，并导致迟缓性溶血性输血反应。最后医生采取输注 RhD 阴性血液治愈严重贫血。

镰状细胞疾病患者需要经常性输血，近年来有大量研究显示尽管使用 Rh 血清学表型同型血液输注，但是同种免疫反应的发生率还是很高。其中比较有代表性的是 CHOU 等的报道，该文系统地评估了 RhD、C 和 E 抗原表型匹配对镰状细胞疾病患者产生抗体的影响。在 123 例接受慢性输血的受检患者中，有 71 例产生同种免疫抗体，高分辨 Rh 基因分型表明约 87% 的患者携带编码 Rh 变异体的等位基因。在 117 例 RhD 抗原阳性患者中，有 26 例（22%）产生抗 D 抗体；在 36 例 RhC 抗原阳性患者中，有 8 例（22%）产生抗 C 抗体；所有 123 例患者均携带 e 抗原，其中有 15 例（12%）产生抗 e 抗体；在 19 例 RhE 阳性患者中，有 2 例（11%）产生抗 E 抗体。

从以上报道可见，**Rh 抗原表型匹配不等于 RH 基因型匹配**。由于 RH 基因产物是 Rh 抗原蛋白分子，任何 RH 基因核苷酸取代都将改变 Rh 抗原表位（镶嵌因子）的结构，因此 RH 基因型不匹配的输血为产生同种免疫抗体留下了隐患。虽然目前还不可能取得针对所有 Rh 镶嵌因子的抗体，但不表示它们不存在。因此对于 Rh 这种复杂血型系统，唯有通过基因分型技术，选择 RH 基因型匹配的血液。从精准输血角度考虑，对某些特定 Rh 基因型个体的输血，需要“量身定做”，选择合适的供者。

5 血清学表型匹配和基因型匹配的比较

Rh 血清学表型是由相应抗体所定义。Rh 抗体特异性多种多样，它们可以识别红细胞表面 Rh 抗原的 1 个表位或若干个表位的组合。而 RH 基因型是由 DNA 序列所定义，1 个碱基突变将改变 Rh 抗原蛋白分子中的 1 个氨基酸，进而影响 Rh 蛋白分子的结构。从免疫学原理考虑，变异的 Rh 抗原分子应该可以被相应的同种抗体或单克隆抗体所识别，但是这些抗体并非总是存在。比如目前**商业性的 RhD 分型试剂还不能检测全部 RhD 变异体**，美国 FDA 批准的单克隆抗 D 分型试剂，就不能检测白人中常见的部分 D 表型 DVI 抗原。由此可见，**Rh 血清学同型输注并不能保证它们的抗原分子结构完全相同，因此产生同种免疫抗体并不意外。**

在图 1 示例中，假设在随机供者群体中，大部分个体携带正常 e 抗原，也有个别人携带 ev1、ev2 等 e 抗原变异体。所有这些个体的红细胞与抗 e 抗体均呈阳性反应，故血清学分型判断为 e 抗原阳性。**如果患者红细胞携带 e 抗原变异体 ev1，在输注携带正常 e 抗原，或是携带抗原变异体 ev2 的供者红细胞后，有产生抗 e 或抗 ev2 同种免疫抗体的风险。**而采用基因分型匹配方法，可以选择携带和患者同样的 ev1 抗原供者，这样就可以避免发生同种免疫作用的风险。

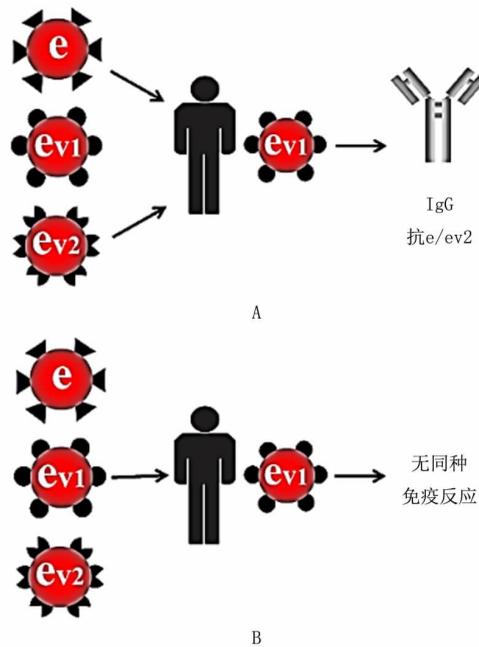


图 1 血清学表型匹配和基因型匹配的比较。A：使用血清学鉴定所有随机供者和受者均为 e 抗原阳性。如果受者携带 e 抗原变异体 ev1，接受携带 e 或 ev2 抗原的随机供者血液有产生抗 e 或抗 ev2 同种免疫抗体的风险；B：采用基因型匹配方法，选择和受者携带同样的 ev1 抗原供者，可以避免发生同种免疫作用

6 选择 RH 基因型匹配供者

人类白细胞抗原 HLA 是人类主要组织相容性抗原，在使用无关供者的造血干细胞移植中，在等位基因水平上的 HLA 精确匹配，有助于提高骨髓移植生存率，并在全球范围建立了已知 HLA 基因型的无关骨髓供者库。Rh 抗原的多态性要远低于 HLA 多态性，是否有必要建立已知 RH 基因型的供者库，以用于 RH 基因型匹配供者输血？CHOU 等比较了 857 例非裔美国人镰状细胞疾病患者和 587 例非裔美国人供者的 RH 等位基因频率，发现这 2 组群体的 RH 等位基因频率相近，29%的 RHD 基因和 53%的 RHCE 基因发生改变。要获得 RH 基因型匹配供者的数量，大约是 RH 血清学匹配供者数量的 2 倍。结果提示对镰状细胞疾病患者进行预防性 RH 基因型配型是可行的。法国自 2010 年起在全国范围对镰状细胞疾病患者逐步实施 RH 基因型匹配输血，目前已经有 1148 例患者参与此项目。

RH 血型的分布与种族群体密切相关。比如几乎 100%的 RhD 阴性白人缺失 RHD 基因，而中国人 RhD 阴性个体仅约 70%缺失 RHD 基因，其余 30%多为携带 RHD 和 RHCE 杂交基因。在中国人随机输血中，RHCE 位点抗原错配比例高于 RhD 抗原错配比例，SHAO 等评估在中国人患者中选择 RHCE 基因型匹配供者输血的可行性。他们对 481 例β地中海贫血患者做了 RHCE 位点的基因分型，其中 203 例患者在至少 3 个月内连续输注 RH 基因型相同的红细胞。使用血清学方法检测 203 例患者和 400 例对照组供者红细胞 RHCE 位点抗原，发现 2 组均以 CcEe 和 CCee 表型为主，它们在患者组中的频率分别为 55.3%和 24.9%，在对照组中分别为 49.3%和 31.3%，提示大约 80%的中国患者可以找到 RHCE 基因型匹配的供者。作者认为医院血库只要有一定的库容量，就可以满足 RH 基因型匹配输血的要求。

7 总结

对于依赖输血或接受多次输血的患者几乎必然产生同种免疫抗体，其中以 Rh 血型系统抗体最为常见。在后基因组时代，优化 Rh 血型匹配面临挑战，但是血型基因分型技术提供了一个解决工具。**选择 RH 基因型匹配的血液供者，可以明显降低产生同种免疫抗体的概率，从而提高输血安全性。**血型基因型匹配输血的原理和概念，也适用于所有其他抗原为蛋白质的血型系统。在可预见的未来，如果分子技术变得更简便易行、检测时间更快、费用更实惠，红细胞基因分型有可能替代某些血型系统的血清学分型。

2 《RH genotype matching for transfusion support in sickle cell disease》

《RH 基因型匹配用于镰状细胞病输血支持》

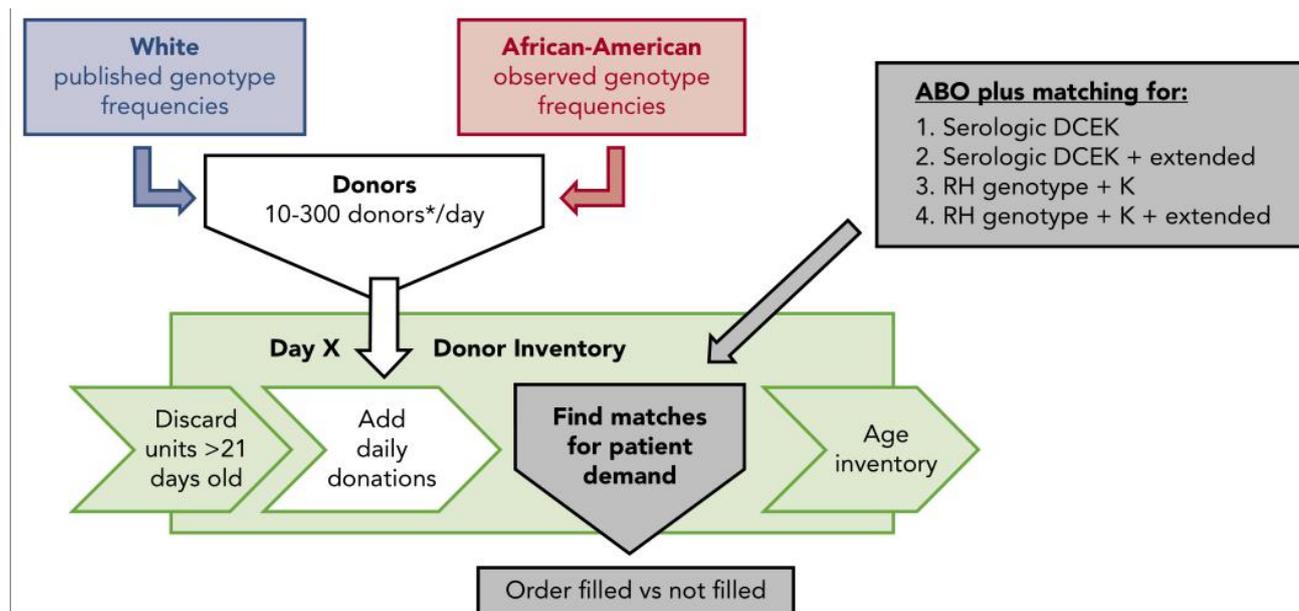
作者: Chou ST, Evans P, Vege S, Coleman SL, Friedman DF, Keller M, Westhoff CM.

来源: Blood. 2018 Sep 13;132(11):1198-1207.

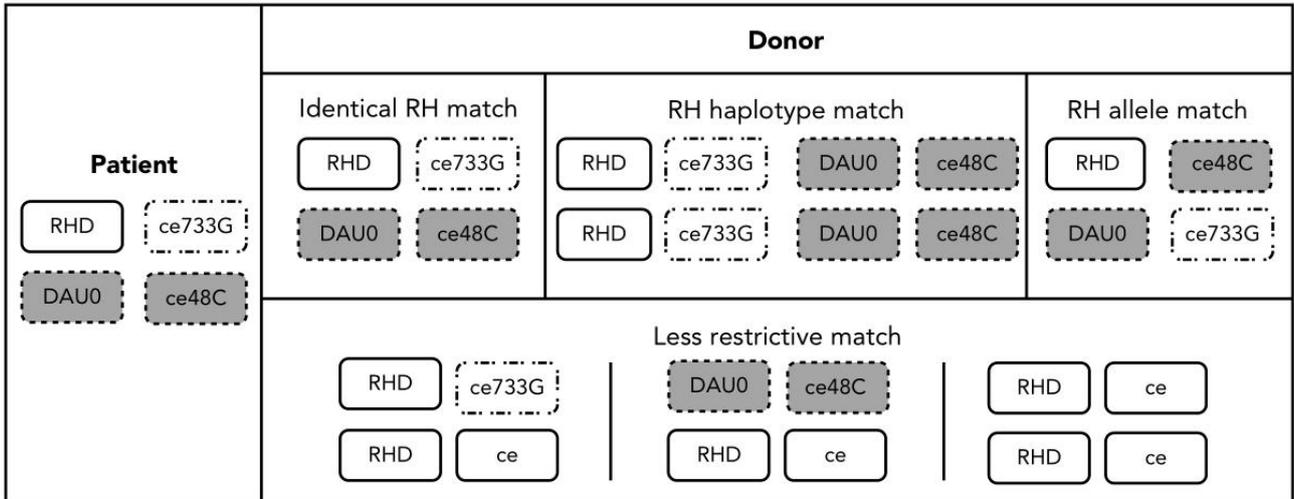
摘要: 对于镰状细胞病(SCD)患者, 尽管输注血清学 Rh C、E 和 K 抗原匹配的红细胞, Rh 同种异体免疫仍是一个挑战。变异 RH 等位基因的遗传导致了 SCD 患者输血后 Rh 抗体阳性, 并解释了大约三分之一的病例。其余的似乎是由非洲裔美国人供体红细胞上改变的 Rh 蛋白刺激的。根据 RH 基因型匹配患者与供体可能减轻 Rh 同种异体免疫, 但其可行性和所需资源尚不清楚。我们比较了 SCD 患者(n = 857)和非裔美国人捐赠者(n = 587)的 RH 等位基因频率, 发现 RH 等位基因频率相似。总的来说, 患者和非裔美国人捐赠者中有 29% 的 RHD 和 53% 的 RHCE 等位基因发生了改变。我们将 RH 基因型匹配进行了建模, 与血清学 RH D、C、E 以及 K 抗原匹配比较, 发现在我们的机构, 需要 RH 基因型匹配的非裔美国人供者数量大约是需要 Rh 血清学匹配的两倍。我们证明, 非裔美国人的供体招募是必要的, 以维持足够的 C-、E-和 K-阴性供体单位, 以避免消耗 Rh-阴性(RhD-)的血液供应。我们的结果表明, 对 SCD 患者进行预防性 RH 基因匹配对于主要由非裔美国人组成的供体库是可行的, 这将优化我们现有的少数族裔供体库的使用。目前 RH 基因分型的成本、所有少数供体和数据管理仍是限制因素。

关键点:

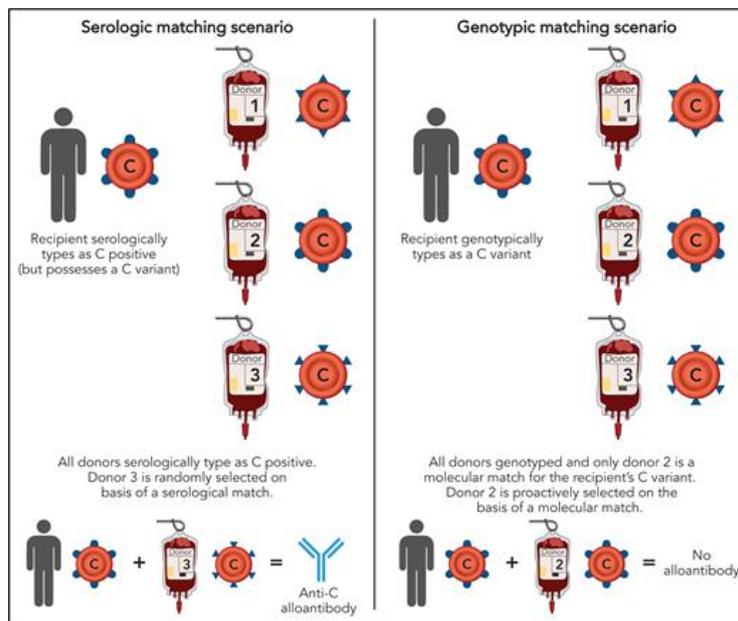
1. 红细胞 RH 基因分型可改善患者与供体的匹配, 减少 Rh 同种免疫。
2. RH 基因型匹配可能提高非裔美国人献血者库的使用。



基于队列需求的匹配模拟图: 考虑到患者和供者 RH 基因型可能会降低 Rh 免疫, 但所需的供者量尚不清楚。为了确定是否可能提供 RH 基因型匹配的红细胞, 我们连续 4 年(2013-2016 年)在本机构检查了 SCD 患者的输血需求。通过抗原阴性谱和 RH 基因型进行虚拟供者-患者匹配来识别单位。根据我们观察到的非裔美国人供者 RH 等位基因和抗原频率和发表的白人 RH 等位基因和抗原频率, 建立供体库。建立模型进行 4 种不同的匹配策略: 血清学 DCEK 匹配, 血清学 DCEK 与扩展抗原(Jka、Jkb、Fya、Fyb、S 和 s)匹配, RH 基因型与 K 匹配, RH 基因型、K 和扩展抗原匹配。



RH 基因型、K 和扩展匹配图：考虑患者和供体 RH 基因型和 K 状态，研究抗原匹配的可行性。患者中有 98 个不同的 RHD/RHCE 等位基因组合。患者被分配的单位来自 RH 基因型预测没有外源 Rh 蛋白暴露于患者的供体。例如，基因型为 RHD*RHD/RHD*DAU0 和 RHCE*ce733G/RHCE*ce48C 复合杂合子的患者，可以选择具有相同 RH 基因型、1 个 RH 单倍型纯合或 1 个 RH 等位基因匹配的供体单位。当每天有 85 名非洲裔美国人供体时，RH 基因型和 K 匹配达到患者需求的 95%，当每天有 150 名非洲裔美国人供体时，稳定在需求的 98%。每天招募>150 名非裔美国人捐献者，或在收集后 42 天内提供单位，都不能提高满足需求的能力，因为有些人有不常见或罕见的 RH 基因型。每天 150 个捐赠者时，与白人捐赠者的 RH 基因型和 K 匹配达到最多的 76% 的需求，严重依赖 D-捐赠者。



血清学和基因型红细胞匹配的差异。基于血清学匹配的红细胞供体选择可能导致 SCD 输血受体暴露于，比如，非自身 C 抗原，可能导致抗 C 形成。相反，基于基因型匹配的献血者选择将降低这种风险。【此图源于本文的评论文章：Hendrickson JE, Tormey CA. Rhesus pieces: genotype matching of RBCs. Blood. 2018 Sep 13;132(11):1091-1093.】

3 《Effect of donor, component, and recipient characteristics on hemoglobin increments following red blood cell transfusion》

《供体、成分和受体特征对红细胞输注后血红蛋白增量的影响》

作者: Roubinian NH, Plimier C, Woo JP, et al.

来源: Blood. 2019 Sep 26;134(13):1003-1013.

摘要: 主要研究献血者、产品制备和储存, 以及最佳输血实践。为了更好地了解这些因素在衡量红细胞输注效果方面的相互作用, 我们对 2008 年至 2016 年接受单个单位红细胞输注的患者进行了献血者和成分数据的关联分析。分析红细胞输注前后以及输血后 24 小时和 48 小时的血红蛋白水平。拟合广义估计方程线性回归模型来检测红细胞输注后血红蛋白的增量, 根据供者和受者的人口统计学特征、收集方法、添加溶液、 γ 辐照和储存时间进行调整。我们将接受一次或多次单个单位红细胞输注($n = 38\ 019$ 个单位)的 23 194 名输血受者的数据与供者人口统计学和成分特征联系起来。在单变量和多变量分析中, 供体和受者性别、**Rh-D 状态**、收集方法、 γ 射线照射、受者年龄和体重指数以及输血前血红蛋白水平是血红蛋白增量的重要预测因子($P < .01$)。对于输血后 24 小时血红蛋白增量, 广义估计方程模型的确定系数为 0.25, 估计实际值与预测值之间的相关性为 0.5。总的来说, 献血者的人口统计学特征、采集和处理方法以及受体特征是红细胞输注相关的血红蛋白增量显著变化的原因。多变量建模使得使用供体、成分和患者水平的特征来预测血红蛋白的变化成为可能。考虑到这些因素, 对于未来分析关于输血后增量和其他患者结局的供体和成分因素(包括遗传多态性)将是至关重要的。

Table 2. Univariate changes in Hb levels after transfusion (N = 38 019)

| Variable | Hb increment, g/dL | P* |
|---|--------------------|--------|
| Overall change in Hb level | 1.04 ± 0.89 | |
| Blood donor characteristic | | |
| Donor sex | | <.001 |
| Male | 1.08 ± 0.87 | |
| Female | 1.01 ± 0.89 | |
| Donor age | | .43 |
| <20 y | 1.05 ± 0.89 | |
| 20-44 y | 1.04 ± 0.89 | |
| 45-70 y | 1.05 ± 0.88 | |
| >70 y | 1.02 ± 0.84 | |
| Donor Rh status | | <.001 |
| Negative | 1.01 ± 0.89 | |
| Positive | 1.06 ± 0.87 | |
| Donor ABO blood group† | | .14 |
| O | 1.04 ± 0.90 | |
| Non-O | 1.06 ± 0.89 | |
| Transfusion recipient characteristic | | |
| Recipient sex | | <.0001 |
| Male | 0.91 ± 0.83 | |
| Female | 1.19 ± 0.91 | |
| Recipient age | | <.0001 |
| 18-55 y | 0.96 ± 0.92 | |
| 56-69 y | 0.98 ± 0.87 | |
| 70-80 y | 1.05 ± 0.86 | |
| >80 y | 1.16 ± 0.87 | |
| Recipient BMI | | <.0001 |
| Underweight | 1.44 ± 0.96 | |
| Normal | 1.16 ± 0.92 | |
| Overweight | 1.03 ± 0.86 | |
| Obese | 0.89 ± 0.80 | |
| Recipient Rh status | | <.0001 |
| Negative | 1.00 ± 0.88 | |
| Positive | 1.06 ± 0.88 | |
| Recipient ABO blood group† | | |
| O | 1.04 ± 0.89 | |
| Non-O | 1.05 ± 0.86 | |

与阴性 Rh-D 状态相比, 供者或受者阳性 Rh-D 状态与更大的血红蛋白增量相关 ($P < .001$)。

4 《骨髓增生异常综合征致 RhD 抗原减弱 1 例分析》

作者: 宋艳艳 刘丽云 陈宣宇 张羽茜 杨婧 于笑难

来源: 中国输血杂志 2020 年 2 月第 33 卷第 2 期.

摘要: 目的: 探讨骨髓增生异常综合征(MDS)对 RhD 抗原的影响及基因检测的重要性。方法: 对 1 例 Rh 血型系统 D 抗原血清学检测呈弱凝集的患者, 进行基因鉴定确定 RhD 表型。结果: 患者 RhD 抗原检测, 微柱凝胶卡式初检及确认试验均为 2+, IgM 抗-D 试管法为 1+凝集, 且多次离心无混合外观表现;基因分型及测序确认为正常 D 抗原。结论: MDS 可引起 D 抗原减弱, 使用基因检测方法鉴定血型具有重要意义。

样本来源: 患者, 男, 26 岁, 以“乏力 2 月余”为主诉, 于 2018 年 9 月 17 日入本院。既往无输血史, 住

院当日血液分析结果：血小板为 $10 \times 10^9/L$ ，提示血小板减少，进一步完善生化、骨穿活检及骨髓免疫分型等相关检查，确诊为骨髓增生异常综合征；9月18日进行血型检测，ABO血型鉴定为A型，Rh血型D抗原为2+凝集，血清学检测未明确定型。经基因检测为正常D基因，确认为RhD阳性。9月21日，患者出现乏力症状，血小板为 $7 \times 10^9/L$ ，输注A型Rh阳性滤白机采血小板1个治疗量，过程顺利，无不良反应，次日复查血小板为 $18 \times 10^9/L$ ，输注有效；24日，血小板为 $23 \times 10^9/L$ ，病情缓解后出院。

血清学结果：患者ABO及Rh血型鉴定结果(表1)，ABO正反定型一致为A型，RhD抗原鉴定微柱凝胶法3+，试管法1+弱凝集，血清学未确定RhD表型；Rh分型(试管法)结果见表2。

表1 患者ABO及RhD血型鉴定

| | 抗-A | 抗-B | 抗-D | A _C | B _C | O _C | 自身对照 |
|--------|-----|-----|-----|----------------|----------------|----------------|------|
| 微柱凝胶卡法 | 4+ | 0 | 2+ | 0 | 4+ | 0 | 0 |
| 试管法 | 4+ | 0 | 1+ | 0 | 3+ | 0 | 0 |

表2 Rh分型试验

| | 抗-C | 抗-c | 抗-E | 抗-e |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| 试管法 | 4+ | 0 | 0 | 4+ |

RHD基因鉴定结果：合成文献中的引物序列(RhD合子型引物序列参考邵超鹏等，RhD十个外显子引物序列参考Juan Gu等)，参考相应的PCR反应条件，确定RHD基因合子型和10个外显子基因分布情况；再利用基因测序，进行序列的比对分析，判断基因是否存在突变。患者合子型测定结果为RHD(+)/RHD(-)杂合子；扩增RHD的1-10号外显子，结果每个外显子特异条带均有扩增带，说明该患者D抗原具有完整的外显子；标本RHD基因10个外显子及其邻近内含子区分别扩增后送测序(天津秀鹏)，均没有发生突变。综上结果，该患者血型为RhD阳性。

讨论：

恶性血液病如MDS、急性白血病及恶性肿瘤均可引起红细胞的抗原减弱，轻者表现为混合外观，重者表现为不凝集的阴性反应。随着病情的缓解，减弱的抗原可恢复正常，而疾病复发时可再次出现减弱。据文献报道，MDS等血液病引起ABO血型抗原的减弱比较常见。MDS引起D抗原减弱少有报道，且一般合并ABO血型抗原减弱。

该患者在血型鉴定过程中，发现其RhD抗原微柱凝胶法2+，试管法1+的弱凝集反应，且多次离心未见混合视野，ABO和Rh血型系统其他抗原均未见减弱，这种反应格局未见有文献报道。D抗原呈现弱凝集反应，表明患者红细胞携带的D抗原不同于正常的D抗原，一般见于基因异常D变异个体。该患者D抗原血清学表现与弱D相似，进一步确定RhD表型，基因测序证实为正常的RhD阳性，考虑患者为骨髓异常综合征所致的D抗原减弱。

通常情况下，疾病不会改变血型基因型，但可能影响红细胞表面抗原的密度或分布发生异常，引起血清学鉴定异常。也有报道慢性淋巴细胞白血病患者，因红细胞表面H抗原转变为A抗原的过程阻断，而导致A血型抗原表达的降低，且部分患者出现ABO基因启动子CpG岛甲基化，但是否与ABO基因启动子CpG岛甲基化有关，有待进一步研究。我们认为MDS可能仅作用于D抗原基因启动子、增强子等基因调控区，或直接干扰基因翻译修饰过程，引起红细胞表面D抗原密度或分布均一性异常，导致血清学表现为弱凝集且无混合外观格局，但基因正常，具体发生机制有待于进一步研究。

在遇到血液病患者ABO、Rh等血型鉴定困难时，首先要考虑疾病本身的影响，及时恰当的采用基因检测的方法，进行血型鉴定是十分必要的。其次由于我国RhD阴性血液稀少，库存量少且价格昂贵，对于需要长期输注RhD阴性血液病患者来说，精神和经济压力均很大。该患者在基因鉴定RhD阳性，输注1个治疗量Rh阳性滤白机采血小板，无输血反应，输注后血小板数明显提升后，病情好转出院。出院当天，患者RhD血型鉴定结果仍为2+弱凝集，未恢复正常。患者离院后，保持跟踪、随访。

5 《Prognostic role of ABO blood group and Rhesus factor in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma》

《ABO 血型 and Rhesus 因子在肝硬化合并肝细胞癌患者预后中的作用》

作者: Oral A, Sahin T.

来源: Sci Rep. 2019 Dec 13;9(1):19087.

摘要: 肝细胞癌(HCC)是世界上最常见的癌症类型之一。HCC 的病因有多种因素,如乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、酒精、肥胖、吸烟和黄曲霉毒素等。许多类型的癌症被认为与 ABO 血型和 Rhesus 因子(RH)有关。本研究旨在探讨 HCC 患者肿瘤特征与总生存率(OS)、ABO 血型和 RH 因子的关系。共计 507 例慢性肝病患者(HCC 患者 252 例,非 HCC 患者 255 例)纳入本研究。回顾性收集所有人口统计学、临床和实验室(生化指标和血型)特征。患者的平均年龄为 54.50 ± 9.30 。ABO 组和 RH 因子两组间差异无统计学意义。我们发现, B 血型肿瘤的血管浸润率较高, RH 阳性患者肿瘤多中心定位明显升高,但 ABO 血型和 RH 血型的 OS 无差异。此外, AB 血型的肿瘤多中心较少。肝硬化合并 HCC 患者可通过血型和 RH 因子预测预后。

| | Max. Tumor diameter (cm) | P | Total tumor diameter (cm) | P | Number of tumors | P |
|------|--------------------------|-------|---------------------------|-------|------------------|---------|
| O | 3,43 ± 2,24 | 0,264 | 5,27 ± 3,94 | 0,674 | 2,92 ± 2,79 | 0,218 |
| A | 3,57 ± 2,06 | 0,612 | 5,40 ± 3,71 | 0,658 | 2,71 ± 3,0 | 0,525 |
| B | 3,41 ± 1,61 | 0,635 | 4,76 ± 3,23 | 0,851 | 2,47 ± 2,35 | 0,319 |
| AB | 2,96 ± 1,04 | 0,693 | 3,22 ± 1,04 | 0,642 | 2,28 ± 3,52 | 0,351 |
| RH + | 3,31 ± 1,77 | 0,745 | 5,22 ± 3,68 | 0,077 | 2,58 ± 2,87 | 0,012** |

Table 3. Relationship between the features of HCC and blood groups. *O blood group (or A, B and AB) and non-O group (both A, B, AB) were compared. **P < 0,05.

RH 阳性患者中肿瘤数量明显更多。

| | Vascular invasion n (%) | | P | Multicentric HCC n (%) | | P |
|------|-------------------------|------------|---------|------------------------|------------|---------|
| | Yes | No | | Yes | No | |
| O | 12 (24,0) | 60 (29,7) | 0,424 | 36 (32,1) | 36 (25,7) | 0,262 |
| A | 20 (40,0) | 94 (46,5) | 0,406 | 56 (50,0) | 58 (50,9) | 0,174 |
| B | 14 (28,0) | 30 (14,9) | 0,028** | 15 (13,4) | 29 (20,7) | 0,128 |
| AB | 4 (8,0) | 18 (8,9) | 0,838 | 5 (5,4) | 17 (12,1) | 0,032** |
| RH + | 44 (88,6) | 179 (88,0) | 0,903 | 104 (%92,9) | 119 (85,0) | 0,047** |

Table 4. Comparison of HCC features according to ABO blood group and Rh factor. *O blood group (or A, B and AB) and non-O group (both A, B, AB) were compared. **P < 0,05.

RH 阳性患者肿瘤多中心定位明显升高。

6 《Blood type and outcomes in patients with COVID-19》

《COVID-19 患者的血型和预后》

作者: Latz CA, DeCarlo C, Boitano L, et al.

来源: Ann Hematol. 2020 Sep;99(9):2113-2118.

摘要: 本研究旨在确定 ABO 血型与插管或死亡确定的 COVID-19 严重程度之间是否存在相关性,以及确定不同血型之间 COVID-19 检测阳性是否存在差异性。在一项多机构研究中,在 2020 年 3 月 6 日至 4 月 16 日期间,5 家医院发现并纳入所有 COVID-19 阳性的成年患者。评估住院、插管和死亡与血型的相关性。采用标准技术进行单因素分析,并使用 logistic 回归来确定血型对插管和/或死亡和阳性检测的独立影响。在研究期

间, 各机构共有 7648 名患者接受 COVID-19 检测。其中有 1289 例已知血型的个体检测为阳性。入院 484 例 (37.5%), ICU 123 例(9.5%), 插管 108 例(8.4%), 体外膜肺氧合 (ECMO) 3 例(0.2%), 死亡 89 例(6.9%)。1289 例阳性患者中, A 型 440 例(34.2%), B 型 201 例(15.6%), AB 型 61 例(4.7%), O 型 587 例(45.5%)。在单因素分析中, 血型 and 任何峰值炎症标志物之间没有联系 (峰值白细胞, $p=0.25$; 峰值 LDH, $p=0.40$; 峰值 ESR, $p=0.16$; 峰值 C 反应蛋白, $p=0.14$), 血型与任何严重程度的临床结果之间也没有联系(入院 $p=0.20$, ICU $p=0.94$, 插管 $p=0.93$, 插管倾向 $p=0.58$, ECMO $p=0.09$, 死亡 $p=0.49$)。经多变量分析, 血型与插管风险或死亡风险并不是独立相关 (参照 A 型; B 型: AOR: 0.72, 95%CI: 0.42-1.26, AB 型: AOR: 0.78, CI: 0.33-1.87, O 型: AOR: 0.77, CI: 0.51-1.16, rhesus 因子阳性(Rh+): AOR: 1.03, CI: 0.93-1.86)。A 血型与检测阳性没有相关性(AOR: 1.00, CI: 0.88-1.13), B 血型与检测阳性率较高相关(AOR: 1.28, CI: 1.08-1.52), AB 型也与检测阳性率较高相关(AOR: 1.37, CI: 1.02-1.83), O 型与检测阳性风险较低相关(AOR: 0.84, CI: 0.75-0.95)。Rh 阳性与检测阳性率较高相关(AOR: 1.23, CI: 1.003-1.50)。在 COVID-19 患者中, 血型与插管或死亡风险无关。接受检测的 B 型和 AB 型血患者更可能检测出阳性, 而 O 型血患者的检测不太可能呈阳性。Rh 阳性患者更可能检测呈阳性。

样本来源: 5 家医院均位于美国马萨诸塞州。

血型来源: 健康档案。

7 《Anti-RhD antibody therapy modulates human natural killer cell function》

《抗 RhD 抗体治疗调节人类自然杀伤细胞的功能》

作者: Elias S, Kol I, Kahlon S, et al.

来源: Haematologica. 2020 May 28;haematol.2019.238097.

摘要: 抗 RhD 抗体广泛应用于临床预防 RhD 免疫, 主要用于胎儿和新生儿的溶血性疾病。有趣的是, 这种疾病是由 RhD 阴性的妇女怀上 RhD 阳性胎儿时产生的完全同样的抗体引起的。尽管已经使用了 50 多年, 但令人惊讶的是, 这种治疗的机制仍然不清楚。在这里, 我们表明, 抗 RhD 抗体诱导人自然杀伤(NK)细胞脱颗粒。在机制上, 我们证明 NK 细胞的脱颗粒是通过抗 RhD 抗体的 Fc 片段与 CD16 的结合来介导的, CD16 是 NK 细胞上表达的主要的 Fc γ 受体。我们发现 CD16 的激活依赖于抗 RhD 抗体的糖基化。此外, 我们发现抗 RhD 抗体可诱导接受该预防性治疗的患者体内 NK 细胞脱颗粒。最后, 我们证明了抗 RhD 药物 KamRho 增强了树突状细胞的杀伤。我们认为这种杀伤导致适应性免疫的激活减少, 因此可能影响抗 RhD 抗体的产生。

8 《RhD 阴性孕妇的 RHD 基因分型及 Rh 表型分析》

作者: 王霓, 邵林楠, 周世航, 张力, 于卫建, 梁晓华

来源: 中国输血杂志 2019 年 8 月第 32 卷第 8 期

摘要: 目的: 对大连地区 152 例 RhD 阴性血孕妇的 RHD 基因进行分型, 并分析不同 RHD 基因型的 RhC、c、E 和 e 表型分布特征。方法: 用 PCR-SSP 法对孕妇的 RHD 基因进行分型; 分别应用单克隆抗-C、抗-c、抗-E 和抗-e 鉴定孕妇的 Rh 表型。结果: 共发现 105 例 RHD 全缺失型, 以 ccee 表型 (85.7%) 为主; 19 例 RHD 1227A 纯合型, 以 Ccee 表型 (78.9%) 为主; 14 例 RHD-CE (2-9) -D₂ 型, 均为 Ccee 表型; 6 例弱 D15 型, 均有 c 和 E 抗原; 4 例 RHD 1227A 杂合型, 均有 C 和 e 抗原; 4 例用此 PCR-SSP 法无法判断分型结果。结论: 大连地区 RhD 阴性孕妇的 RHD 基因型呈现多样性, 其中大多数为 RHD 全缺失型, 其次为 RHD 1227A 纯合型和 RHD-CE (2-9) -D₂ 型。

样本来源: 收集 2017 年 10 月以来到大连市血液中心进行产前抗体筛查的孕妇, 用 IgM 型抗-D 抗体初步筛

查为 RhD 阴性的孕妇均纳入研究，共计 152 例。

血清学结果：Rh 表型共检出 6 种 Rh 表型，检出情况见表 1。

表 1 血清学方法检测 Rh 表型的结果

| Rh 表型 | ccee | Ccee | ccEe | CcEe | CCee | CCEe |
|----------|------|------|------|------|------|------|
| 检出例数 (n) | 90 | 42 | 11 | 5 | 3 | 1 |
| 百分比 (%) | 59.3 | 27.7 | 7.2 | 3.3 | 1.8 | 0.7 |

RHD 基因分型结果：使用人类红细胞 RHD 基因分型试剂盒（PCR-SSP 法）（批号 201711018，天津市秀鹏生物技术开发有限公司），得到 RHD 基因 PCR 产物 2.5% 琼脂糖凝胶电泳的条带格局见图 1。RHD 基因分型及 Rh 表型分布见表 2。

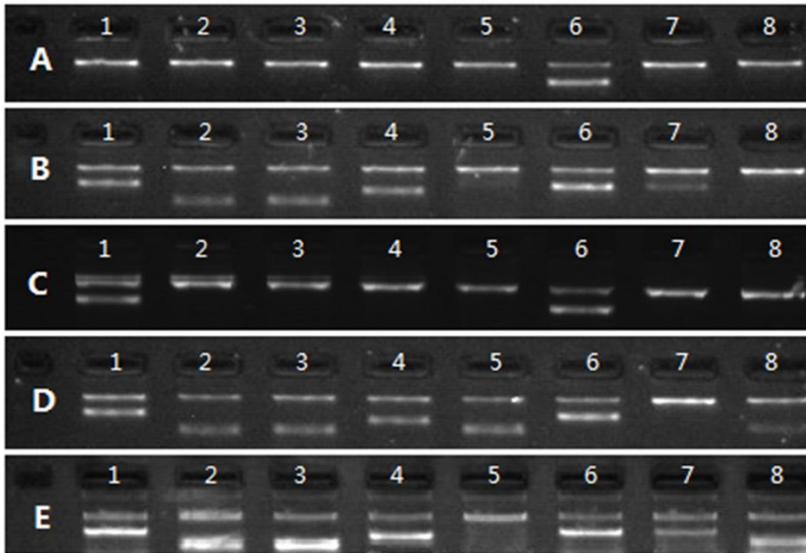


图 1 RHD 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳的条带格局。A 为 RHD 全缺失型；B 为 RHD 1227A 纯合型；C 为 RHD-CE (2-9) -D₂ 型；D 为弱 D15 型；E 为 RHD 1227A 杂合型。

表 2 RHD 基因分型及 Rh 表型分布

| RHD 基因型 | n (%) | CcEe 表型 | n (%) |
|--------------------------------|------------|---------|-----------|
| RHD 全缺失型 | 105 (69.1) | ccee | 90 (85.7) |
| | | Ccee | 9 (8.6) |
| | | ccEe | 6 (5.7) |
| RHD 1227A 纯合型 | 19 (12.5) | Ccee | 15 (78.9) |
| | | CCee | 2 (10.5) |
| | | CcEe | 1 (5.3) |
| | | CCEe | 1 (5.3) |
| RHD-CE (2-9) -D ₂ 型 | 14 (9.2) | Ccee | 14 (100) |
| 弱 D15 型 | 6 (4.0) | ccEe | 4 (66.7) |
| | | CcEe | 2 (33.3) |
| RHD 1227A 杂合型 | 4 (2.6) | CcEe | 2 (50) |
| | | Ccee | 1 (25) |
| | | CCee | 1 (25) |
| 不能定型 | 4 (2.6) | Ccee | 3 (75) |
| | | ccEe | 1 (25) |

讨论：

有研究显示，高加索白种人的红细胞 RhD 阴性表型绝大多数是由两条同源染色体 RHD 等位基因同时

缺失导致的。本研究在初筛 RhD 阴性的 152 名孕妇中，共检出 RHD 全缺失型 105 例，占 69.1%。其中，ccee 表型 90 例，占 85.7%。表明 RHD 全缺失型与 ccee 表型有高度连锁性，与既往研究结果相符。虽然 RHD 全缺失型占 RhD 阴性人群中的大多数，但仍有 30%左右为其他 RHD 变异型。

RHD 1227A (K409K) 是中国汉族人群 DEL 型最主要的等位基因，频率为 1:110，比白人 1:9091 高很多。我们在 152 名 RhD 阴性血孕妇中，共查到 23 例带有 RHD 1227A 等位基因，占 15.1%，略低于其他学者的研究。在我们检测到的 23 例 RHD 1227A 等位基因中，16 例 Rh 表型为 Ccee，占 69.6%；而其余 7 例也均含有 C 和 e 抗原。Fu-kumori 等研究发现，DEL 型样本的 Rh 表型主要为 Ccee、CcEe 和 CCee，推测 RHD 1227A 等位基因可能与 Ce 单体型紧密连锁。RHD 1227A DEL 型具有完整的 RHD 基因外显子，RHD 1227 G>A 单个碱基突变虽然属于同义突变，编码的氨基酸不发生变化，但因其位于第 9 外显子的最后一位，处于第 9 外显子和第 9 内含子的交界位置，影响了 mRNA 的正常剪接，使红细胞膜上 D 抗原的数量大大减少。Gu 等研究显示，DEL 型红细胞膜上 D 抗原的数量少于 30 个，远低于正常 RhD 阳性红细胞。邵超鹏等研究表明，RHD 1227A 的 DEL 型个体的红细胞膜上可能表达完整的 D 抗原，因此不会刺激受血者和孕妇产生抗-D。

RhD 变异体因缺失 1 个或多个 D 抗原表位被称为部分 D，可因 RHD 与 RHCE 基因交换发生融合引起。由于 RHD 基因和 RHCE 基因在 RH 基因座上方向相反，两个同源基因之间发生顺式交换的几率增大。RHD 基因的片段与 RHCE 基因的对应片段发生替换，形成 RHD-CE-D 的杂交重组基因，编码产物只含有一部分 D 表位，导致部分 D 抗原表位缺失。在 RHD 无效等位基因中，中国人以 RHD-CE (2-9) -D₂ 等位基因最为常见。我们在 152 例孕妇中发现了 14 例 RHD-CE (2-9) -D₂ 等位基因，Rh 表型均为 Ccee，呈现高度连锁。

在人类基因突变数据库 (HGMD) 中可以查到，弱 D 表型可由上百种 RHD 等位基因引起，其中以错义突变最为常见。RHD 基因编码区发生碱基突变，使编码的氨基酸发生替换，如果这个氨基酸替换发生在跨膜区和胞内区，可能会影响 RhD 蛋白插入红细胞膜的效率，使红细胞膜上 RhD 抗原数量减少，但抗原表位不变。Wagner 等研究发现，弱 D 抗原在红细胞膜上的数量仅有几十个至 4000 个左右。孙国栋等研究发现，中国人群中的弱 D 主要为弱 D15 型，是由 RHD 基因第 6 外显子发生了 845G>A 单个碱基突变，282 位氨基酸由甘氨酸突变为天冬氨酸 (G282D) 引起的。在本研究中，我们共检测到 6 例弱 D15 型，Rh 表型均含有 c 和 E 抗原，与 Wagner 的研究结果一致。

虽然我们应用 PCR-SSP 法能够确定大多数孕妇常见的 RHD 基因分型，包括 RHD 全缺失型、RHD 1227A 纯合型、RHD-CE (2-9) -D₂ 型、弱 D15 型和 RHD 1227A 杂合型，但对此之外的其他 RHD 基因型无法确定。在本研究中，有 4 例 RhD 阴性的孕妇应用此 PCR-SSP 法无法确定 RHD 基因型，可能并非常见的 RHD 变异型，还需其他 PCR-SSP 试剂盒或对 RHD 外显子测序进一步分析才能得出结论。

不同于高加索人种，中国 RhD 阴性人群的 RHD 基因变异比较多样和复杂。研究中国 RHD 基因的变异，对研究人类遗传和血型进化具有重要意义，同时对确立临床输血策略及制定新生儿溶血病的防治方案提供了理论依据。

9 《Prenatal non-invasive foetal RHD genotyping: diagnostic accuracy of a test as a guide for appropriate administration of antenatal anti-D immunoprophylaxis》

《产前无创胎儿 RHD 基因分型：作为适当使用产前抗 D 免疫预防指导的检测的诊断准确性》

作者：Manfroi S, Calisesi C, Fagiani P, et al.

来源：Blood Transfus. 2018 Nov;16(6):514-524.

摘要：背景：利用从母体血浆中提取的细胞游离胎儿 DNA，可通过 qPCR 预测胎儿 RHD 基因分型。本研究的目的是确定使用商业的多外显子分析进行无创 RHD 胎儿基因分型以指导适当的针对性产前免疫预防的准

确性和可行性。材料和方法：从妊娠 11-30 周的 RhD 阴性妇女血浆中提取细胞游离胎儿 DNA。使用 Free DNA Fetal Kit® RHD 对 RHD 基因的外显子 5、7 和 10 进行 qPCR 扩增，非侵入性确定胎儿 RHD 基因型。结果与出生时的血清学 RhD 脐带血型进行比较。诊断准确性的分析局限于 24-28⁺⁶ 周，在此期间，胎儿基因分型通常用于产前免疫预防。结果：对 367 例血浆标本(24-28⁺⁶ 周)进行 RHD 胎儿基因分型。获得 284 例新生儿 RhD 表型结果。在 9/284 例(3.2%)的样本中，胎儿的 RHD 状况是不确定的，包括 4 例 RhD 母体变异病例。登记了两个假阳性结果。敏感性为 100%，特异性为 97.5% (95% CI: 94.0-100)。诊断正确率为 99.3% (95% CI: 98.3-100)，若纳入不确定结果，诊断正确率为 96.1% (95% CI: 93.9-98.4)。阴性预测值为 100% (95% CI: 100-100)，阳性预测值为 99.0% (95% CI: 97.6-100)。在 18 周时采集的样本中有一个假阴性结果。纳入孕早期(<23⁺⁶ 周)样本后，敏感性和准确性分别为 99.6% (95% CI: 98.7-100)和 95.5% (95% CI: 93.3-97.8)。讨论：本研究表明，使用商业的多外显子检测孕妇血浆中的胎儿 RHD 是预测胎儿 RhD 表型的可靠和准确的工具。它可以作为适当实施产前免疫预防的安全指导。

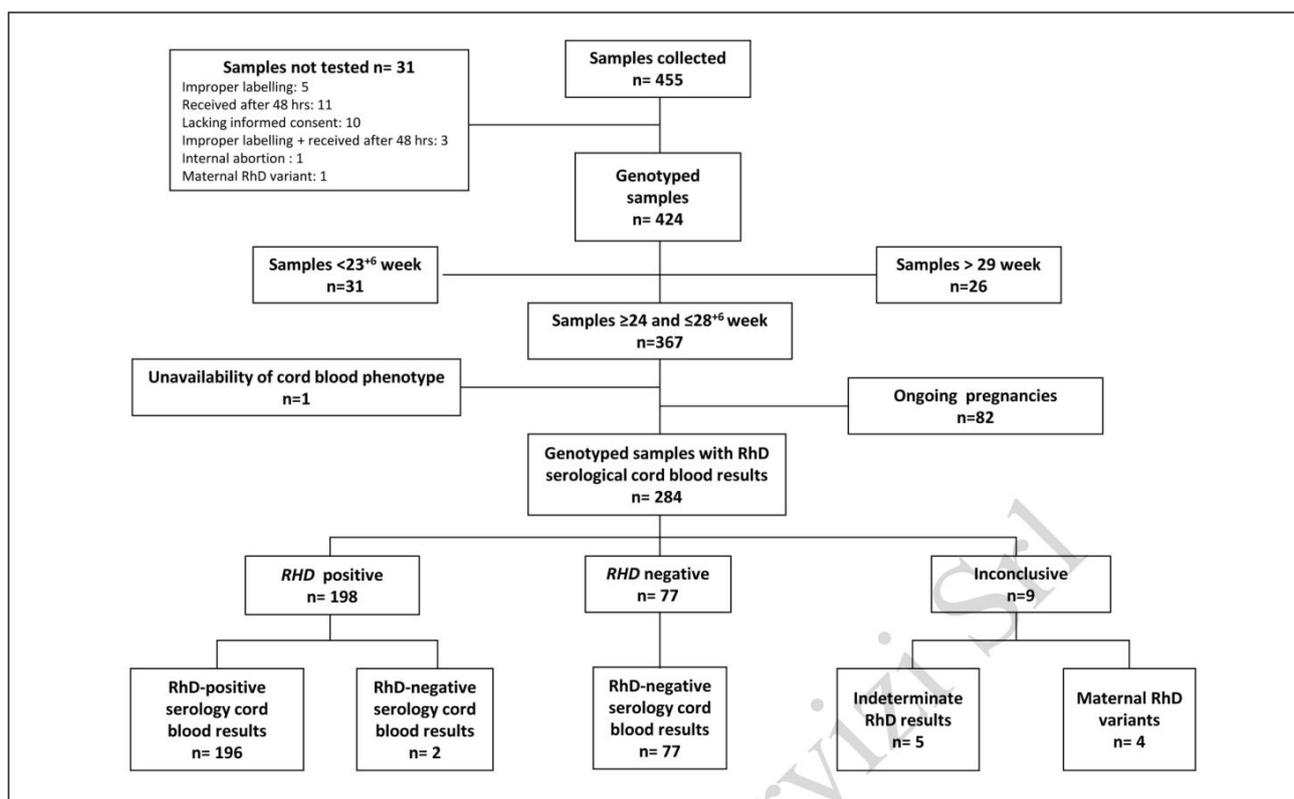


图 1 总结非侵入性胎儿 RHD 基因分型结果的流程图

10 《Amplicon Sequencing-Based Noninvasive Fetal Genotyping for RhD-Positive D Antigen-Negative Alleles》

《基于扩增子测序的无创胎儿基因分型检测 RhD 阳性 D 抗原阴性等位基因》

作者：Takahashi K, Migita O, Sasaki A, et al.

来源：Clin Chem. 2019 Oct;65(10):1307-1316.

摘要：背景：为避免孕妇对胎儿 Rh 抗原产生异源抗体而导致胎儿和新生儿溶血性疾病，在日本，对 RhD 阴性的孕妇常规使用抗 D 免疫球蛋白。使用细胞游离 DNA 进行胎儿 RhD 基因分型可避免不必要的抗体给予；然而，目前基于 PCR 的检测 RhD 缺失的方法，在没有额外检查的情况下，不能解决非白种人中高比率的 RhD 阳性 D 抗原阴性等位基因。方法：我们开发了一种扩增测序方法，使用从孕妇血浆中提取的细胞游离 DNA，

可以估计日本人群中 4 种主要 RhD 等位基因的父亲遗传胎儿 RhD 等位基因类型: D 抗原阳性等位基因(RhD*01, 92.9%)和 3 种 D 抗原阴性等位基因(RhD*01N.01, 6.6%; RhD*01EL.01, 0.3%; RhD*01N.04, 0.1%)。结果: 当 RhD 阴性孕妇具有 RhD 阳性 D 抗原阴性等位基因 (RhD*01EL.01 或 RhD*01N.04) 时, 该方法仍能正确判断胎儿 RhD 型。结论: 该方法是一种可靠的无创胎儿 RhD 基因分型方法, 适用于日本及其他东亚人群。在后续的定位过程中, 利用同一引物对扩增 2 个不同区域, 根据序列差异进行区分的基因分型原理, 理论上也适用于非洲人群常见的 RhD 阳性 D 抗原阴性等位基因。因此, 本方法为考虑对东亚和非洲国家 RhD 阴性孕妇靶向给予抗-D 免疫球蛋白, 以及提高欧洲多个国家实施的胎儿 RhD 基因分型的特异性提供了机会。

Table 3. Estimated fetal RhD types by amplicon sequencing-based genotyping using cfDNA of pregnant RhD-negative women, and ratios and read counts for cfDNA and leukocyte genomic DNA from pregnant RhD-negative women and umbilical cord DNA.

| Case number | Gestational age at sampling | Detected ratio of RHD-positive allele in cfDNA (%) and the predicted fetal RhD type | Expected RHD genotypes of the mother (M) and the fetus (F) based on the amplicon-seq data using cfDNA | Mother's RHD genotype ^a | Neonatal RHD genotype ^b | Neonatal serological RhD type |
|-------------|-----------------------------|---|---|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 9w2d ^c | 1.3% (positive) | M: RHD*01N.01/RHD*01EL.01 F: RHD*01/RHD*01EL.01 or RHD*01/RHD*01N.01 | RHD*01N.01/RHD*01EL.01 | RHD*01/RHD*01EL.01 | Positive |
| 2 | 12w1d | 3.1% (positive) | M: RHD*01N.01/RHD*01N.01 F: RHD*01/RHD*01N.01 | RHD*01N.01/RHD*01N.01 | RHD*01/RHD*01N.01 | Positive |
| 3 | 24w2d | 4.5% (positive) | M: RHD*01N.01/RHD*01N.01 F: RHD*01/RHD*01N.01 | RHD*01N.01/RHD*01N.01 | RHD*01/RHD*01N.01 | Positive |
| 4 | 21w6d | 2.9% (positive) | M: RHD*01N.01/RHD*01EL.01 F: RHD*01/RHD*01EL.01 or RHD*01/RHD*01N.01 | RHD*01N.01/RHD*01EL.01 | RHD*01/RHD*01EL.01 | Positive |
| 5 | 10w0d | 0.0% (negative) | M: RHD*01N.01/RHD*01N.01 F: RHD*01N.01/RHD*01N.01 | RHD*01N.01/RHD*01N.01 | RHD*01N.01/RHD*01N.01 | Negative |
| 6 | 9w0d | 0.0% (negative) | M: RHD*01N.01/RHD*01N.01 F: RHD*01N.01/RHD*01N.01 | RHD*01N.01/RHD*01N.01 | RHD*01N.01/RHD*01N.01 | Negative |
| 7 | 10w2d | 3.1% (positive) | M: RHD*01EL.01/RHD*01N.04 F: RHD*01/RHD*01EL.01 or RHD*01/RHD*01N.04 | RHD*01EL.01/RHD*01N.04 | RHD*01/RHD*01EL.01 | Positive |
| 8 | 30w2d | 4.6% (positive) | M: RHD*01N.01/RHD*01N.01 F: RHD*01/RHD*01N.01 | RHD*01N.01/RHD*01N.01 | RHD*01/RHD*01N.01 | Positive |

| Case number | Rhesus boxes (upstream/downstream) | | | RHD/RHCE exon 9 (RHD_wt/RHD_var/RHCE) | | |
|-------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|---------------------------------------|---|
| | cfDNA | Mother's leukocyte DNA | Umbilical cord DNA | cfDNA | Mother's leukocyte DNA | Umbilical cord DNA |
| 1 | 38.9%/61.1% (21 235/33 311) | 36.5%/63.5% (28 230/49 152) | 49.3%/50.7% (44 395/45 580) | 1.3%/37.9%/60.8% (434/12 271/19 671) | 0.0%/30.1%/69.9% (2/8304/ 19 276) | 22.3%/22.3%/54.4% (7425/7778/18 163) |
| 2 | 4.6%/95.4% (2392/49 373) | 0.04%/99.96% (15/37 034) | 31.5%/68.5% (17 090/37 152) | 3.1%/0.01%/96.9% (1062/2/33 001) | 0.0%/0.0%/100% (0/0/20 715) | 28.5%/0.0%/71.5% (9269/0/23 251) |
| 3 | 2.9%/97.1% (1124/38 189) | 0.06%/99.94% (19/34 420) | 34.3%/65.7% (25 338/48 594) | 4.5%/0.004%/95.5% (1077/1/22 745) | 0.005%/0.0%/99.99% (1/0/22 100) | 28.9%/0.01%/71.1% (8052/3/19 853) |
| 4 | 46.6%/53.4% (20 316/23 305) | 32.4%/67.6% (10 732/22 391) | 53.7%/46.3% (16 155/13 918) | 2.9%/30.8%/66.3% (634/6759/14 550) | 0.11%/29.8%/70.1% (21/5680/13 394) | 22.1%/22.4%/55.5% (4054/4096/10 177) |
| 5 | 0.01%/99.99% (1/12 287) | 0.09%/99.91% (29/32 729) | 0.01%/99.99% (5/35 332) | 0.0%/0.0%/100.0% (0/0/6363) | 0.0%/0.03%/99.97% (0/6/20 545) | 0.0%/0.02%/99.98% (0/3/16 324) |
| 6 | 0.02%/99.98% (7/37 773) | 0.04%/99.96% (15/34 402) | 0.01%/99.99% (2/29 585) | 0.0%/0.004%/99.99% (0/1/24 843) | 0.009%/0.019%/99.97% (2/4/20 034) | 0.0%/0.0%/100.0% (0/0/16 429) |
| 7 | 56.7%/43.3% (24 752/18 920) | 50.7%/49.3% (16 408/15 953) | 44.9%/55.1% (14 138/17 364) | 3.1%/25.9%/71.0% (773/6503/17 844) | 0.01%/21.3%/78.7% (2/3995/14 729) | 24.8%/23.0%/52.2% (5552/5166/11 694) |
| 8 | 5.6%/94.4% (1962/33 229) | 0.04%/99.96% (18/44 068) | 34.9%/65.1% (18 228/33 937) | 4.6%/0.01%/95.4% (1637/3/33 652) | 0.0%/0.002%/99.99% (0/1/39 560) | 32.0%/0.0%/68.0% (8710/0/18 496) |

^a Determined by amplicon-sequencing using leukocyte genomic DNA.

^b Determined by amplicon-sequencing using cord blood genomic DNA.

^c w, week; d, day.

11 《A novel RhD allele caused by c.739 G>C mutation was identified in a Chinese individual》

《在一个中国个体中发现了由 c.739 G>C 突变引起的新型 RhD 等位基因》

作者: Lyu H, Jiao S, Ma W, Hu B.

来源: Transfusion. 2020 Oct 27.

摘要: 1 例中国北方汉族孕妇的血样经血清学鉴定为 D 变异, 随后通过 PCR-SSP 检测 RhD 外显子 1~10, 所有外显子均存在。为了进一步阐明该样本的分子机制, 我们对 RhD 外显子 1~10 进行了测序, 发现它是 5 外显子 c.739 G>C 引起的一个新的等位基因。

方法: 首先使用全自动血型分析仪进行 D 血型初步筛选, 然后使用两种靶向不同表位的单克隆抗 D 抗体 (Sanquin 和 Dominion) 进行盐水和间接抗球蛋白试验(IAT)。用盐水试管法测定 CE 表型。然后进行直接抗球蛋白检测, 以排除假阳性 IAT, 并进行血清筛查, 检测是否存在不规则抗体。从血液样本中提取基因组 DNA, 进行以下分子检测: 首先用 PCR-SSP 法进行 RHD 基因杂合性检测, 然后用 PCR-SSP 法扩增 RHD 外显子 1-10, 对扩增产物测序(PCR-SSP 和测序方法由我们实验室建立)。

结果: 血清学筛查该样本 D 血型为阴性, 两种单克隆抗 D 在盐水反应中均为阴性, 但 IAT 结果显示凝集强度分别为 1+和±。CE 表型为 C-E-c+e+, 血清中无不规则抗体。通过 RHD 合子型试验证实先证者为杂合子 (RHD+/RHD-)。然后我们进一步扩增了 RHD 外显子 1 到 10; 结果显示, 所有外显子均存在, 后续测序显示, 与序列 RHD*01 相比, 5 外显子 739bp 处有 G>C 突变。

讨论: 5 外显子 739bp 处 G>C 突变, 导致氨基酸 247 由缬氨酸(val)向亮氨酸(leu)转变, 该氨基酸位于 D 蛋白第 8 跨膜区, 导致先证者出现 D 变异表型。然而, 由于条件限制, 我们没有进一步区分先证者是弱 D 表型还是部分 D 表型。这种氨基酸变化在 dbSNP 和 ExAc 数据库中无报道。我们已将该新型 RHD 等位基因的核苷酸序列提交 GenBank, 登录号为 KX900448。

12 《A novel silent RHCE allele in Chinese population》

《中国群体一种新的沉默 RHCE 等位基因》

作者: Zhao FY, Li Q, Zhang DM, et al.

来源: Transfus Med. 2019 Dec;29(6):430-433.

摘要: 目的: 分析一名确诊为新生儿溶血性疾病(HDN)的观察到的表型与预期表型不一致的 8 天大婴儿的家系的分子背景。背景: 沉默的 RHCE 等位基因在 Rh 系统中很少见。方法: 采集她的家庭成员的血样, 采用常规血清学方法检测其抗体特异性。观察到的婴儿 Rh C + c-e + E-表型与基于母体 Rh C-c + E + e-表型的预期表型不一致。对家系成员的 RH 基因进行测序分析。结果: 婴儿、她的兄弟、母亲和父亲的 Rh 表型分别为 CCDee, CcDEe, ccDEE 和 CCDee。本例中确认是 IgG anti-e 引起 HDN。在婴儿和她的母亲体内发现了外显子 7 中的一个 RHCE * 03 (c.1059G > A)杂合沉默突变, 这是一个由过早终止密码子(Trp353stop)引起的新型无义等位基因。结论: 在母亲和婴儿中观察到的该沉默变异 RHCE * 03 (c.1059G > A)是杂合状态。我们预测, 如果该变异是纯合状态, 将导致罕见的 D-表型。为提高输血安全性, 应重视中国人群 RHCE 基因。

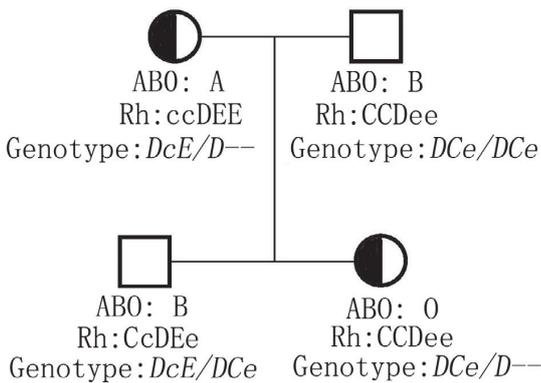
样本来源: 一名 8 天大的婴儿, 是母亲的第二个孩子, 被证实患有 HDN, 而她的哥哥作为母亲的第一个男孩, 没有患 HDN。她母亲没有输血史。采集家庭成员血样, 确定抗体特异性。

血清学检测结果: 常规使用商业 IgM 单克隆试剂: 抗 A、抗 B、抗 C、抗 c、抗 D、抗 E 和抗 e, 对 ABO 和 Rh 系统 5 种常见抗原进行分型。用抗 IgG 人球蛋白抗体试剂进行 DAT 和 IAT。抗体均购自上海血液生物医药有限责任公司 (SHPBC)。用于 ABO 血清学分型的 A1 型、B 型和 O 型试剂 RBC 和用于抗体筛查的筛查 RBC 试剂也购自 SHPBC。使用 RBC 试剂板 (Sanquin) 检测抗体特异性。婴儿母亲和父亲常见的 5 种 Rh 抗原分别为 ccDEE 和 CCDee。根据遗传规律, 这个婴儿应该是一个像她哥哥一样的 CcDEe 表现型。但血清学结果显示,

她的表型为 CCDee。母亲和婴儿的血浆样品在 IAT 中均显示只与筛查 RBC 试剂和板试剂的 e 抗原阳性 RBC 反应，在直接离心试验或 37°C 孵育 30min 后均显示没有反应性。上述结果表明，在母亲和婴儿的血浆中均存在 IgG anti-e 血型同种抗体。婴儿 RBC 的 DAT 结果为阳性，板 RBC 试剂 IAT 婴儿 RBC 放散液中也检测到 IgG 抗-e 抗体。在与试剂板 CCDee 表型细胞 IAT 中，婴儿和母亲血清中分别检测到总计 16 和 128 滴度。

基因分型结果：使用 Wagner & Flegel (2000) 描述的方法检测 RHD 合子型，先扩增 Rh 盒的全长，然后用 Pst I 消化，由于 RHD 阳性纯合子、杂合子和 RHD 阴性基因型的消化模式不同，因此不同消化产物的电泳图谱显示 RHD 合子型。扩增并测序 RHCE 基因的外显子 1-10。所有家庭成员均为 RHD+/RHD+纯合子。在婴儿和她的母亲体内发现了外显子 7 中的一个 RHCE * 03 (c.1059G > A)杂合突变。新的 RHCE 无义突变导致提前终止密码子(Trp353stop)。该 RHCE 等位基因的 GeneBank 登录号为 MH475137。

治疗：光疗，治疗有效。未进行换血和输血。



13 《A variant RhAG protein encoded by the RHAG*572A allele causes serological weak D expression while maintaining normal RhCE phenotypes》

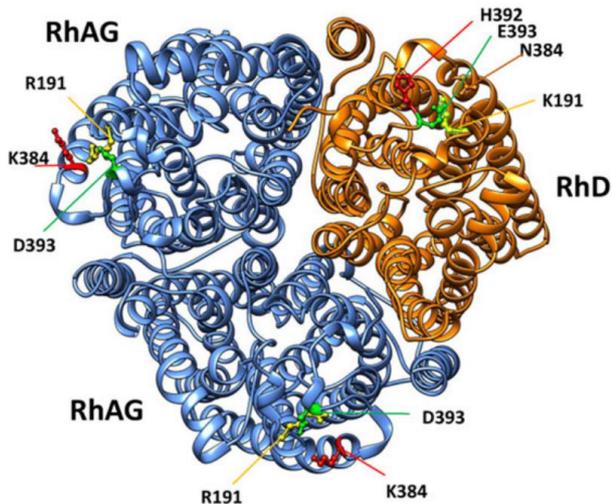
《由 RHAG*572A 等位基因编码的变异 RhAG 蛋白在维持正常的 RhCE 表型的同时，在血清学上导致弱 D 表达》

作者：Wen J, Verhagen OJHM, Jia S, et al.

来源：Transfusion. 2019 Jan;59(1):405-411.

摘要：背景：导致弱 D 表型的分子事件包括 RhD 基因的错义突变、框内插入或缺失突变和杂交型 RhD-CE-D 等位基因。Rh 蛋白在膜上适当表达所需要的蛋白（如 RhAG 和锚蛋白 1）的编码基因发生突变会导致 Rh 抗原表达缺失或减弱。研究设计和方法：收集 1 例血清学弱 D 型的中国献血者的血液样本。测定 RhAG 抗原表达、RhD 和 RhCE 表型。通过 RH 多重连接依赖探针扩增(MLPA)、RhD 外显子 Sanger 测序和 RHAG 和 ANK1 外显子下一代测序(NGS)分析 RhD 和 RHCE 基因型。体外表达研究采用将突变体 RHAG*572A 或野生型 RHAG，与 RhD 或 RHCE 重组子一起，慢病毒转染入 HEK 293 T 细胞。用流式细胞术分析 RhAG、RhD 和 RhCE 抗原表达情况。结果：血清学结果显示弱 D 和正常 C + c- E- e + 表型，RH-MLPA 结果显示正常 CCDee 基因型，Sanger 测序显示 RhD 基因序列正常。通过 NGS 分析发现了一个 RHAG 基因纯合子变异(c.572G > A, p.Arg191Gln)。分别用突变体 RhAG *572A、突变体 RhAG *572A 和 RhD、突变体 RhAG *572A 和 RhCE 重组子转染细胞，检测到正常 RhAG、弱 RhD 和正常 RhCE 抗原。结论：纯合子存在的 RHAG*572A 等位基因导致弱 D 表达。它不影响 RhCE 的表达。

样本来源：中国广州血液中心一位 D 变异献血者的外周血样本。



图注：RhD-RhAG₂复合体的细胞质图。基于 RhCG 三聚物结晶结构建模。RhAG 和 RhD 分别用蓝色和橙色表示。191 位点的突变精氨酸(带正电荷)用黄色表示；附近带电荷的氨基酸用红色(带正电荷)和绿色(带负电荷)表示。并指出了 RhD 的同源氨基酸。使用 UCSF Chimera v.1.12 (build 41623)进行分子建模。

14 《Application of Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay for Genotyping Major Blood Group Systems Including DEL Variants in the D-Negative Korean Population》

《应用多重连接依赖探针扩增法对韩国 D 阴性人群包括 DEL 变异在内的主要血型系统进行基因分型》

作者：Kim B, Lee ST, Kim S, et al.

来源：Ann Lab Med. 2018 Jan;38(1):32-38.

摘要：背景：DEL 血型是一种非常弱的 D 变异型，由于其可能引起抗 D 同种异体免疫，因此在输血医学领域备受关注。我们研究血清学上 D 阴性表型（包括 DEL 型）的分子基础，并使用最近开发的多重连接依赖探针扩增(MLPA)试验研究韩国人群中其他血型系统的分布。方法：对随机选取的 95 个 D 阴性红细胞产物进行 RhCE 表型分型，并采用 MLPA 法进行血型基因分型。MLPA 结果通过 RHD 启动子、外显子 4、7、10 的多重 PCR 和 RHD 9 外显子的直接测序验证。结果：95 例患者中，RHD 完全缺失 74 例(77.9%)，4 例(4.2%)存在 RHD-CE-D 杂交等位基因。另外 17 例(17.9%)有 RHD(1227G>A)等位基因，经测序进一步证实。RHD(1227G>A)等位基因的 RhCE 表型由 14 个 Cce 和 3 个 CcEe 组成，60 例 ce 表型的 RHD 均完全缺失。另外 17 个血型系统的基因分型结果和等位基因分布与以往东亚人群的报道一致。结论：MLPA 法正确检测 D 阴性韩国人的 RHD 基因型，包括 RHD-CE-D 杂交等位基因或 RHD(1227G>A)等位基因，以及其他临床相关血型基因型。在血清学 D 阴性个体上使用 MLPA 分析可能有助于通过预防抗 D 同种免疫来提高输血安全性。

Table 2. RhCE phenotype and *RHD* analysis using the MLPA assay

| Type of <i>RHD</i> variation | <i>RHD</i> allele | RhCE phenotype | No. (%) of samples | Subtotal (%) |
|-------------------------------|----------------------|----------------|--------------------|--------------|
| <i>RHD</i> deletion | Total deletion | ce | 60 (63.2) | 74 (77.9) |
| | | cEe | 9 (9.5) | |
| | | Cce | 5 (5.3) | |
| <i>RHD-CE-D</i> hybrid allele | <i>RHD-CE-D/RHD-</i> | Cce | 4 (4.2) | 4 (4.2) |
| <i>RHD</i> allele with SNP | <i>RHD</i> (1227G>A) | Cce | 14 (14.7) | 17 (17.9) |
| | | CcEe | 3 (3.2) | |
| Total | | | | 95 (100) |

Abbreviations: MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification; SNP, single nucleotide polymorphism.

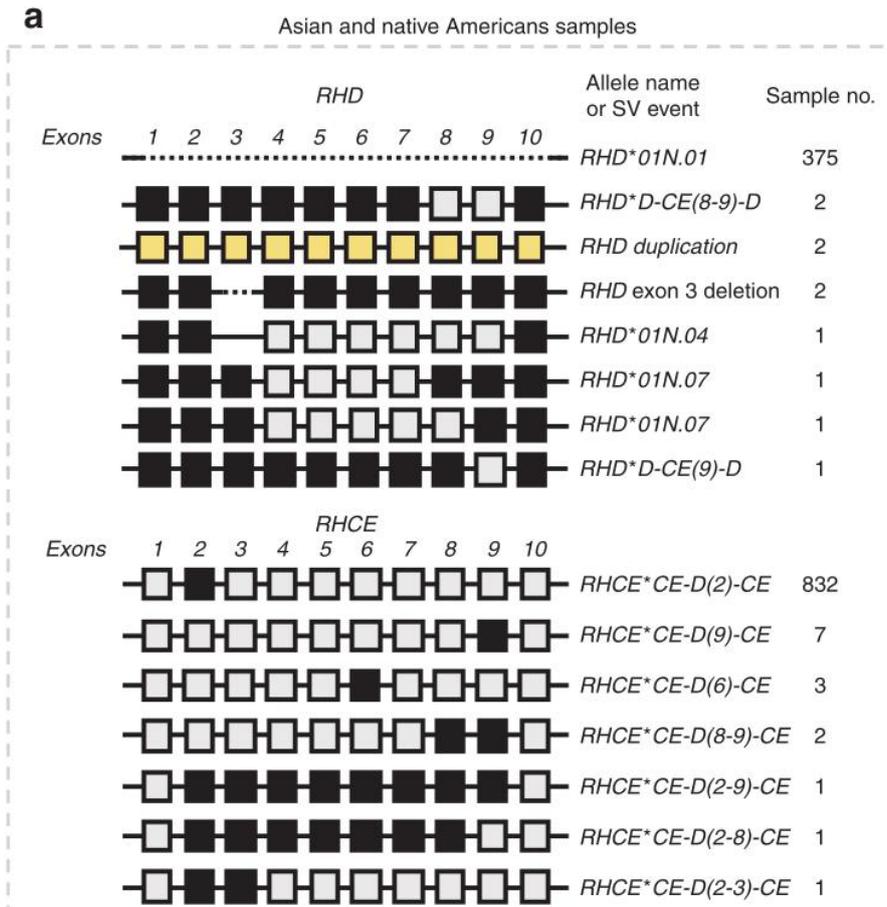
15 《Genomic characterization of the RH locus detects complex and novel structural variation in multi-ethnic cohorts》

《多民族队列中 RH 基因的基因组特性检测复杂和新的结构变异》

作者: Wheeler MM, Lannert KW, Huston H, et al.

来源: Genet Med. 2019 Feb;21(2):477-486.

摘要: 目的: Rh 抗原可引起严重的同种异体免疫反应,特别是在高危输血情况下,如镰状细胞病。Rh 抗原由旁系同源基因 *RhD* 和 *RHCE* 编码,位于最复杂的基因位点之一。我们的目标是在多种族队列中描述 *RH* 基因变异,重点是检测 *RH* 结构变异(SV)。方法:我们从下一代测序(NGS)数据中自定义分析方法来估计旁系同源基因特异性拷贝数。我们将这些方法应用于临床特征样本,包括 4 个世界卫生组织(WHO)基因分型参考品和 1135 名亚洲和美洲土著献血者。随后,我们调查了来自杰克逊心脏研究的 1715 名非裔美国人样本。结果:大多数样本在每个数据集中显示 SV。SV 检测预测免疫原性 *RhD* 和 *RhC* 抗原与血清学表型一致(>99%)。*RhC* 抗原表达与 2 外显子杂交等位基因(*RHCE*CE-D(2)-CE*)相关。临床相关的 4-7 外显子杂交等位基因(*RhD*D-CE(4-7)-D*)和 9 外显子杂交等位基因(*RHCE*CE-D(9)-CE*)在非裔美国人中普遍存在。结论:自定义 NGS 方法可以准确检测 *RH* SV,该 SV 对预测相关 *RH* 等位基因具有重要意义。此外,本研究首次对非裔美国人 *RH* 等位基因进行了大规模的 NGS 调查。



图注：在 1135 亚洲和美洲土著样本中检测到的结构变异示意图。等位基因频率没有报告，因为这个数据集是非随机选择的。RHD 和 RHCE 外显子分别用黑色和灰色框表示，方向 5'到 3'。黄框对应的是显示重复事件的外显子。RHD 示意图总结了在 RHD 中检测到的结构变异及其对应的国际输血协会(ISBT)等位基因名称(如果存在)和样本数。RHCE 示意图总结了在 RHCE 中检测到的结构变异及其对应的 ISBT 等位基因名称(如果存在)和样本数。对于 RHD 和 RHCE，结构变异都按样本数排序。SV：结构变异。

16 《A multi-centre study on the performance of the molecular genotyping platform ID RhD XT for resolving serological weak RhD phenotype in routine clinical practice》

《一项关于分子基因分型平台 ID RhD XT 在常规临床应用中解决血清学弱 RhD 表型的性能的多中心研究》

作者：Londero D, Monge J, Hellberg A.

来源：Vox Sang. 2020 Apr;115(3):241-248.

摘要：背景和目的：不必要地输血 RhD 阴性红细胞和不必要地给予孕妇 Rh 免疫球蛋白 (RhIG) 令人担忧。本研究评估了 ID RhD XT 的性能，这是一种用于鉴定 6 种 RhD 等位基因变体和人血小板抗原 HPA-1a/1b 的基因分型分析方法。材料和方法：采用 ID RhD XT 对 D 表型较弱、差异或不确定的全血标本进行基因分型，并与参考分子试验进行比较。通过分析来自孕妇的样本来确定 RhIG 预防的候选资格。测量了完成程序的操作时间。结果：总共测试了 167 份样本 (55 名献血者，56 名患者，52 名孕妇和 4 名新生儿)。ID RhD XT 与

参考方法的一致性为 100% (RhD 基因型: 51% 弱 D 型 1、2 或 3; 35.5% 弱 D 型 1、2、3 未检测到; 4% RhD 缺失; 1% RhD*假基因; 1% RhD*DIIIa-CE(3-7)-D; 4%未检出扩增变异; HPA-1 基因型: 64% HPA-1a/a; 30% HPA-1a/b; 3% HPA-1b/b)。Call rate 为 98.2%。ID RhD XT 识别出了 40%不需要 RhIG 预防的孕妇。总体操作时间为 25-45 分钟处理一批 24 个样品, 总分析时间为 4 小时。结论: ID RhD XT 在血清学弱 D 表型个体的 RhD 分型中取得了可重复性的结果。ID RhD XT 被证明对 RhD 血清学差异患者的正确管理和妊娠期 RhIG 的合理使用是有用的。

ID RHD XT 检测方法简介:

ID RHD XT 是一种定性的、以 PCR 和杂交为基础的基因分型检测, 用于同时鉴定 RHD 基因的 6 个等位基因变体 (RHD*弱 D 型 1 [RHD*01W.1] (RHD:c.809T>G), RHD*弱 D 型 2 [RHD*01W.2] (RHD:c.1154G>C), RHD*弱 D 型 3 [RHD*01W.3] (RHD:c.8C>G), RHD 缺失[RHD*01N.01](通过推断检测, 未检测到任何 RHD 靶向多态性), RHD* 假基因 [RHD*08N.01] (RHD:c.807T>G), RHD*DIIIa-CE(3-7)-D (当前定义为 RHD*DIIIa-CEVS(4-7)-D) [RHD*03N.01] (RHD: IVS3+3100A>G)); 以及 ITGB3 基因 (HPA-1 系统): HPA 1a 和 HPA 1b (ITGB3: c.176T>C)。ID RHD XT 将弱 D 型 1.1 和弱 D 型 1.2 等罕见亚型分别归类为弱 D 型 1 和弱 D 型 2, 但这些变异体可产生 anti-D。

其他有效的分析包括“无扩增变异体”(ID RHD XT 不能扩增一个或多个 RHD 基因外显子, 以及不能预测 RhD 抗原表型)和“无 Call”(NC; ID RHD XT 无法指定结果, 这是由于不确定的基因型、低信号强度或低磁珠数)。“无效测试”的信息意味着样品分析结果是不可接受的, 样品必须重新测试。

该系统已被验证用于 EDTA 抗凝全血提取的人类基因组 DNA, 并利用 Luminex xMAP 技术。Luminex 基于磁珠的多重检测使用附着在不同颜色微球上的特异性寡核苷酸探针, 之后在一个小型流式分析仪中进行 DNA 杂交分析。

大致步骤如下 (每批次样本检测包括阳性和阴性对照):

- (1) PCR 扩增基因组 DNA;
- (2) 扩增产物变性后与寡核苷酸探针杂交;
- (3) 加入标记混合物, 孵育;
- (4) 使用 Luminex 系统分析;
- (5) 用 ID RHD XT 分析软件 (BIDS XTv1.8; 西班牙) 处理原始数据以得到基因型;
- (6) 根据文献预测表型。

Table 3 Hands-on time to process a batch of 24 samples using the ID RHD XT platform ($n = 4$ batches)

| Procedural step | Hands-on time |
|-------------------|---------------|
| DNA amplification | 13–20 min |
| Hybridization | 5–10 min |
| Labelling | 3–10 min |
| Data analysis | 4–5 min |

Table 1 ID RHD XT results (*RHD* genotype and 'No Call') and per cent agreement with reference molecular method (*n* = 166)

| <i>RHD</i> genotype | Samples (<i>n</i>) | | | | Total <i>n</i> (%) | Agreement with molecular method(%) |
|---|----------------------|----------|----------------|----------|--------------------|------------------------------------|
| | Donors | Patients | Pregnant women | Newborns | | |
| Weak D Types 1, 2 or 3 not detected | 14 | 17 | 25 | 3 | 59 (35.5) | 100 |
| <i>RHD</i> *weak <i>D</i> type 1 | 18 | 16 | 11 | 0 | 45 (27.1) | 100 |
| <i>RHD</i> *weak <i>D</i> type 2 | 7 | 10 | 6 | 1 | 24 (14.5) | 100 |
| <i>RHD</i> *weak <i>D</i> type 3 | 11 | 2 | 3 | 0 | 16 (9.6) | 100 |
| <i>RHD</i> deletion | 1 | 2 | 4 | 0 | 7 (4.2) | 100 |
| <i>RHD</i> * <i>DIIIa</i> - <i>CE(3-7)</i> - <i>D</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.6) | 100 |
| <i>RHD</i> * <i>Pseudogene</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 (0.6) | 100 |
| No amplification variant detected ^a | 2 | 5 | 0 | 0 | 7 (4.2) | 100 |
| No Call ^b | 2 | 2 | 2 | 0 | 6 (4.6) | n/a |

^aNo amplification of one or more *RHD* gene exons 1, 6 or 9, tested by ID RHD XT.

^bNo Call: the inability of the ID RHD XT to assign a result, either due to indeterminate genotype, low signal intensity or low bead count.

Table 2 ID RHD XT results (*HPA*-1 genotype and 'No Call') and per cent agreement with reference platforms (*n* = 166)

| <i>HPA</i> -1 genotype | Sample (<i>n</i>) | | | | Total [<i>n</i> (%)] | Agreement with molecular method (%) |
|------------------------|---------------------|----------|----------------|----------|-----------------------|-------------------------------------|
| | Donors | Patients | Pregnant women | Newborns | | |
| <i>HPA1a/1a</i> | 32 | 36 | 36 | 2 | 106 (63.9) | 100 |
| <i>HPA1a/1b</i> | 19 | 16 | 13 | 2 | 50 (30.1) | 100 |
| <i>HPA1b/1b</i> | 1 | 3 | 1 | 0 | 5 (3.0) | 100 |
| No Call ^a | 3 | 0 | 2 | 0 | 5 (3.0) | n/a |

HPA, human platelet antigen.

^aNo Call: the inability of the ID RHD XT to assign a result, either due to indeterminate genotype, low signal intensity or low bead count.

下期主题：RH 亚型案例报道专刊



为中国血型基因检测贡献力量!!!
为人民服务!!!



天津秀鹏生物微信公众平台
与您分享专业的体外诊断信息

更多内容请登录秀鹏生物网站
www.biosuper.com