

RHD 血型基因无创产前专刊

2022 年 4 月

编者导读：

胎儿新生儿溶血病 (hemolytic disease of the fetus and newborn, HDFN) 是指因母婴血型不合，母体针对与其不同的胎儿红细胞血型抗原所产生的相应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引起的一系列临床症状。HDFN 常导致早期流产，轻者出现贫血、水肿、肝脾肿大，重者如果未经处理，可能导致胎儿重度贫血、严重的新生儿高胆红素血症与核黄疸甚至死亡。非 ABO-HDFN 以 Rh 血型不合 HDFN 为主，其特点是起病急、进展快、溶血严重，容易发生胆红素脑病及中枢神经系统疾病甚至死亡。中国输血协会免疫血液学专业委员会于 2021 年发布《胎儿新生儿溶血病实验室检测专家共识》，推荐进行胎儿非侵入性血型基因型检测 (cff-DNA)，以确定胎儿血型，预测 HDFN 风险。在本月期刊中，我们讨论胎儿非侵入性 RHD 血型基因型检测。

本期期刊我们选取 6 篇文献，主要内容如下：

1. 成本效益分析 (发表在《Ultrasound in obstetrics & gynecology》影响因子 7.299)：
靶向产前抗 RhD 预防方案成本低于现有的常规预防方案，且不会增加致敏风险。
2. 方法学 (发表在《Clinical Chemistry》影响因子 8.327)：
与实时定量 PCR 相比，使用数字液滴 PCR 进行胎儿 RHD 基因分型，可以减少假阴性和不确定结果的发生，特别是当样品表达高水平的背景母体细胞游离 DNA 时。
3. 方法学 (发表在《Clinical Chemistry》影响因子 8.327)：
开发了基于扩增子测序的无创胎儿基因分型方法，检测日本人群中 4 个主要 RHD 等位基因 (RHD*01、RHD*01N.01、RHD*01EL.01、RHD*01N.04)，适用于日本和其他东亚人群。
4. 孕期研究 (发表在《American Journal of Obstetrics and Gynecology》影响因子 8.661)：
单外显子定量 PCR 在妊娠早期无创检测胎儿 RHD 具有较高准确性，支持 10 妊娠周后常规临床使用非侵入性 RHD 状态测定。
5. 孕期研究 (发表在《Obstetrics and gynecology》影响因子 7.661)：
使用 SensiGENE RHD 测试 (基质辅助激光解吸/电离-飞行时间质谱平台) 对血浆样本进行循环细胞游离 DNA 分析，可准确预测妊娠早中晚三期的胎儿 RhD 状态。
6. 综述 (发表在《BMC medicine》影响因子 8.775)：
高通量 NIPT 足以准确检测 RhD 阴性妇女的胎儿 RhD 状态，并可显著减少常规抗-D 免疫球蛋白的不必要治疗。这些发现是否适用于非白人妇女和多胎妊娠妇女尚不确定。

*在此郑重感谢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。

目录

1. 《非侵入性胎儿 RhD 测定的成本和收益》3
Teitelbaum L, Metcalfe A, Clarke G, Parboosingh JS, Wilson RD, Johnson JM. Costs and benefits of non-invasive fetal RhD determination. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):84-8. doi: 10.1002/uog.14723
2. 《使用数字 PCR 进行胎儿性别和 RHD 基因分型显示出比实时 PCR 更高的灵敏度》 10
Sillence KA, Roberts LA, Hollands HJ, Thompson HP, Kiernan M, Madgett TE, Welch CR, Avent ND. Fetal Sex and RHD Genotyping with Digital PCR Demonstrates Greater Sensitivity than Real-time PCR. *Clin Chem.* 2015 Nov;61(11):1399-407. doi: 10.1373/clinchem.2015.239137
3. 《基于扩增子测序的无创胎儿 RHD 阳性 D 抗原阴性等位基因分型》 33
Takahashi K, Migita O, Sasaki A, Nasu M, Kawashima A, Sekizawa A, Sato T, Ito Y, Sago H, Okamoto A, Nakabayashi K, Hata K. Amplicon Sequencing-Based Noninvasive Fetal Genotyping for RHD-Positive D Antigen-Negative Alleles. *Clin Chem.* 2019 Oct;65(10):1307-1316. doi: 10.1373/clinchem.2019.307074
4. 《妊娠早期使用细胞游离胎儿 DNA 进行胎儿 RHD 基因分型的诊断准确性》57
Vivanti A, Benachi A, Huchet FX, Ville Y, Cohen H, Costa JM. Diagnostic accuracy of fetal rhesus D genotyping using cell-free fetal DNA during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2016 Nov;215(5):606.e1-606.e5. doi: 10.1016/j.ajog.2016.06.054
5. 《循环游离 DNA 确定妊娠早中晚三期的胎儿 RHD 状态》64
Moise KJ Jr, Gandhi M, Boring NH, O'Shaughnessy R, Simpson LL, Wolfe HM, Baxter JK, Polzin W, Eddleman KA, Hassan SS, Skupski DW, Ryan G, Walker M, Lam G, Brown R, Skoll MA, Robinson C, Sheikh A, Bronsteen R, Plante LA, McLennan G, Chikova A, Paladino T. Circulating Cell-Free DNA to Determine the Fetal RHD Status in All Three Trimesters of Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2016 Dec;128(6):1340-1346. doi: 10.1097/AOG.0000000000001741
6. 《RhD 阴性妇女胎儿 RhD 状态的高通量无创产前检测：一项系统综述和荟萃分析》 73
Yang H, Llewellyn A, Walker R, Harden M, Saramago P, Griffin S, Simmonds M. High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal rhesus D status in RhD-negative women: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 2019 Feb 14;17(1):37. doi: 10.1186/s12916-019-1254-4

无创产前专刊——RHD

(编辑：艾丽萍，张悦，陈悦妍)

1. 《非侵入性胎儿 RhD 测定的成本和收益》

作者：L. TEITELBAUM*, A. METCALFE*, G. CLARKE†, J. S. PARBOOSINGH‡, R. D. WILSON*, J. M. JOHNSON*.

作者单位：*加拿大卡尔加里大学妇产系；†加拿大血液服务和艾伯塔大学检验医学和病理学系；‡加拿大卡尔加里大学医学遗传学系和艾伯塔省儿童医院研究所。

摘要

目的：用母体血液中的细胞游离胎儿 DNA (cffDNA) 进行非侵入性胎儿 RhD 基因分型，使得可以在未致敏的 RhD 阴性孕妇中进行靶向产前抗 RhD 预防。这项研究的目的是确定与所有未致敏的 RhD 阴性孕妇的常规产前抗 RhD 预防（加拿大艾伯塔省目前的政策）相比，这种靶向方法的成本和收益。

方法：这项研究是一项基于代表艾伯塔省 1 年期间妊娠总数 (n = 69 286) 的一个理论群体的决策分析。创建一个决策树，概述针对筛查 cffDNA 的未致敏 RhD 阴性孕妇的靶向预防（靶向组）vs 针对所有未致敏 RhD 阴性孕妇的常规预防（常规组）。根据当地临床和行政数据计算每个决策点的概率和每个资源相关的成本。测量的结果是成本、致敏妇女的数量和施用的 Rh 免疫球蛋白 (RhIG) 的剂量。

结果：常规组的每次妊娠估计费用为 71.43 加元，而靶向组为 67.20 加元。对于目前方案和靶向方案，每次 RhD 阴性妊娠的致敏率相等，为 0.0012。与目前方案相比，实施靶向产前抗 RhD 预防措施将在艾伯塔省 1 年内节省 4072 剂 (20.1%) RhIG。

结论：这些数据支持靶向产前抗 RhD 预防方案的可行性，其成本低于现有的常规预防方案，且不会增加致敏风险。

1 引言

众所周知，母-胎 RhD 不相容性（母体同种免疫）继发的抗 D 抗体的产生与胎儿和新生儿溶血病有关。这种疾病的结果范围从轻度胎儿贫血到导致胎儿死亡的胎儿红细胞增多症¹。自 20 世纪 70

年代初以来，通过产前和产后给予抗 RhD 免疫球蛋白（RhIG），RhD 同种免疫的风险已从 13% 降低至 0.2%^{1,2}。

在加拿大，所有 RhD 阴性妇女在妊娠 28 周、任何潜在致敏事件（例如侵入性手术或产前出血）和产后发现是 RhD 阳性新生儿时接受常规抗 RhD³。然而，40% 的 RhD 阴性女性携带 RhD 阴性胎儿⁴，对这些女性不必要地施用 RhIG 导致大量不必要的不适、血液制品暴露和成本。

母体血浆中细胞游离胎儿 DNA（cffDNA）的发现使得可以非侵入性测定胎儿 RhD 基因型⁵。一些研究已经证明了这种方法的准确性⁶⁻¹²，且该方法已广泛用于同种免疫人群的临床管理¹³⁻¹⁶。最近，已经引入确定未致敏的 RhD 阴性人群中的胎儿 RhD 基因型，以使携带 RhD 阳性胎儿的妇女能够选择性施用 RhIG，避免施用于无风险的携带 RhD 阴性胎儿的 RhD 阴性妇女。这种靶向方法已经在丹麦和荷兰成功引入，其中胎儿 RhD 基因分型在妊娠 25 周时进行^{9,17,18}。最近，瑞典和英国的试点项目分别在妊娠早期（前 3 个月）和妊娠 16 周进行胎儿 RhD 基因分型，结果相当^{8,19}。鉴于这些项目的成功，我们有兴趣评估这种方法在加拿大（目前存在一种有效的产前抗 RhD 预防方案）的可行性。

本研究的目的是确定在未致敏的 RhD 阴性孕妇中基于非侵入性胎儿 RhD 基因分型实施靶向产前抗 RhD 预防的成本和收益，并将其与加拿大艾伯塔省目前常规的产前抗 RhD 预防方案进行比较。

2 方法

我们开发了多个决策树来模拟艾伯塔省人群中靶向 vs 常规产前抗 RhD 预防的成本和收益。我们的理论研究人群是基于艾伯塔省 1 年内妊娠总数（2010 年 $n = 69\,286$ ）²⁰。我们选择使用妊娠总数而不是分娩总数，是因为妊娠总数包括流产妇女和妊娠初期接受 RhIG 导致治疗性流产的妇女。我们的主要结果是 2013 年使用加元（CAD）的每个妊娠成本。次要结果是在 1 年的研究期间，致敏的妇女人数和每个妊娠接受的 RhIG 剂量。使用比例的双样本测试来评估致敏率的差异。除非另有说明，否则每个妊娠（包括 RhD 阳性和 RhD 阴性妇女）均报告所有结果。

决策树是概述所有可能结果和与每个结果相关的统计概率的模型。为了比较两种产前预防模型的成本和收益，创建了一套决策树。第一个决策树概述了所有未致敏孕妇的常规抗 RhD 预防，因为这是目前加拿大的护理标准（图 1）。这包括在妊娠 28 周、任何潜在致敏事件和分娩后发现婴儿 RhD 阳性时给予 RhIG。第二个决策树概述了针对 cffDNA 筛查患者的靶向预防（图 1）。在这种情况下，所有 RhD 阴性妇女将在妊娠 12 周时进行 RhD 基因分型的非侵入性产前检查（NIPT）。如果发现胎儿 RhD 阴性，则不需要给予 RhIG。具有 RhD 阳性胎儿的妇女将在妊娠 28 周时、在任何潜在的致敏事件和产后接受 RhIG。

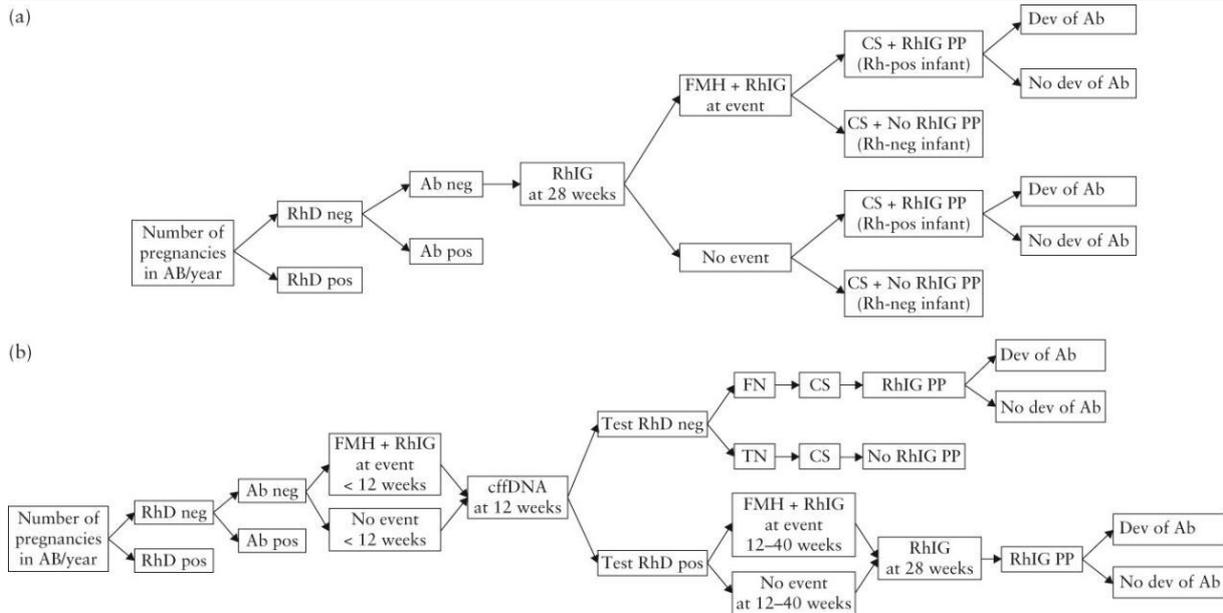


图 1 常规 (a) 和靶向 (b) 产前抗 RhD 预防的决策树。“Dev of Ab”，出现抗体，即被致敏；“No dev of Ab”，没有出现抗体，即未被致敏。“FMH + RhIG at event”和“no event”代表妊娠期间任何时候潜在的致敏事件。AB，艾伯塔省；cfdDNA，细胞游离胎儿 DNA；CS，脐带血清学；Dev 和 dev，出现；FMH，胎母出血；FN，假阴性；neg，阴性；pos，阳性；PP，产后；RhIG，Rh 免疫球蛋白；TN，真阴性。

虽然我们靶向预防的主要分析包括产后脐带血检测以确认 NIPT 的结果，但报告的妊娠 12 周胎儿 RhD 基因分型的假阴性率相当低，并且可能随着技术的进步而继续下降^{7,11}。致敏性分析将产后脐带血分析排除在靶向预防之外，因为在可预见的将来这可能是一种可行且更节省成本的模型。

我们的主要分析没考虑报告的 cfdDNA 测试 8-12%的不确定率^{7,8}。这些病例被视为 RhD 阳性，在妊娠 28 周和任何潜在致敏事件时给予 RhIG。进行了考虑 12%不确定率的额外的致敏性分析。

加拿大血液服务和卡尔加里实验室服务提供了产前 ABO 血型 and Rh 测定以及抗体筛查、胎母出血筛查、RhIG 和脐带血分型的成本（表 1）（个人通信）。从母体血浆中提取 cfdDNA，以及使用 Tounta 等¹²的方案通过多重 PCR 进行 RhD 基因分型的估计成本是基于当地劳动力、设备和耗材的成本。尽管基于 cfdDNA 的胎儿 RhD 基因分型目前尚未在临床上提供，但假定有必要的设备可用，如艾伯塔省的情况。根据当地的临床和行政数据以及文献计算每个决策点的概率（表 2）。根据文献中的估计，我们假设 15%的人口是 RhD 阴性²¹，这些 RhD 阴性女性中 99.5%没有被致敏²²。

表 1 加拿大艾伯塔省每个妊娠抗 RhD 预防方案相关成本

干预	成本（加元）
产前 ABO 血型和 Rh 测定，以及抗体筛查†	34.45
抗 RhD 免疫球蛋白（300 微克）†	80

胎母出血筛查‡	141
cffDNA RhD 测定§	33.68
脐带血分型‡	5.75

‡加拿大血液服务（个人通信）。‡卡尔加里实验室服务（个人通信）。§艾伯塔省儿童医院分子遗传学（个人通信）。cffDNA，细胞游离胎儿 DNA。

表 2 与两个产前抗 RhD 预防方案的所有可能事件的树形图（图 1）节点相关的概率

节点	概率
艾伯塔省人群中的 RhD 阴性基因型*	0.15
抗体阴性的 RhD 阴性女性*	0.995
潜在致敏事件在 12-40 周†	0.12
潜在致敏事件在 < 12 (< 16) 周†	0.23
RhD 阴性母亲分娩 RhD 阳性婴儿 ⁴	0.6
12 周时 cffDNA 结果真阴性 ⁷	0.998
12 周时 cffDNA 结果假阴性 ⁷	0.002
RhD 阴性妇女被致敏 ³	
未给予 RhIG	0.12
仅产后给予 RhIG	0.016
产前（28 周时）和产后给予 RhIG	0.002

*加拿大血液服务（个人通讯）。† L. S. Chitty（个人通讯）。cffDNA，细胞游离胎儿 DNA；RhIG，抗 RhD 免疫球蛋白。

用 Microsoft Excel 构建决策树模型并执行致敏性分析。获得加拿大艾伯塔省卡尔加里大学联合健康研究伦理委员会的伦理批准。

3 结果

由于理论样本群为每年 69 286 个妊娠，因此估计有 10 393 名女性 RhD 阴性。常规方案的估计成本为每个妊娠 71.43 加元，而靶向预防方案的估计成本为每个妊娠 67.20 加元（靶向方案成本降低 5.9%）（表 3）。考虑 12% 不确定结果（作为 RhD 阳性结果进行管理）的致敏率分析显示，靶向预防成本增至每个妊娠 68.27 加元。排除产后脐带血 RhD 分型的第二项致敏率分析表明，靶向预防成本降至每个妊娠 66.85 加元。

表 3 每个妊娠的估计成本和 RhIG 剂量，常规 vs 靶向预防方案

方法	成本/妊娠(加元)*	致敏率/妊娠*	致敏率/RhD 阴性妊娠	RhIG 剂量/RhD 阴性妊娠
常规	71.43	0.00018	0.0012	1.95
靶向	67.2	0.00018	0.0012	1.5

考虑不确定结果的 靶向	68.27	0.00018	0.0012	1.56
排除脐血分型的靶 向	66.85	0.00019	0.0013	1.49

*除非另有说明，否则指总妊娠（RhD 阳性和 RhD 阴性）。

对于常规和靶向预防方案，每 RhD 阴性妊娠的致敏率为 0.0012（每总妊娠 0.00018）。考虑不确定测试结果没有改变致敏率。从靶向方案中排除产后脐带血分析使致敏率增至每 RhD 阴性妊娠 0.0013（每总妊娠 0.00019， $P=0.60$ ）。

每 RhD 阴性妊娠给予的 RhIG 剂量为常规预防 1.95，靶向预防（有或没有脐带血分析）1.50。考虑不确定测试结果，每 RhD 阴性妊娠的 RhIG 剂量为 1.56。考虑不确定检测结果，与目前的常规预防方案相比，靶向预防将在艾伯塔省 1 年内节省 4072 剂 RhIG（4072/20268；节省 20.1%）。

4 讨论

这是首次研究显示，根据目前的成本估算，使用来自母体血浆的 cfDNA 进行胎儿 RhD 基因分型，以使得可以针对未致敏的 RhD 阴性孕妇进行靶向抗 RhD 预防，与已开展的常规抗 RhD 预防方案相比，可以节省成本。该研究还表明，无论这种方法是否考虑产后脐血检测和不确定检测结果，都不会增加致敏率，并且与艾伯塔省每年减少 4072 RhIG 剂量有关。

在艾伯塔省进行 NIPT 胎儿 RhD 基因分型的估计成本是基于 Tounta 等¹²的低成本、高通量方法。我们估计的每个妊娠成本显著低于美国研究员 Hawk 等²³在 2013 年对美国非侵入性胎儿 RhD 分型的分析中引用的成本，这可能是因为美国和加拿大之前医疗保健成本的差异^{24,25}，以及这项技术的成本总体上迅速下降。鉴于 DNA 提取和 PCR 的成本可能会进一步下降，因此可以合理地假设成本效益分析将继续趋向于靶向抗 RhD 预防。

丹麦和荷兰现有的靶向预防方案表明，妊娠 25 周后进行高通量 cfDNA RhD 分型可产生准确的结果。由于妊娠期间母体血液中 cfDNA 水平增加²⁶，人们认为与妊娠超过 25 周时相比，妊娠早期的检测由于 cfDNA 含量不足而可能不那么准确。虽然这种方法允许在妊娠晚期选择性给予 RhIG，但它不允许在妊娠 28 周之前对具有致敏事件的妇女进行靶向预防。在加拿大，在妊娠 28 周和早期任何潜在致敏事件时常规给予 RhIG³。因此，本研究的一个重要假设包括尽早（即妊娠 12 周）确定胎儿 RhD 基因型。Chitty 等人最近评估了早期测试的可行性⁷。该研究评估了从 11 周以下到 24 周以上妊娠期间使用实时定量 PCR 进行胎儿 RhD 分型的准确性。正确识别 RhD 阳性和 RhD 阴性胎儿的几率随着胎龄的增加而显著增加，妊娠 11 周后假阴性水平非常低（11-13 周假阴性率为 0.002）。他

们建议尽早进行胎儿 RhD 基因分型，以最大化女性的临床效益并最小化成本⁷。

有人认为，无论成本如何，当可以使用母体血液进行胎儿 RhD 基因分型并且可以识别不需要 RhIG 的女性时，继续常规抗 RhD 预防在伦理上是不可接受的²⁷。来自多个献血者的血液制品带有感染风险，20 世纪 80 年代的加拿大污染血液丑闻²⁸以及 20 世纪 70 年代爱尔兰大量妇女感染来自 RhIG 的丙型肝炎病毒²⁹证明了这一点。虽然目前的制剂这些风险极低且强烈建议携带 RhD 阳性胎儿的妇女使用 RhIG，但小病毒污染的小残留风险以及传播朊病毒疾病的理论可能性要求只在必要时使用 RhIG。实施 cffDNA 筛查胎儿 RhD 状态将使多达 40% 的 RhD 阴性妇女避免使用 RhIG，不仅道德而且实用，因为 RhIG 在世界范围内短缺⁸。

这项研究并非没有局限性。在我们的分析中，我们没有包括 cffDNA 提取和 PCR 所需的实验室设备成本。该设备目前在本地是可获得的，尽管在省和最终国家水平上实施该方案将需要额外的资金来支付由于测试量增加而导致的启动成本。还有在政策变化中与患者、提供者、实验室和其他利益相关者的教育相关的成本；但是，我们相信可以通过我们省级抗 RhD 预防项目相关的现有基础设施将额外成本最小化。在我们的环境中，母体血液样本 RhD 基因分型将被添加到常规临产血液检查中，通常在妊娠头三个月，前提是该孕妇妊娠 12 周或更长时间。结果应在 7 天内提供⁸，并可用于指导后续的抗 RhD 预防（已是常规护理的一部分）。Soothill 等人最近证明，在英国国家卫生服务已建立实验室技术的环境中，可以在妊娠 15-17 周时实施 cffDNA 筛查胎儿 RhD 基因型的方案，而无需额外成本⁸。此外，我们的分析未包括与假阴性 cffDNA 检测导致的致敏妊娠管理相关的成本。根据 Chitty 等的研究，妊娠 11 周后极少数的假阴性结果会极少地增加同种免疫风险（c.0.07/100 000 名新生儿），这可以通过在靶向方案中改善的产前抗 RhD 预防来平衡，因为咨询和随访可以集中在那些真正需要预防的妇女身上⁷。

总之，这项研究表明，按照艾伯塔省目前的估计成本，实施靶向抗 RhD 预防方案既可行又节省成本，并且可以节省 4072 RhIG 剂量，而不会增加致敏风险。随着更高的样本通量（即在国家方案中），由于规模经济，每位患者的成本可能会降低。靶向方案的其他好处包括避免不适，以及避免 40% 携带 RhD 阴性胎儿的 RhD 阴性妇女注射 RhIG 相关的血液制品暴露风险。

参考文献

- 1 Crowther C, Middleton P. Anti-D administration after childbirth for preventing Rhesus alloimmunisation. Cochrane Database Syst Rev 2000; (2): CD000021.
- 2 Robson SC, Lee D, Urbaniak S. Anti-D immunoglobulin in RhD prophylaxis. Br J Obstet Gynaecol 1998; 105: 129–134.
- 3 Fung Kee Fung K, Eason E, Crane J, Armson A, De La Ronde S, Farine D, Keenan-Lindsay L, Leduc L, Reid GJ, Aerde JV, Wilson RD, Davies G, Désilets VA, Summers A, Wyatt P, Young DC; Maternal-Fetal Medicine Committee, Genetics

- Committee. Prevention of Rh alloimmunization. *J Obstet Gynaecol Can* 2003; 25: 765–773.
- 4 Daniels G, Finning K, Martin P. Noninvasive fetal blood grouping: present and future. *Clin Lab Med* 2010; 30: 431–442.
- 5 Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–487.
- 6 Akolekar R, Finning K, Kuppusamy R, Daniels G, Nicolaides KH. Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11-13 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther* 2011; 29: 301–306.
- 7 Chitty LS, Finning K, Wade A, Soothill P, Martin B, Oxenford K, Daniels G, Massey E. Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. *BMJ* 2014; 349: g5243.
- 8 Soothill P, Finning K, Latham T, Wreford-Bush T, Ford J, Daniels G. Use of cfDNA to avoid administration of anti-D to pregnant women when the fetus is RhD-negative: implementation in the NHS. *BJOG* 2014; doi: 10.1111/1471-0528.13055. [Epub ahead of print]
- 9 Clausen FB, Christiansen M, Steffensen R, Jørgensen S, Nielsen C, Jakobsen MA, Madsen RD, Jensen K, Krog GR, Rieneck K, Sprogøe U, Homburg KM, Grunnet N, Dziegiel MH. Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in D- pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion* 2012; 52: 752–758.
- 10 Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ* 2008; 336: 816–818.
- 11 Manzanares S, Entrala C, Sánchez-Gila M, Fernández-Rosado F, Cobo D, Martinez E, Molina L, Reche R, Pineda A, Gallo JL. Noninvasive fetal RhD status determination in early pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 2014; 35: 7–12.
- 12 Tounta G, Vrettou C, Kolialexi A, Papantoniou N, Destouni A, Tsangaris GT, Antsaklis A, Kanavakis E, Mavrou A. A multiplex PCR for non-invasive fetal RHD genotyping using cell-free fetal DNA. *In Vivo* 2011; 25: 411–417.
- 13 Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002; 42: 1079–1085.
- 14 Finning K, Martin P, Summers J, Daniels G. Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2007; 47: 2126–2133.
- 15 Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood—a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 1163–1173.
- 16 Illanes S, Soothill P. Noninvasive approach for the management of hemolytic disease of the fetus. *Expert Rev Hematol* 2009; 2: 577–582.
- 17 Clausen FB. Integration of noninvasive prenatal prediction of fetal blood group into clinical prenatal care. *Prenat Diagn* 2014; 34: 409–415.
- 18 de Haas M., van der Ploeg CPB, Scheffer PG, Verlinden DA, Hirschberg H, Abbink F, and van der Schoot CE. A nation-wide fetal RHD screening programme for targeted antenatal and postnatal anti-D. *ISBT Science Series* 2012; 7: 164–167.
- 19 Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, Olsson ML, Westgren M, Reilly M. Noninvasive single-exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 2012; 120: 272–234.
- 20 Alberta Reproductive Health Report Working Group. Alberta Reproductive Health: Pregnancies and Births Table Update 2011. Edmonton, AB: Alberta Health and Wellness, 2011.
- 21 Canadian Blood Services. About Blood Types 2014.
http://www.blood.ca/centreapps/internet/uw_v502_mainengine.nsf/page/AboutBloodTypes?
- 22 Canadian Blood Services Diagnostic Services Alberta/NWT. A Year in Review. 2011.
- 23 Hawk AF, Chang EY, Shields SM, Simpson KN. Costs and clinical outcomes of noninvasive fetal RhD typing for targeted prophylaxis. *Obstet Gynecol* 2013; 122: 579–585.

- 24 Stokes M, Becker WJ, Lipton RB, Sullivan SD, Wilcox TK, Wells L, Manack A, Proskorovsky I, Gladstone J, Buse DC, Varon SF, Goadsby PJ, Blumenfeld AM. Cost of health care among patients with chronic and episodic migraine in Canada and the USA: results from the International Burden of Migraine Study (IBMS). *Headache* 2011; 51: 1058–1077.
- 25 Eisenberg MJ, Filion KB, Azoulay A, Brox AC, Haider S, Pilote L. Outcomes and cost of coronary artery bypass graft surgery in the United States and Canada. *Arch Intern Med* 2005; 165: 1506–1513.
- 26 Lun FM, Chiu RW, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Lo YM. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2008; 54: 1664–1672.
- 27 Kent J, Farrell AM, Soothill P. Routine administration of Anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. *BMC Pregnancy Childbirth* 2014; 14: 87.
- 28 Smith A, Fiddler J, Walby K, Hier S. Blood donation and institutional trust: risk, policy rhetoric, and the men who have sex with men lifetime deferral policy in Canada. *Can Rev Sociol* 2011; 48: 369–389.
- 29 Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. *N Engl J Med* 1999; 340: 1228–1233.

2. 《使用数字 PCR 进行胎儿性别和 RHD 基因分型显示出比实时 PCR 更高的灵敏度》

作者：Kelly A Sillence 1, Llinos A Roberts 2, Heidi J Hollands 2, Hannah P Thompson 1, Michele Kiernan 1, Tracey E Madgett 1, C Ross Welch 2, Neil D Avent 1.

作者单位：1 英国普利茅斯大学生物医学与保健科学学院；2 英国普利茅斯医院儿科。

摘要

背景：胎儿 RHD 无创基因分型可以防止对携带 RHD 阴性胎儿的妇女不必要地施用预防性抗 D。我们评估了这种基因分型的实验室方法。

方法：使用 EDTA 采血管和 Streck® Cell-Free DNA™采血管（Streck BCTs）收集 RHD 阴性女性（n=46）的血液样本。使用 Y 特异性和 RHD 特异性靶标，我们研究细胞游离胎儿 DNA（cffDNA）分数的变化，使用新型液滴数字™ PCR（ddPCR）平台确定最优和次优样品的灵敏度，并与实时定量 PCR（qPCR）进行比较。

结果：与在 EDTA 管中收集的样品相比，在 Streck BCTs 中收集的样品的 cffDNA 分数显著更大（ $P<0.001$ ）。在最优 cffDNA 分数（ $\geq 4\%$ ）的样品中，qPCR 和数字 PCR（dPCR）对 TSPY1（睾丸特异性蛋白，Y 连锁 1）和 RHD7（RHD 外显子 7）检测均显示 100%的敏感性。dPCR 对 RHD5（RHD 外显子 5）也具有 100%的敏感性，而 qPCR 对该靶标的敏感性降低（83%）。对于次优 cffDNA 分数（ $<2\%$ ）的样品，dPCR 对所有测定实现 100%灵敏度，而 qPCR 仅对 TSPY1（多拷贝靶标）测定实现 100%灵敏度。

结论：在次优样本（ $<2\%$ cffDNA）中未发现 qPCR 是 RHD 基因分型的有效工具。然而，当通

过 dPCR 在同一天测试相同的次优样品时，对于胎儿性别测定和 RHD 基因分型都实现了 100% 的灵敏度。使用 dPCR 鉴定胎儿特异性标记物，可以减少假阴性和不确定结果的发生，特别是当样品表达高水平的背景母体细胞游离 DNA 时。

1 引言

只有通过分析胎儿 DNA 才能实现胎儿性别、RHD 基因型和染色体异常的诊断。最初，这可以通过诸如羊膜穿刺术和绒毛膜绒毛取样等侵入性程序来实现，有报道流产风险为 1% (1)。自从在母体血浆中发现细胞游离胎儿 DNA (cffDNA) 以来，无创性产前检查现已用于临床 (1-5)。临床上为有 X 连锁疾病 (例如 Duchenne 肌营养不良症) 风险的家庭提供胎儿性别确定 (6)。胎儿性别的确定在先天性肾上腺增生的情况下特别有益，以使治疗仅针对女性胎儿 (7)。胎儿非整倍性检测需要准确的定量，目前只能通过下一代测序来确定，这对于常规检测来说成本太高 (8)。

Rh 血型系统的抗原由 2 个基因 RHD 和 RHCE 编码，它们位于 1 号染色体 (p34-p36) 上 (9)。在白人人群中，大多数 D 阴性表型是由完全 RHD 缺失引起的 (10)。对于非洲裔的 D 阴性个体，只有 18% 是 RHD 缺失的结果。相反，66% 和 15% 的 D 阴性非洲人有一个无活性的 RHD 基因 (RHD Ψ) 或一个杂合基因 (RHD-CE-DS 或 rS)，都不产生任何 RhD 蛋白 (10,11)。目前许多实验室为同种异体免疫妇女提供无创胎儿 RHD 基因分型，作为管理胎儿和新生儿溶血病 (HDFN) 的常规做法 (4,12-14)。1970 年之前，HDFN 是胎儿死亡的主要原因 (仅在英国就有 46/100 000 新生儿) (15)，但自引入常规产前抗 D 预防措施以来，发病率下降了近 10 倍 (16)。目前，西方所有 RHD 阴性女性都接受这种预防，这种预防费用昂贵，因为它是由超免疫的男性志愿者生产的。为胎儿 RHD 基因分型提供非侵入性检测使得可以将给药靶向已知携带 RHD 阳性胎儿的 RHD 阴性女性。现在在荷兰和丹麦常规采用实时定量 PCR (qPCR) 方法 (4,17,18)。然而，最近的出版物描述了数字 PCR (dPCR) 在检测低水平靶标方面的应用，其精确度提高，导致远低于 qPCR 定量限的可靠定量 (19,20)。

使用 Streck® Cell-Free DNA™ 血液采集管 (BCTs) 代替传统的 EDTA 管已被证明可以增加 cffDNA 的比例 (21)。Streck BCT 含有专用细胞保存试剂，可防止母体细胞裂解，从而减少释放到血浆中的母体细胞游离 DNA (cfDNA) 的量。在这项研究中，我们比较了 dPCR 和 qPCR 对于在 Streck BCT 和 EDTA 管中收集的样品的胎儿性别和 RHD 基因型的非侵入性测定的灵敏度。由于技术原因，一些样品尽管在妊娠晚期收集，但仍表达了次优的 cffDNA 分数 (<2%)。然而，纳入所有样品以全面地检测 dPCR vs 当前金标准 qPCR 的能力。

2 材料和方法

2.1 研究参与者

所有符合纳入标准的 RHD 阴性孕妇（妊娠 28-30 周）于 2013 年 11 月至 2014 年 9 月在英国普利茅斯医院 NHS Trust 招募，并获得知情同意。伦理批准由联合布里斯托尔医疗保健和信托研究与伦理委员会授予（13/SW/0148）。

2.2 样品处理

在 EDTA 管中收集了 22 份母体外周血样品（总血容量为 5-10 mL），并在室温下以 1600g 离心 10 分钟（样品 1-22）。小心移出血浆并转移到 15ml 管中。然后将血浆以 16000g 再离心 10 分钟。所有样品在收集后 4 小时内处理，血浆等量分装（1mL）储存在-80 °C。RHD+和 RHD- 收集在 EDTA 管中的人全血（总血容量为 5 mL）分别由 National Health Service 血液和移植（英国布里斯托尔）提供，作为阳性和阴性对照。这些样品在 48-96 小时内按照上述相同的双旋转方案进行处理。

将在 Streck BCT 中收集的 24 份母体血液样本（总血容量 10-20 mL）在室温下以 1600g 离心 15 分钟（样本 23-46）。小心取出血浆，转移至 50ml 管中，并以 2500g 再离心 10 分钟。所有样品在收集后 48 小时内处理，血浆等分试样（1mL）储存在-80 °C。

2.3 DNA 提取

使用 QIAamp 循环核酸试剂盒（Qiagen）和 QIAvac 24 Plus（Qiagen）从两份 1 mL 血浆等分试样中提取 DNA。提取过程遵循制造商的规程，每个样品在 60 μ L 缓冲液 AVE[不含 RNase 的水，含 0.04%(wt/vol)叠氮化钠]中洗脱。没有使用 DNase 或 RNase 处理。DNA 提取后，我们使用 Qubit dsDNA HS 分析试剂盒（Life Technologies）在 2.0 荧光计（Life Technologies）上对样品进行了定量。样品储存在-20°C 作为 60 μ L 等分试样 \leq 4 周。

2.4 PCR 引物和探针

对于 dPCR 和 qPCR，我们检测了 4 个多重反应：2 个用于胎儿性别测定，2 个用于胎儿 RHD 基因分型（表 1）。针对所有多重反应优化引物浓度（300 至 900nmol/L）和退火温度（56°C 至 62°C）。图 1 显示了 TSPY1-FAM/Xp22.3-HEX 的优化过程。我们用 Xp22.3 寡核苷酸检测 2 个 Y 特异性靶标 [SRY（性别决定区 Y）（22）和 TSPY1（睾丸特异性蛋白，Y 连锁 1）] 用于胎儿性别测定的参考。AGO1（argonaute RISC 催化组分 1；以前的 EIF2C1）引物取自 Fan 等人（23），并用作 2 个 RHD 特异性靶标 [RHD 外显子 5（RHD5）和 RHD 外显子 7（RHD7）] 的参考（24），因为 AGO1 也位于

染色体 1 上。所有靶标[羧基荧光素 (FAM) 标记]和参考[六氯荧光素 (HEX) 标记]区域的寡核苷酸序列 (HPLC 纯化, Eurofins Genomics) 和扩增子大小显示在补充文件 1 中。利用在线软件 (<http://primer3.sourceforge.net> and <http://www.idtdna.com/calc/analyzer>) 设计 Xp22.3 反向引物和所有 TSPY1 寡核苷酸的序列, 并针对 NCBI GenBank DNA 数据库 (登录号 NC_000024.10 和 NC_000023.11) 进行 BLAST 分析。

表 1 每个多重反应的扩增子位置、长度和荧光标记

Multiplex reaction	Amplicon	Chromosome	Gene	Exon/intron	Fluorescent reporter dye	Length, bp	Origin
1	Target	Y	SRY	Exon	FAM	137	Lo et al. (22)
2	Target	Y	TSPY1	Exon	FAM	88	In-house
1 and 2	Reference	X	Xp22.3	Intron	HEX	95	Fan et al. (23)
3	Target	1	RHD5	Exon (5)	FAM	82	Finning et al. (24)
4	Target	1	RHD7	Exon (7)	FAM	75	Finning et al. (24)
3 and 4	Reference	1	AGO1	Exon	HEX	81	Fan et al. (23)

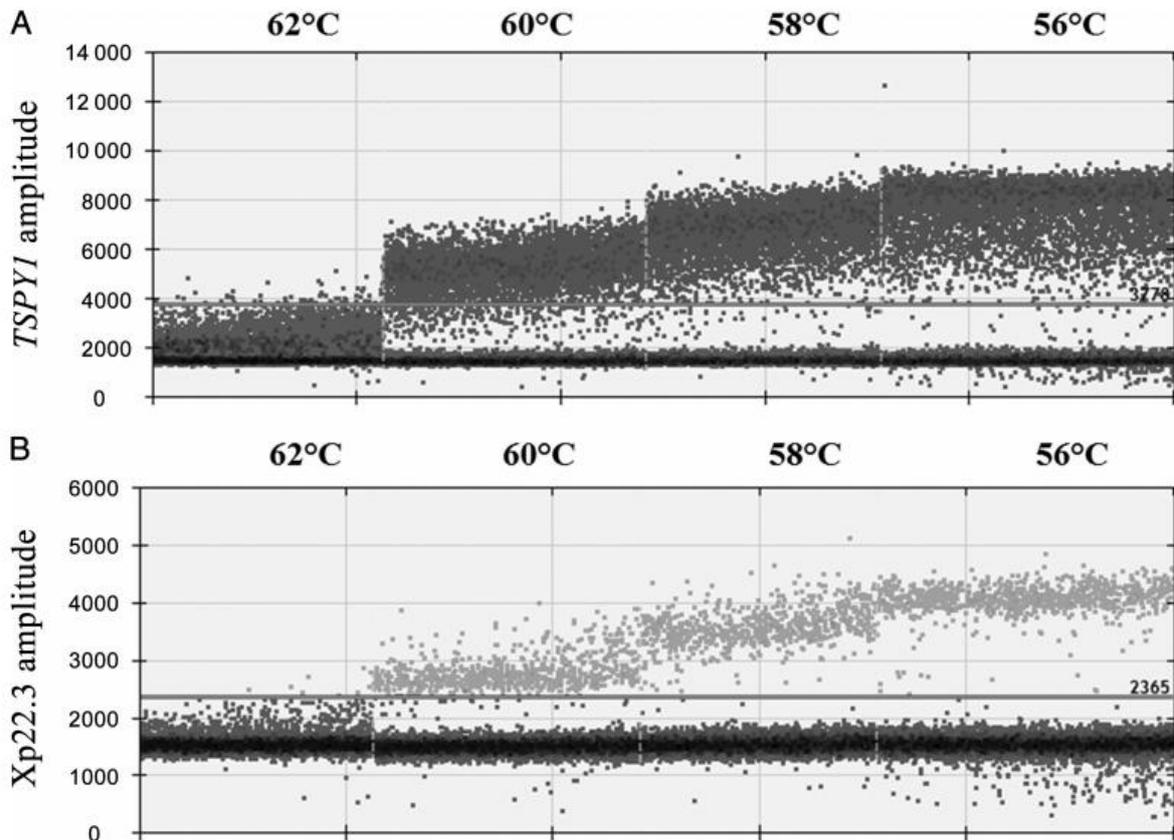


图 1 一维幅度图, 显示 TSPY1-FAM/Xp22.3-HEX 多重反应退火温度的优化。(A) TSPY1-FAM 扩增的阳性液滴 (高于阈值线) 与阴性液滴 (低于阈值线) 的分离 (通道 1)。TSPY1 分离的阈值手动设置为 4000 幅度。(B) Xp22.3-FAM 扩增的阳性液滴 (高于阈值线) 与阴性液滴 (低于阈值线)

的分离。Xp22.3 分离的阈值手动设置为 2300 幅度。结果表明，在 58°C 和 56°C 退火温度 (Ta) 下，两种靶标都最优分离。

补充文件 1

扩增子位置	引物名	引物序列 (5' - 3')	双标记水解探针 (5' - 3') ^a	长度 (bp)	来源
Yp11.3 Exon	SRY Forward	TGGCGATTAAGTCA AATTCGC	FAM-AGCAGTAGAGCAGT CAGGGAGGCAGA-BHQ1	137bp	Lo <i>et al</i> (22)
	SRY Reverse	CCCCCTAGTACCCT ACAATGTATT			
Yp11.2 Exon	TSPY1 Forward	GGGGAGGGTAAGGG AAATAA	FAM-CAAGAGTGAGCACCT CACCC-BHQ1	88bp	实验室内
	TSPY1 Reverse	CAGGACAAGGTGGA GAAAGC			
Xp22.3 Intron	Xp22.3 Forward	GGATGAGGAAGGCA ATGATCCC	HEX-CTGTTTCTCTCTGC CTGCA-BHQ1	95bp	Fan <i>et al</i> (24) 反向引物实 验室内
	Xp22.3 Reverse	GAGACATCTTGCTT TTACC			
1p36.11 Exon (5)	RHD5 Forward	CGCCCTCTTCTTG GATG	FAM-TCTGGCCAAGTTTCA ACTCTGCTCTGCT-BHQ1	82bp	Finning <i>et al</i> (23)
	RHD5 Reverse	GAACACGGCATTCTT CCTTTC			
1p36.11 Exon (7)	RHD7 Forward	CAGCTCCATCATGGG CTACAA	FAM-AGCTTGCTGGGTCTG CTTGAGAGATC-BHQ1	75bp	Finning <i>et al</i> (23)
	RHD7 Reverse	AGCACCAGCAGCAC AATGTAGA			
1p34.3 Exon	EIF2C1 Forward	GTTTCGGCTTTCACCA GTCT	HEX-CTGCCATGTGGAAGA TGATG-BHQ1	81bp	Fan <i>et al</i> (24)
	EIF2C1 Reverse	CTCCATAGCTCTCCC CACTC			

^a VIC 和 FAM 分别表示目标区域和参考区域的两个荧光报告基因；BHQ1，黑洞淬灭基因 1

2.5 实时定量 PCR

qPCR 反应在 20μL 溶液中进行，该溶液包含 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies)，300 nmol/L 引物，250 nmol/L 探针和标准体积的模板 DNA (5μL)。样品浓度记录在补充文件 2 中；由于提取的母体血浆中 cfDNA 的丰度较低，因此样品未稀释。反应一式两份进行，每次测定均带有阳性和阴性对照。优化退火温度 (Ta) 后，在 Life Technologies StepOnePlus™ qPCR 系统上扩增：95°C 10 分钟；95°C 15 秒，58°C 1 分钟，50 个循环。使用 50 个循环以确保低拷贝数靶 DNA 的扩增。每板包括重复 3 次的男性基因组 DNA (gDNA) (Promega) 的标准曲线。我们对所

有靶区域 (SRY, TSPY1, RHD5 和 RHD7) 使用 FAM 标记的荧光探针, 对两个参考区域 (Xp22.3 和 AGO1) 使用 HEX 标记的荧光探针 (表 1; 补充文件 1)。

补充文件 2 从 ddPCR 和 qPCR 获得的胎儿性别鉴定和 RHD 基因分型结果与分娩后记录的结果对比

妊娠周	EDTA/ Streck	gDNA (ng/μl)	qPCR 胎儿 性别结果 ^a		ddPCR 胎儿性别结 果			新生儿 性别 ^b	qPCR 胎儿 RHD 基因分型			ddPCR 胎儿 RHD 基因分型			胎儿 RHD 状态 ^c	
			TSP YI	Sex	SRY	TSP YI	Sex		RHD 5	RHD 7	RHD Status	RHD 5	RHD 7	RHD Status		
PC	N/A	EDTA	2.0	POS	M	POS	POS	M	N/A	POS	POS	POS	POS	POS	POS	N/A
NC	N/A	EDTA	2.0	NEG	F	NEG	NEG	F	N/A	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/A
NTC	N/A	N/A	N/A	NEG	-	NEG	NEG	N	N/A	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/A
1	30+0	EDTA	7.91	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
2	29+0	EDTA	14.76	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
3	29+2	EDTA	9.72	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
4	27+6	EDTA	7.15	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
5	28+2	EDTA	12.01	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
6	28+0	EDTA	6.72	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
7	29	EDTA	27.11	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
8	28	EDTA	6.61	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
9	28+1	EDTA	12.03	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
10	28+3	EDTA	6.97	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
11	27+6	EDTA	9.36	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12	28+1	EDTA	9.03	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	INC	NEG
13	28+0	EDTA	10.22	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
14	28+0	EDTA	12.25	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
15	28+5	EDTA	16.88	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
16	28+1	EDTA	13.01	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
17	28+5	EDTA	15.72	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
18	28+0	EDTA	19.09	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
19	28	EDTA	11.51	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
20	28+5	EDTA	11.87	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
21	28+0	EDTA	15.02	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
22	28+5	EDTA	20.59	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
23	30+3	Streck	0.74	NEG	F	NEG	NEG	F	F	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
24	28+3	Streck	0.798	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
25	27+5	Streck	0.524	POS	M	POS	POS	M	M	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
26	28+2	Streck	0.68	POS	M	POS	POS	M	M	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
27	28+2	Streck	0.552	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
28	28+2	Streck	0.607	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	POS	INC	POS	POS	POS	POS
29	28+4	Streck	0.729	NEG	F	NEG	NEG	F	F	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS

30	28+2	Streck	0.605	NEG	F	NEG	NEG	F	F	POS						
31	27+5	Streck	0.666	POS	M	POS	POS	M	M	POS						
32	38+1	Streck	0.643	POS	M	POS	POS	M	M	POS						
33	29+2	Streck	0.656	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	POS	INC	POS	POS	POS	POS
34	29+2	Streck	0.515	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG	POS	INC	POS	POS	POS	POS
35	28+2	Streck	0.664	POS	M	POS	POS	M	M	POS						
36	29+0	Streck	0.622	POS	M	POS	POS	M	M	NEG	POS	INC	POS	POS	POS	POS
37	28+1	Streck	0.573	NEG	F	NEG	NEG	F	F	POS						
38	28+2	Streck	0.521	NEG	F	NEG	NEG	F	F	POS						
39	28+1	Streck	0.506	NEG	F	NEG	NEG	F	F	POS						
40	28+6	Streck	0.465	POS	M	POS	POS	M	M	NEG						
41	28+4	Streck	0.405	POS	M	POS	POS	M	M	NEG						
42	28	Streck	0.657	NEG	F	NEG	NEG	F	F	NEG						
43	27+5	Streck	0.707	POS	M	POS	POS	M	M	POS						
44	28+4	Streck	0.444	NEG	F	NEG	NEG	F	F	POS						
45	28+5	Streck	0.401	POS	M	POS	POS	M	M	POS						
46	28+6	Streck	0.558	NEG	F	NEG	NEG	F	F	POS						

PC：阳性对照；NC：阴性对照；NTC：无模板对照；NEG：阴性；POS：阳性；M：男；F：女。

a 未显示 qPCR 的 SRY 结果，因为所有样本均未检测到扩增，因此仅通过 TSPY1 结果确定胎儿性别。

b 经出生时体检确认。

c 经脐血样本分析确认。

2.6 数字 PCR

dPCR 反应在 20 μ L 溶液中进行，该溶液包含 10 μ L 液滴数字 PCR (ddPCR) Supermix for Probes (Bio-Rad)、300 nmol/L 引物和 250 nmol/L 探针。由于样品在 Qubit 定量后未稀释，因此我们添加了标准体积的带有阳性和阴性对照的模板 DNA (5 μ L)。所有反应一式两份在 QX100™ 液滴发生器 (Bio-Rad) 上根据制造商的说明运行。通过使用油浸法，样品在真空下通过盒子，在盒子中形成约 20000 个 1-nL 液滴。然后将液滴(总体积为 40 μ L)转移到 96 孔板中，并在 PX1™ 板封机(Bio-Rad)上覆盖一层可穿透的箔热封膜。在 C1000 Touch™热循环仪 (Bio-Rad) 上在优化的条件下进行循环：95 $^{\circ}$ C 10 分钟；95 $^{\circ}$ C 30 秒，58 $^{\circ}$ C 1 分钟，40 个循环；98 $^{\circ}$ C 10 分钟。立即在 QX100™ 液滴读数器(Bio-Rad)上分析样品。为确保一致性，由同一研究者在同一天提取样品进行 qPCR 和 dPCR 检测。

2.7 数据分析

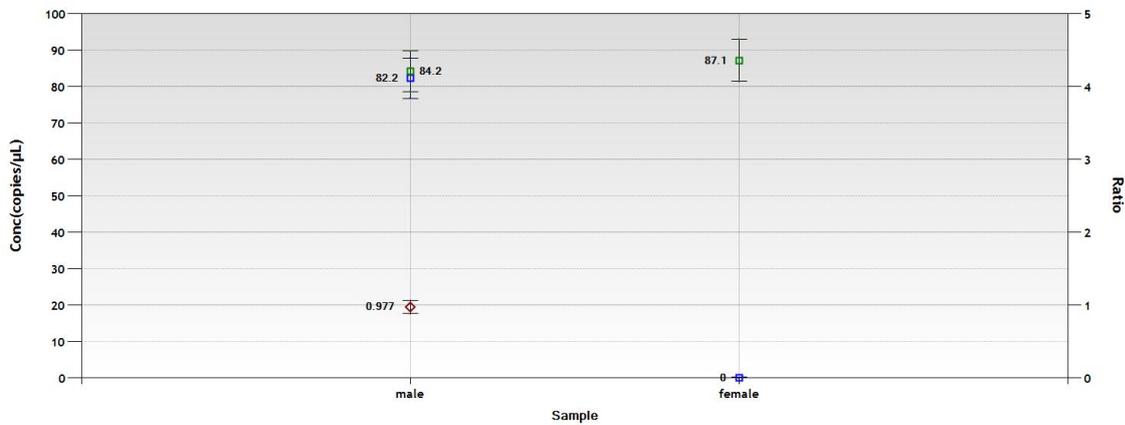
对于 qPCR，若无模板对照 (NTC) 保持阴性 ($C_q > 45$)，则平均定量循环 (C_q) < 45 的靶标记录为阳性，以确保包含低拷贝数靶标。将两个重复的 C_q 值都 > 45 的靶标记录为阴性。所有靶标的阈值设置为 0.05 (StepOne™ 软件 v2.3)。

我们使用 Bio-Rad QuantaSoft v1.2 软件分析了来自 dPCR 平台的原始荧光数据。使用二维 (2D) 幅度图手动设定每个样品的阈值，确定阳性和阴性液滴 (图 1；补充文件 3)。当 2 个簇之间的中间液滴不改变计算浓度 (泊松 95%CI) 时，确定阈值 (20)。补充文件 4 显示根据浓度 (每微升拷贝数) 使用 dPCR 结果计算 cfDNA 分数的方法。使用 Mann-Whitney U 检验 (SigmaPlot v12.5) 进行所有统计分析，以比较 Streck BCT vs EDTA 管的 cfDNA 分数和参考 DNA 浓度，在 $P < 0.05$ 时可接受显著性。

补充文件 3：二维幅度图

> 对于非母体提取的血浆 cfDNA 样本，SRY vs Xp22.3 的比率分析：

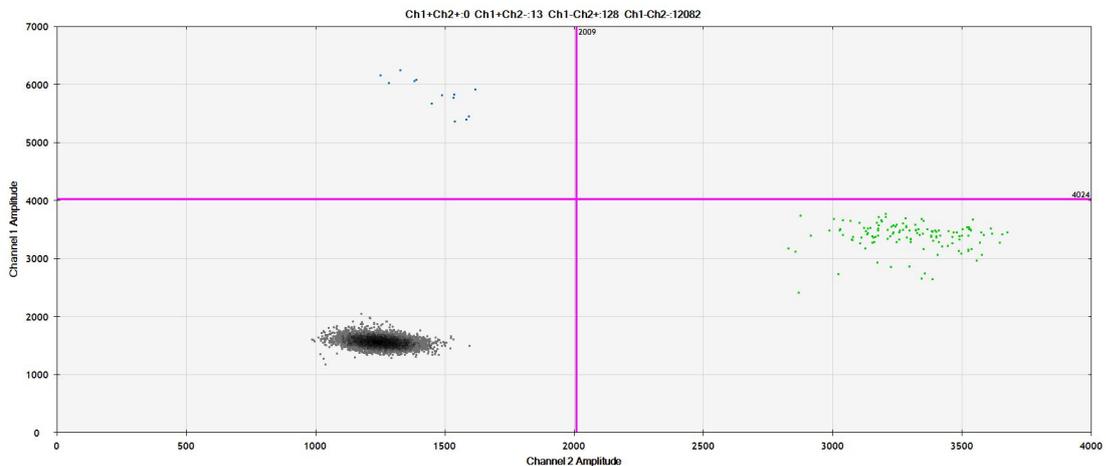
男性样本的比率接近 1 (0.977)，女性样本的比率为 0，因为不存在 SRY cfDNA。



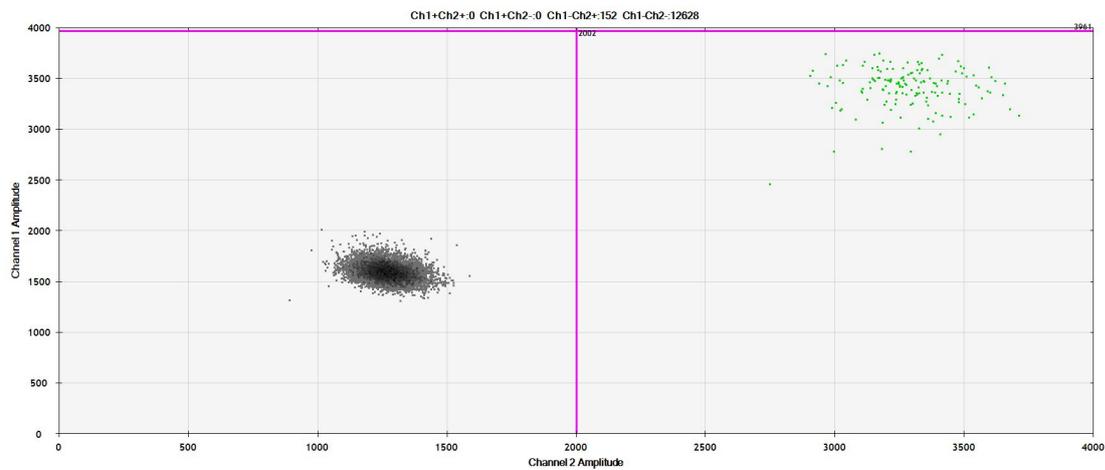
A. 男性胎儿 (18 和 27) 和女性胎儿 (20 和 30) 的胎儿性别识别二维幅度图。样本 18 和 20 代表在 EDTA 试管中采集的母体样本。样本 27 和 30 代表在 Streck BCT 中采集的母体样本。

> EDTA 管中采集的母体样本

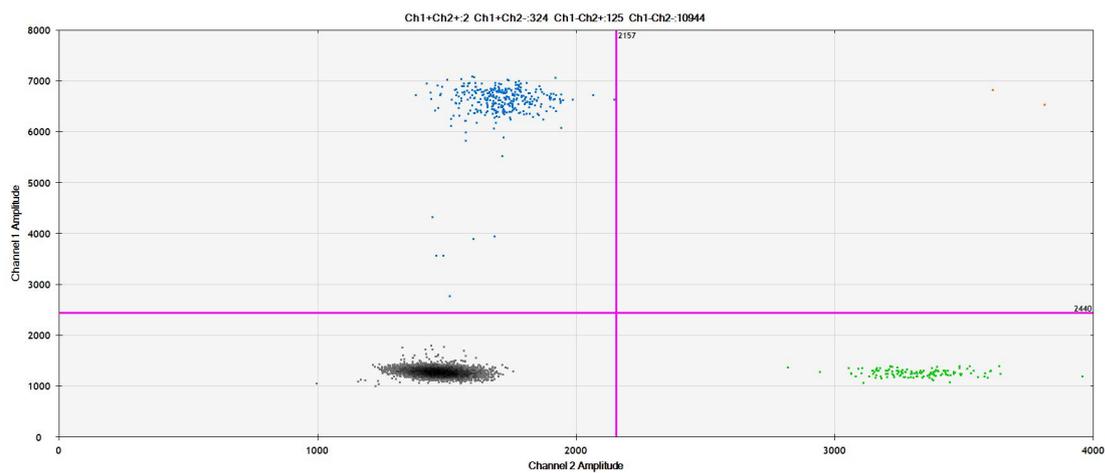
1. 母体样本 18: SRY-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)



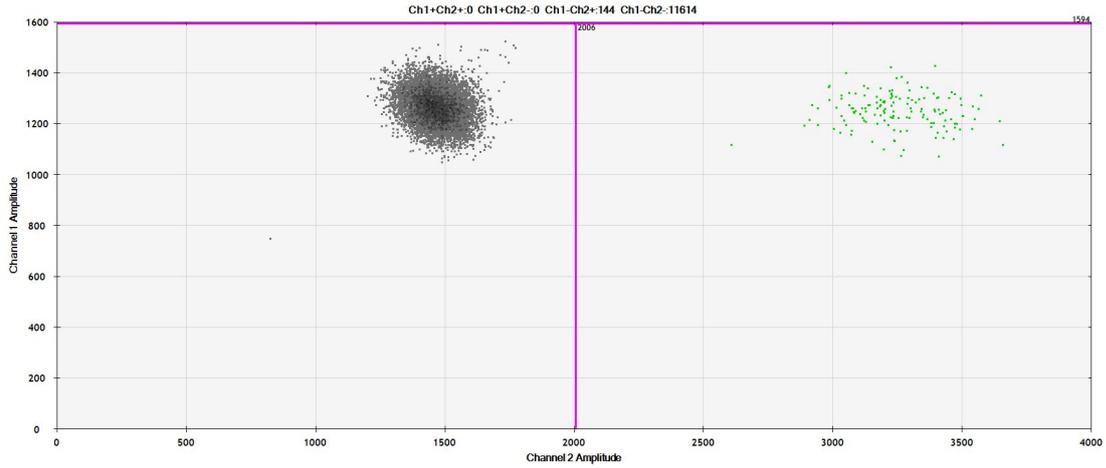
2. 母体样本 20: SRY-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)



3. 母体样本 18: TSYP1-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)

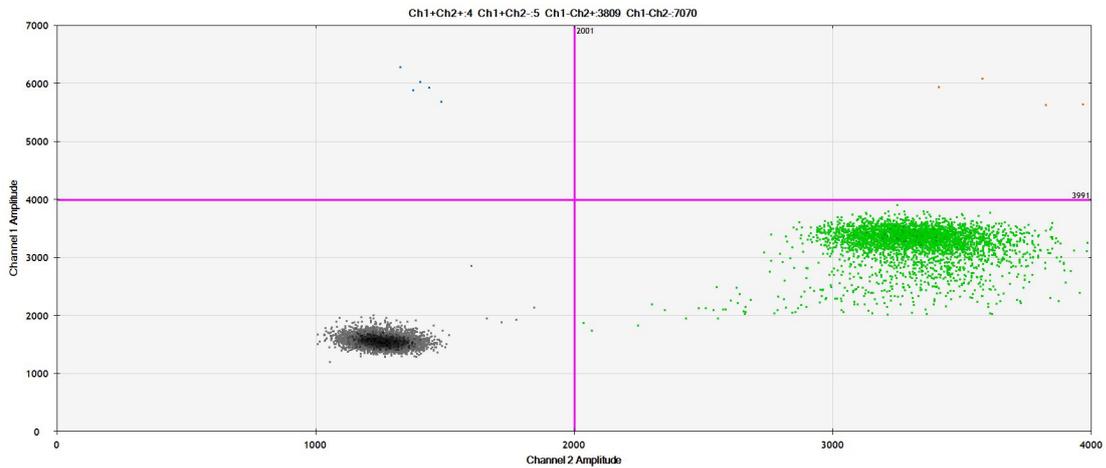


4. 母体样本 20: TSYP1-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)

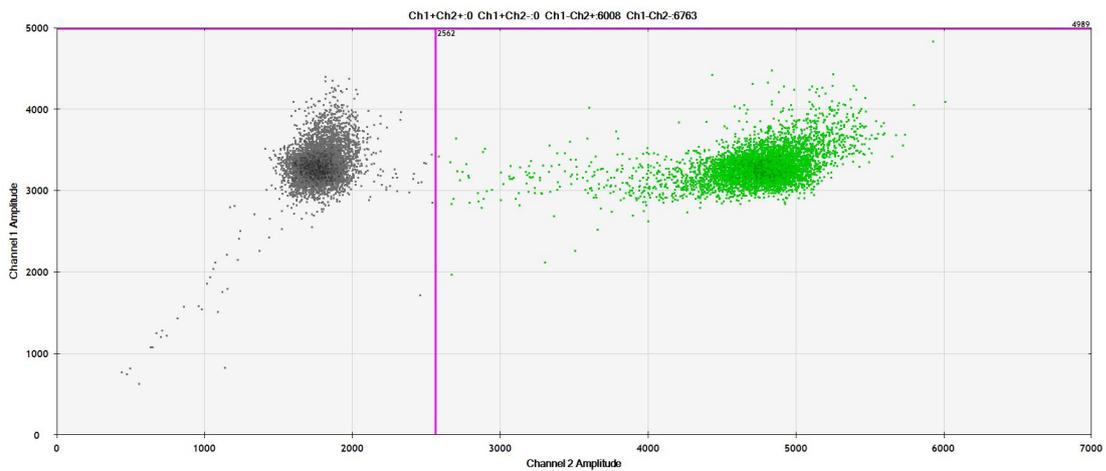


> Streck BCTs 管中采集的母体样本

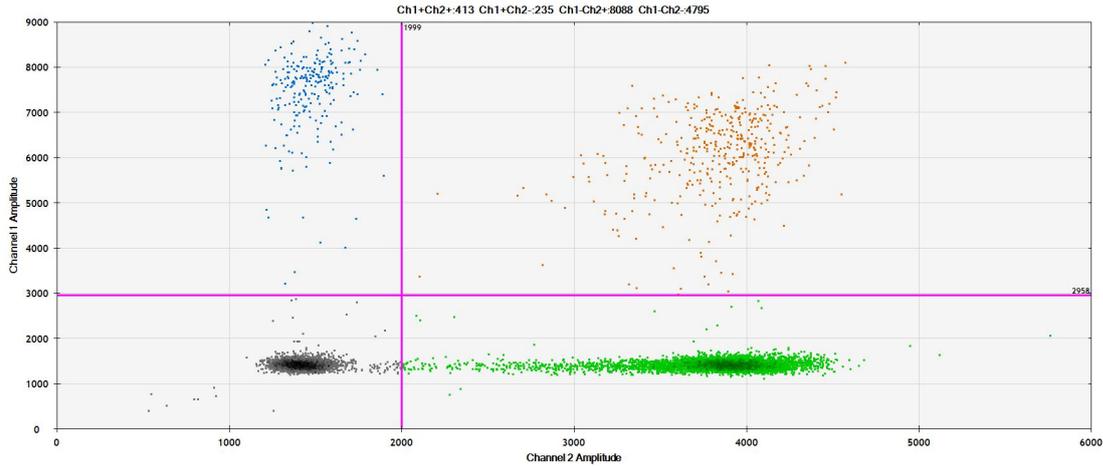
5. 母体样本 27: SRY-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)



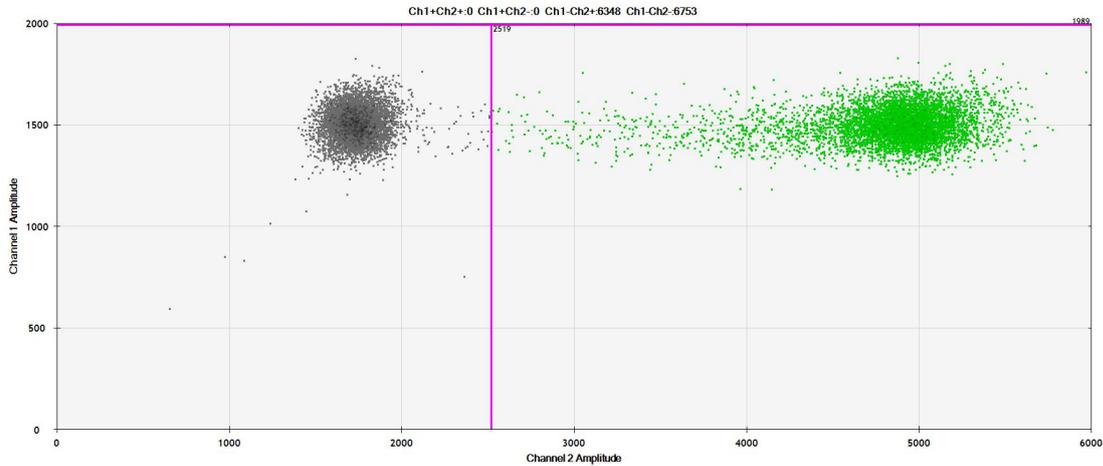
6. 母体样本 30: SRY-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)



7. 母体样本 27: TSYP1-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)



8. 母体样本 30: TSPY1-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)

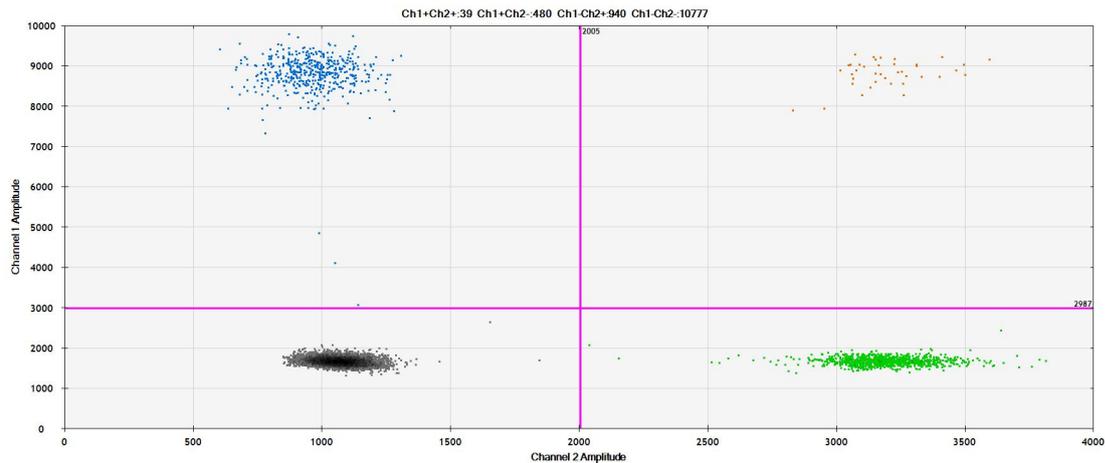


样本 18 (图 1 和图 3) 和样本 27 (图 5 和图 7) 被记录为携带男性胎儿，因为两个样本均显示 SRY-FAM 和 TSPY1-FAM 成功扩增。样本 20 (图 2 和图 4) 和样本 30 (图 6 和图 8) 未显示任何 SRY-FAM 或 TSPY1-FAM 扩增，因此可以鉴定为女性。所有结果均经出生时体检证实。

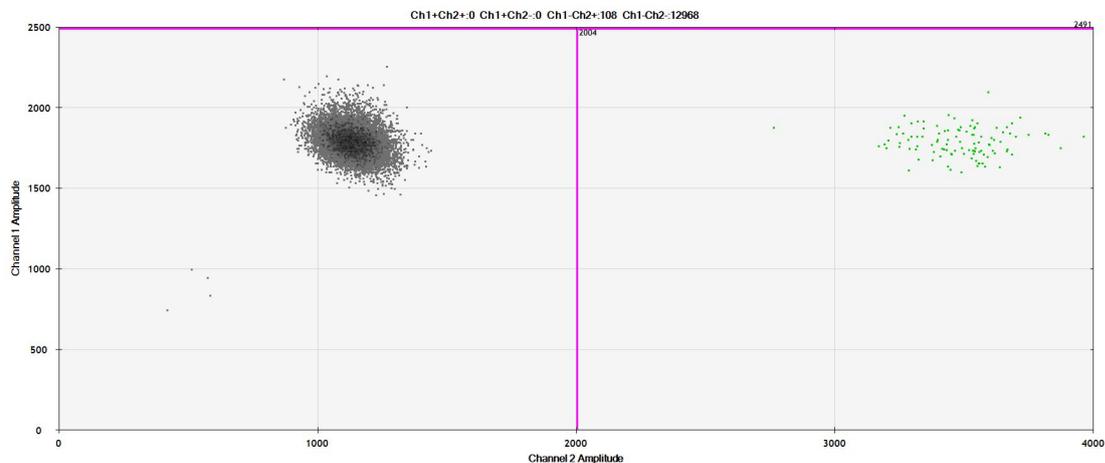
B. RHD+胎儿 (15 和 32) 和 RHD-胎儿 (11 和 27) 的胎儿 RHD 基因分型 2D 幅度图。 样本 15 和 11 代表在 EDTA 管中采集的母体样本。样本 32 和 27 代表在 Streck BCT 中采集的母亲样本。

> EDTA 管中采集的母体样本

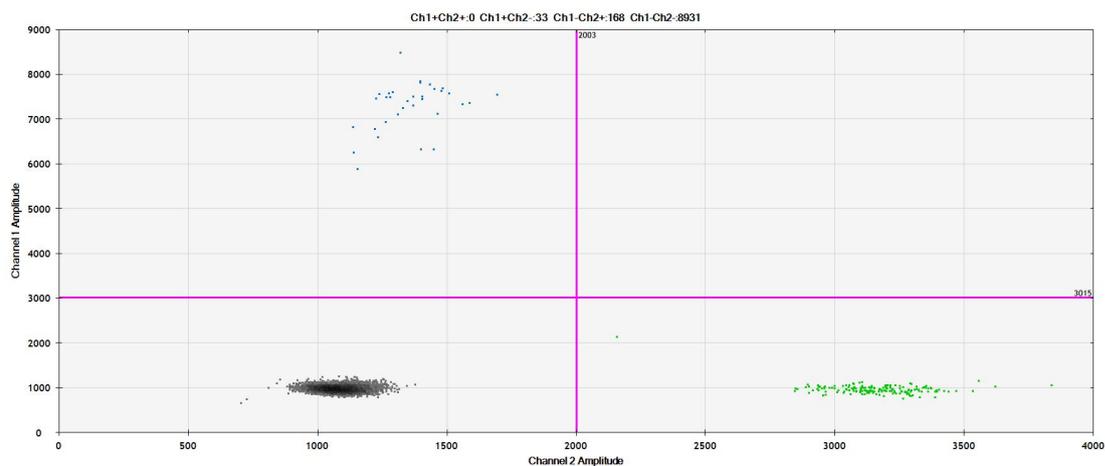
9. 母体样本 15: RHD5-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)



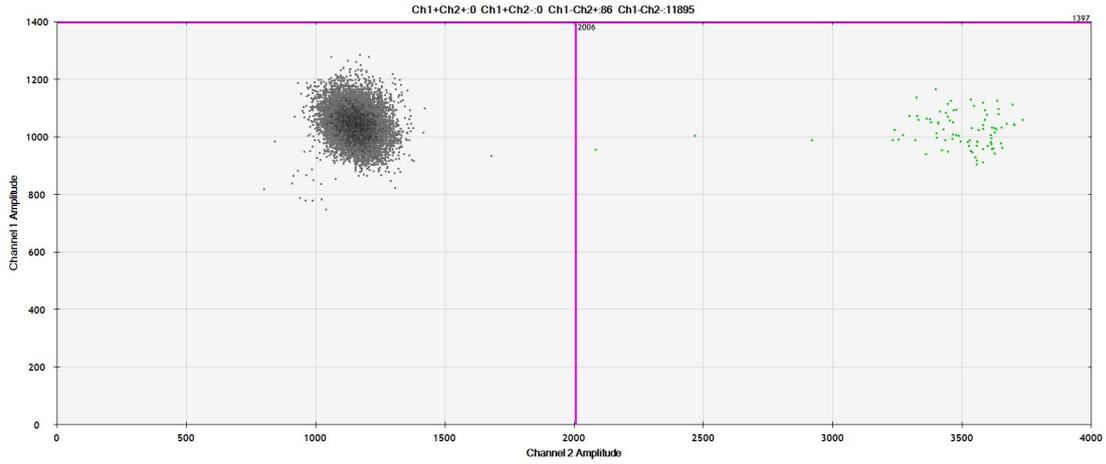
10. 母体样本 11: RHD5-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)



11. 母体样本 15: RHD7-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)

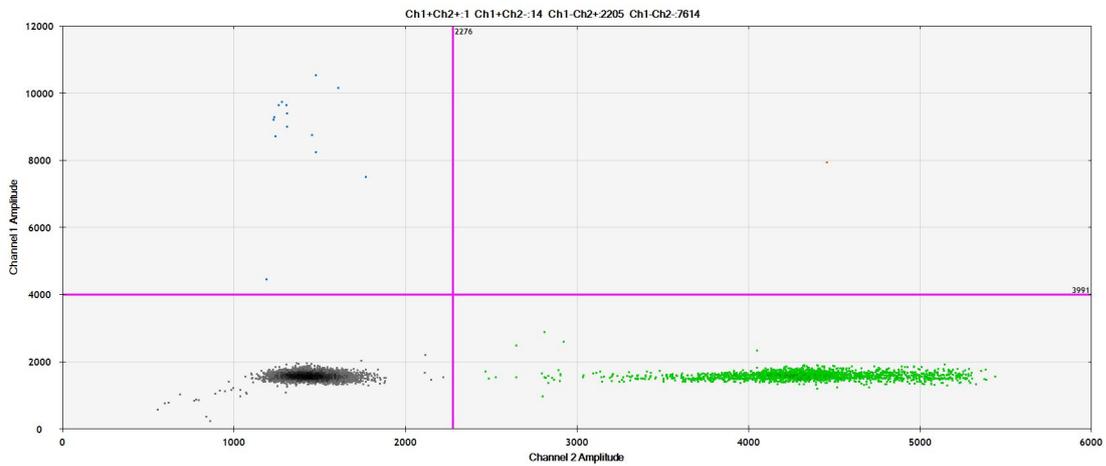


12. 母体样本 11: RHD7-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)

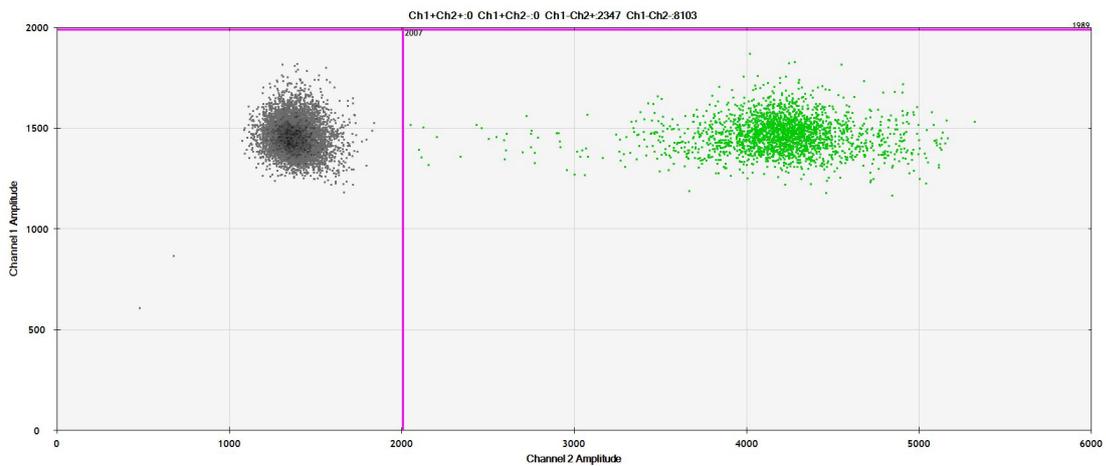


> Streck BCTs 管中采集的母体样本

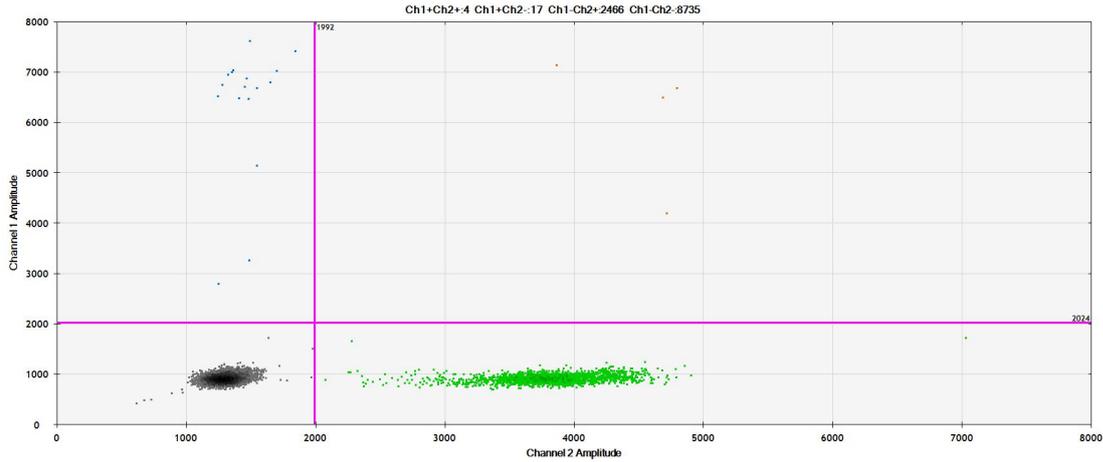
13. 母体样本 32: RHD5-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)



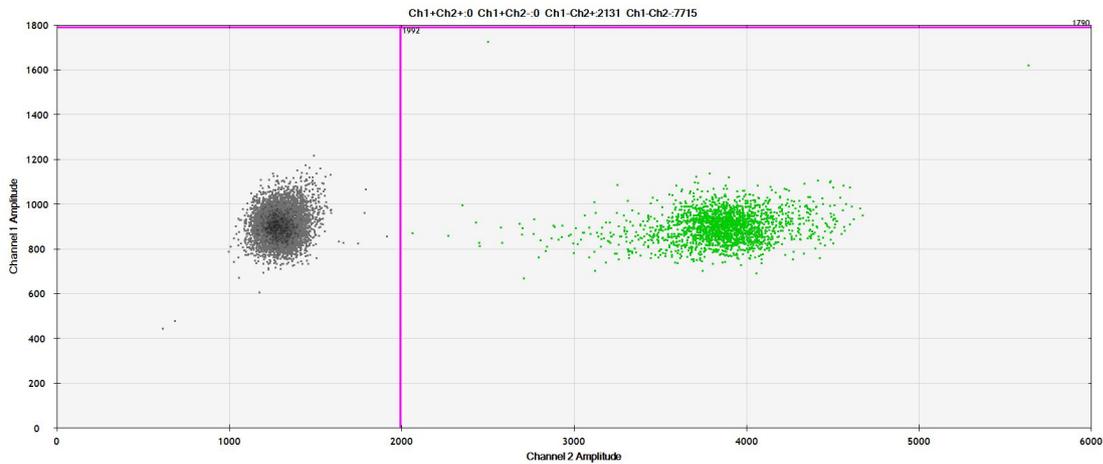
14. 母体样本 27: RHD5-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)



15. 母体样本 32: RHD7-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)



16. 母体样本 27: RHD7-FAM (通道 1) / Xp22.3-HEX (通道 2)



母体样本 15 (图 9 和图 11) 和母体样本 32 (图 13 和图 15) 被记录为携带 RHD+ 胎儿，因为两个样本均显示 RHD5-FAM 和 RHD7-FAM 扩增成功。母体样本 11 (图 10 和图 12) 和母体样本 27 (图 14 和图 16) 未显示任何 RHD5-FAM 或 RHD7-FAM 扩增，因此可确定为 RHD- 胎儿。所有结果均经脐血分析证实。

2.8 确认胎儿性别和 RHD 状态

在出生时确定了 dPCR 和 qPCR 产前检测胎儿性别的准确性 (表 2)。分娩后通过脐血样品血清学验证胎儿血型。

表 2 从 dPCR 和 qPCR 获得的胎儿性别测定和 RHD 基因分型结果与分娩后记录的结果的总结

Platform	Samples	Sex determination					RHD determination				
		Male		Female			Positive		Negative		
		Fetus	Newborn	Fetus	Newborn	Inconclusive	Fetus	Newborn	Fetus	Newborn	Inconclusive
dPCR	46										
EDTA tubes	22	10	10	12	12	0	12	12	9	10	1
Streck BCTs	24	13	13	11	11	0	19	19	5	5	0
qPCR	46										
EDTA tubes	22	10	10	12	12	0	0	12	22	10	0
Streck BCTs	24	13	13	11	11	0	15	19	5	5	4

3 结果

3.1 胎儿性别检测

对于 dPCR，在 100% 的病例中，用 2 个 Y 特异性靶标（TSPY1 和 SRY）预测的胎儿性别与出生时检测相同（表 2）。Ta 梯度针对所有靶标进行了优化，尽管图 1 显示 58°C 和 56°C 下分离程度相同，但 2D 幅度图显示 58°C 下分离得更好（数据未显示）。另外，SRY-FAM/Xp22.3 多重反应产生的比率在 Ta 58°C 比 Ta 56°C 更接近 1（分别为 0.931 和 0.835）。qPCR 的 SRY 测定仅对男性阳性对照成功。因此，仅通过 qPCR 的 TSPY1 测定确定胎儿性别（表 2；补充文件 2）。当 qPCR 仅分析多拷贝靶基因时，结果也显示 100% 的准确性（表 3）。补充文件 5 中显示了 qPCR 数据的校准曲线，斜率，y 截距，R² 值和效率。

表 3 用 dPCR 和 qPCR 分别对 EDTA 管和 Streck BCT 中收集的 22 和 24 个母体样品检测胎儿性别和 RHD 基因分型的结果

Platform and target gene	Sensitivity, %	False-negative results, % (n)	Specificity, %	False-positive results, % (n)	Accuracy, % ^c
dPCR					
Streck BCTs ^a					
<i>TSPY1</i>	100		100		100
<i>SRY</i>	100		100		100
<i>RHD5</i>	100		100		100
<i>RHD7</i>	100		100		100
EDTA tubes ^b					
<i>TSPY1</i>	100		100		100
<i>SRY</i>	100		100		100
<i>RHD5</i>	100		95.5	4.5 (1)	95.6
<i>RHD7</i>	100		95.5	4.5 (1)	95.6
qPCR					
Streck BCTs ^a					
<i>TSPY1</i>	100		100		100
<i>SRY</i>	50	54.2 (13)	100		45.8
<i>RHD5</i>	83.4	16.6 (4)	100		83.4
<i>RHD7</i>	100		100		100
EDTA tubes ^b					
<i>TSPY1</i>	100		100		100
<i>SRY</i>	0	45.5 (10)	100		54.5
<i>RHD5</i>	0	59.1 (13)	100		40.9
<i>RHD7</i>	0	59.1 (13)	100		40.9

a 根据 dPCR 结果计算，母体血浆中的 cfDNA 为 4%–24%。b 根据 dPCR 结果计算，母体血浆中的 cfDNA 为 0.1%–2%。c 准确性计算公式：（真阳性+真阴性）/（真阳性+假阳性+假阴性+真阴性）。

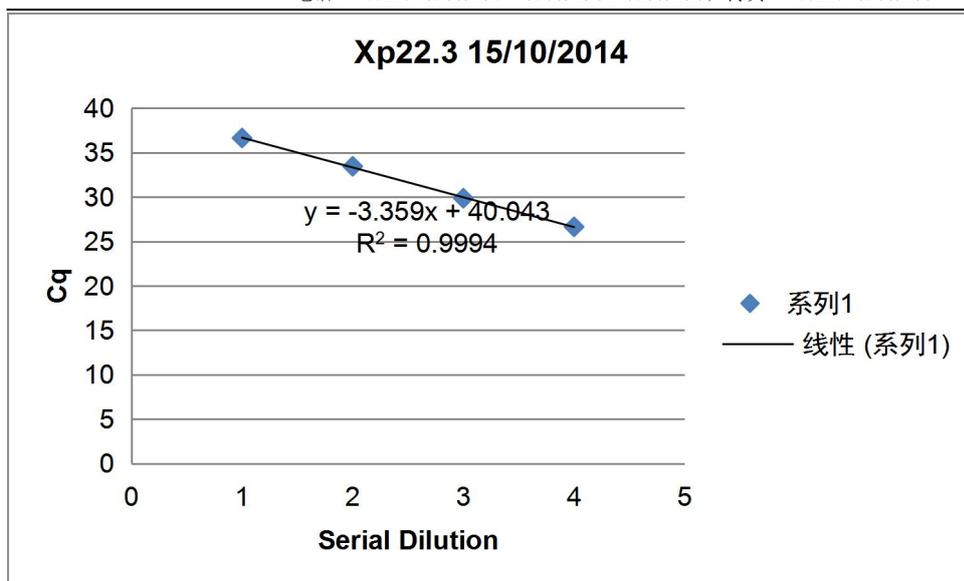
补充文件 5：实时 PCR 斜率、y 截距、R² 和效率 (Eff)

胎儿性别鉴定标准曲线：

PCR 1 and 2

Target	Slope	Y-Intercept	R ²	Eff%
<i>SRY</i>	-3.359	40.03	0.999	98.48
Xp22.3	-3.564	40.59	0.998	90.80
<i>TSYPI</i>	-3.647	33.19	0.998	88.02

Xp22.3:



【其余标准曲线图略】

PCR 3

Target	Slope	Y-Intercept	R ²	Eff%
<i>SRY</i>	-3.479	37.43	0.999	93.84
Xp22.3	-3.502	37.39	0.992	93.00
<i>TSYP1</i>	-3.578	29.91	0.996	90.32

PCR 4

Target	Slope	Y-Intercept	R ²	Eff%
<i>SRY</i>	-3.226	39.937	0.999	104.17
Xp22.3	-3.639	40.986	0.996	88.28
<i>TSYP1</i>	-3.473	32.72	0.999	94.06

胎儿 RHD 基因分型标准曲线：

PCR 5 and 6

Target	Slope	Y-Intercept	R ²	Eff%
<i>RHD5</i>	-3.751	39.18	0.998	84.75
<i>EIF2C1</i>	-3.671	40.25	0.994	87.24
<i>RHD7</i>	-3.371	40.09	0.998	97.99

PCR 7

Target	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
<i>RHD5</i>	-3.627	39.62	0.999	88.67
<i>EIF2C1</i>	-3.589	38.07	0.999	89.95

<i>RHD7</i>	-3.584	38.73	0.999	90.12
-------------	--------	-------	-------	-------

PCR 8

Target	Slope	Y-Intercept	R ²	Eff%
<i>RHD5</i>	-3.827	40.58	0.999	82.52
<i>EIF2C1</i>	-3.463	37.91	0.996	94.43
<i>RHD7</i>	-3.834	39.72	0.999	82.32

基于每个多重反应由 dPCR 产生的浓度（每微升拷贝数）计算 Y 特异性和 RHD 特异性靶标的 cffDNA 分数（补充文件 4）。在 Streck BCT 中收集的样品表达较高的 cffDNA 分数（4%-24%）并被归类为最优，而在样品收集的初始阶段在 EDTA 管中收集的样品显示较低的 cffDNA 分数（0.1%-2%）并被归类为次优（图 2A）。

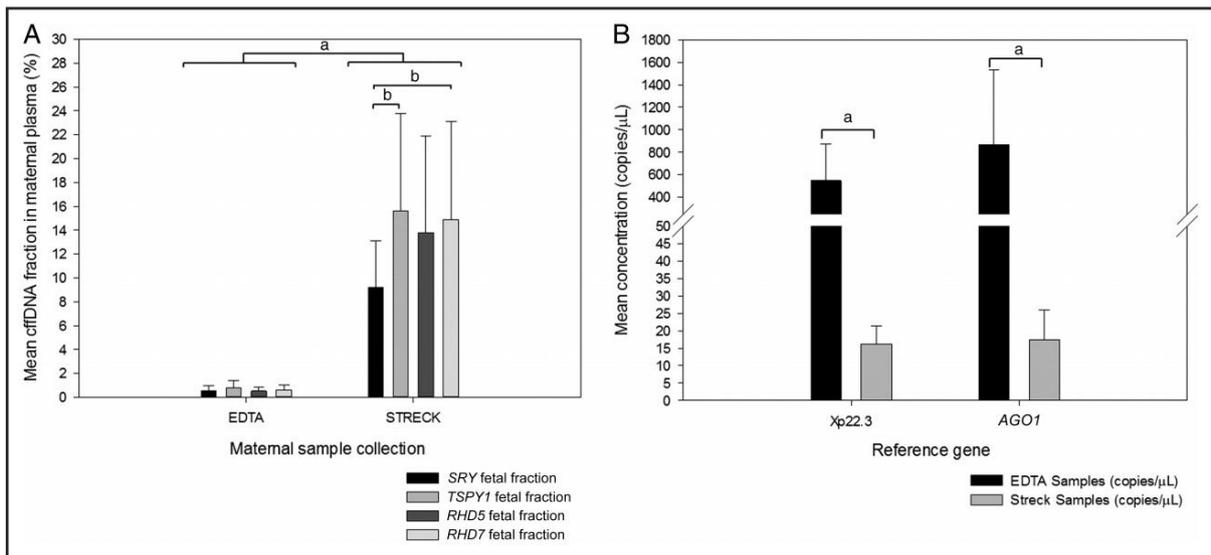


图 2 在 EDTA 管和 Streck BCT 中收集的母体样品之间的比较。(A) 由每个靶基因计算的母体血浆中的平均 cffDNA 分数(补充文件 1)。对于所有 4 个靶区域,与 EDTA 管收集的样品相比, Streck BCT 收集的样品显示出显著更高的平均 cffDNA 分数(^aP<0.001)。基于 RHD7 和 TSPY1 靶基因的 cffDNA 分数显著大于由 SRY 靶基因计算的 cffDNA 分数(^bP<0.01)。(B) EDTA 管和 Streck BCT 收集的母体样品的参考基因区域 Xp22.3 和 AGO1 的平均浓度。EDTA 管样品中两个区域的平均浓度显著高于 Streck BCT (^aP<0.001)。在每种样本采集方法内, Xp22.3 和 AGO1 的平均浓度之间没有显著差异。

补充文件 4: 根据 ddPCR 浓度值 (拷贝数/微升) 计算 cffDNA 分数

根据泊松分布,可以使用以下等式计算来自每个染色体的原始分子数:

$$\text{分子数} = -\ln [(N - n)/N] \times N$$

式中, N 是计数的孔总数, n 是目标或参考阳性孔的数量。

软件 (Bio-Rad QuantaSoft v1.2) 自动将阳性计数的分数拟合到泊松算法，以确定绝对浓度 (以每 μl 的拷贝数表示)。确定所有目标和参考区域的浓度 (拷贝数/微升) 后，计算母体血浆中的 cffDNA 分数 (%)。

对于单拷贝靶标 (SRY、RHD5 和 RHD7)，使用以下等式：

$$\left(\frac{2 \times \text{Target-FAM (copies}/\mu\text{l)}}{\text{Total copies}/\mu\text{l}^*} \right) \times 100$$

多拷贝靶标 cffDNA 计算基于基因组中有 30 个拷贝的 DYS14 (在 TSPY1 基因上) 的假设 (38)。

$$\frac{2 \times (\text{Target-FAM (copies}/\mu\text{l)}) / 30}{\text{Total copies}/\mu\text{l}^*} \times 100$$

*Target-FAM (copies/ μl) + Reference-HEX (copies/ μl).

3.2 胎儿 RHD 基因分型

通过 dPCR，分别在 Streck BCT 和 EDTA 样品的 100% (24/24) 和 95.5% (21/22) 病例中正确鉴定了胎儿 RHD 基因型 (表 3)。一个 EDTA 收集的样品 (样品 12) 产生假阳性结果，因为血清学分析显示胎儿为 RHD 阴性，但 dPCR 显示 RHD7 靶标 (18 滴) 的明显扩增和 RHD5 靶标的最小扩增 (3 滴) (图 3A)。图 3 显示了从对照样品 (NTC, RHD+, RHD-) 的靶基因 (RHD5 和 RHD7) 和参考基因 (AGO1) 获得的浓度 (图 3, A 和 B)；图 3A 示 EDTA 管收集的样品；图 3B 示 Streck BCT 收集的样品。结果显示 RHD 阳性对照的所有 3 个靶标都成功扩增，RHD 阴性对照仅扩增参考 AGO1 基因，NTC 无扩增 (图 3)。除假阳性结果 (1/46, 2%) 外，31 例样本正确分类为 RHD 阳性 (67%)，14 例样本正确分类为 RHD 阴性 (31%) (图 3)。

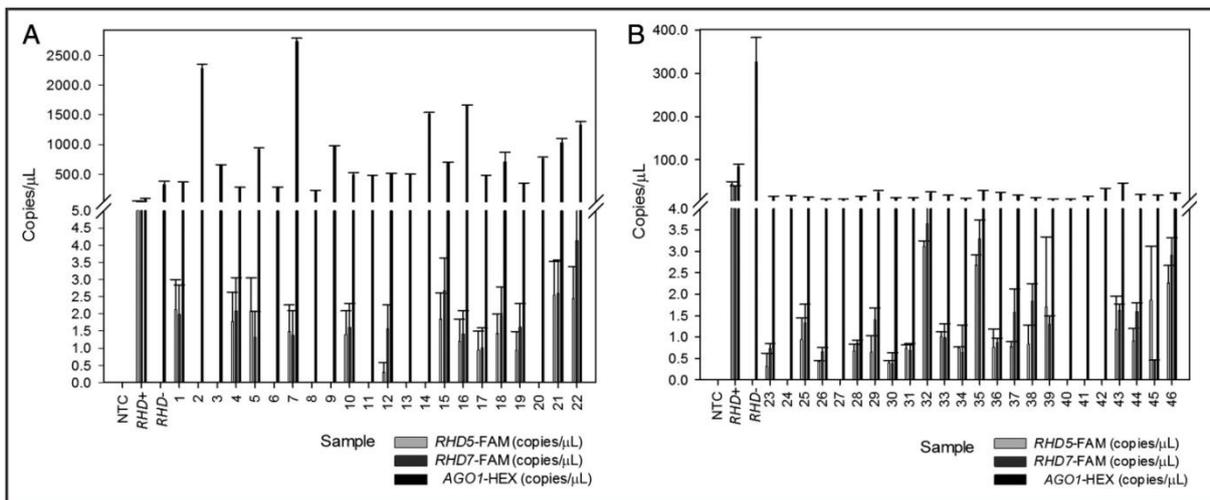


图 3 母体血浆样品的胎儿 RHD 基因分型结果。确定了两个靶区域 (RHD5 和 RHD7) 和参考区域

(AGO1) 的浓度(每微升拷贝数)(加 SD)。靶区域的存在与否用于确定胎儿状态(RHD+或 RHD-)。(A) EDTA 管母体样品 (n=22)。(B) Streck BCT 母体样本 (n=24)。两个图使用相同对照。非母体 cfDNA RHD 阳性对照样品(399X)显示 RHD5/AGO1 和 RHD7/AGO1 的比率分别为 0.51 和 0.47。

最优样品(收集在 Streck BCT 中)，其表达 cfDNA 分数 $\geq 4\%$ ，对于 RHD7 和 RHD5 靶标测定，在 qPCR 平台上分别显示 100%和 83%的准确度。4 个样品(16.6%)被归类为不确定的，因为 qPCR 未检测到 RHD5 靶标，但确实显示出可接受的 RHD7 靶标扩增(<45 Cq)(表 3)。qPCR 平台无法检测次优样品($<2\%$ cfDNA)中的 RHD 特异性标记物(RHD7 和 RHD5)，而血清学和 dPCR 分析证实这些 EDTA 收集的样品中有 59%(13/22)携带 RHD 阳性胎儿。

3.3 样品采集：EDTA vs STRECK BCT

使用 dPCR 结果比较 EDTA 管和 Streck BCT 血液收集方法的 cfDNA 分数和参考靶标浓度。图 2A 显示了两种收集方法的所有 4 个靶区域(SRY, TSPY1, RHD5 和 RHD7)的母体血浆中的平均 cfDNA 分数。所有靶区域的 Streck BCT 样品平均 cfDNA 分数(9%–16%)显著大于 EDTA(0.5%–1%)($P<0.001$)。所有 4 个靶标之间 EDTA 样品产生的平均 cfDNA 分数没有显著差异($P>1$)。然而，基于 SRY 靶标计算的 cfDNA 分数显著小于 TSPY1 和 RHD7 cfDNA 分数($P<0.01$)。

尽管每个参考基因(Xp22.3 和 AGO1)的浓度(图 2B)是母体和胎儿 cfDNA 的组合，但它主要来自母体(90%–95%)。Streck BCT 样品显示 Xp22.3 和 AGO1 参考基因的平均浓度相似(分别为 16.18 和 17.39 拷贝/ μL ； $P>0.1$)(图 2B)。与 Streck BCTs 相比，EDTA 管收集的母体样品的两个参考靶标(Xp22.3 和 AGO1)的浓度高 40 倍以上(平均浓度分别为 548.04 和 869.25 拷贝/ μL)，表明母体白细胞降解(图 2B)。2D 幅度图(补充文件 3)还显示，与 Streck BCT 收集的母体样品相比，EDTA 管收集的母体样品的参考(HEX 标记)液滴数量显著更高($P<0.001$)。对于 EDTA 和 Streck BCT 收集的样品，通过 RHD5 和 RHD7 扩增确定的胎儿浓度相似($P>0.1$)：分别为 0.9–4.2 拷贝/ μL 和 0.3–3.7 拷贝/ μL (图 3)。

4 讨论

qPCR 非侵入性胎儿 RHD 基因分型已显示出对于最优样品的高水平准确性(平均 97.4%)，且目前正在荷兰和丹麦实施，用于靶向施用预防性抗 D(4, 10, 11, 17, 18, 25)。在最近一项基于群体的队列研究中，使用 qPCR 从妊娠早期结束时开始高通量胎儿 RHD 基因分型就足够了(26)。然而，对于妊娠 <11 周采集的样本，865 个样本中有 16 个(1.8%)被错误地归类为 RHD 阴性。4913 个检

测样本中有 393 个 (8%) 胎儿 RHD 基因分型不确定的 (26)。先前的研究已确定，低 cfDNA 分数可导致 qPCR 假阴性结果，从而限制了该方法的敏感性 (27-29)。本研究中用于 RHD 基因分型的寡核苷酸与 Finning 等 (24) 使用的序列相同，但由于未知原因，我们的 qPCR 测定效果较差。然而，我们的结果清楚地表明，对于次优样品，单拷贝靶标 (SRY, RHD5 和 RHD7) 不能通过 qPCR 检测到，但在 dPCR 平台上实现了 100% 的灵敏度 (95%CI)。

由于这些样本的胎龄，cfDNA 预计 >5% (1)。然而，结果显示 EDTA 收集的样品的母体 DNA 降解，因为与 Streck BCT 收集的样品相比，参考 (Xp22.3 和 AGO1) 的阳性液滴数量显著更高 ($P < 0.001$) (图 2B; 补充文件 3)。这些新的 dPCR 数据表明 qPCR 假阴性结果不是由绝对 cfDNA 浓度低引起的，因为它们与最优样品 cfDNA 浓度相似 (图 2B)，而是由相对 cfDNA 浓度低引起的。所使用的测定法具有高度特异性，理论上不应发生非特异性扩增，但由于 RHD5 和 RHD7 探针与 RHCE 基因分别具有 96.5% 和 100% 的同源性，因此探针可能与丰富的母体 RHCE 结合，耗尽胎儿特异性 RHD 靶标可用的探针。尽管如此，当 cfDNA 拷贝数非常低时，更可能出现假阴性结果，特别是检测胎儿罕见 SNP 突变时。qPCR 更容易受到母体等位基因非特异性扩增的影响，dPCR 在检测与 β 地中海贫血和囊性纤维化等疾病相关的等位基因方面可能更有效。

已显示胎儿 DNA 分数与处理前的时间呈正相关 (30)。为了保持大的 cfDNA 分数，建议 EDTA 管收集的样品应在 6 小时内提取并在提取前保存在 4°C。尽管 EDTA 收集的母体样品在 6 小时内进行了处理，但由于后勤原因，这些样品各站点间的所有运输都是在室温下进行的。所选择的参考基因 (Xp22.3 和 AGO1) 是基于 cfDNA 在整个基因组中均匀片段化的假设，且 dPCR 分析显示非母体 cfDNA 样品的参考基因到靶基因的丰度相等，因为表达比率约为 1 (补充文件 3)。这很重要，因为先前的研究表明，与基因组 DNA 相比，cfDNA 中的参考靶标 [例如 TERT (端粒酶逆转录酶) 和 ERV3-1 (内源性逆转录病毒第 3 组，成员 1)] 的代表性不相等 (31)。另外，图 3 中使用的 RHD+ 对照显示约 0.5 的比率，说明对照样品对于 RHD 基因是半合子的，而用相同测定法检测的纯合 RHD 样品表达接近 1 的比率 (数据未显示)。

用 dPCR 数据计算 cfDNA 分数，因为预计它们对于低拷贝数模板具有更高水平的灵敏度和更高的准确性 (32)。纳入泊松统计以确定拷贝数，因为一些液滴可能包含多个靶标 (33)。胎儿靶 DNA 的比例相对较低 [平均液滴数 12 084，EDTA 管和 Streck BCT 样品的平均 RHD 分子数分别为 20.8 和 17.8 (数据未显示)]。然而，与 Streck BCT (例如样品 32 每个分装 0.023 个平均拷贝) 相比，EDTA 母体样品 (例如样品 15 每个分装 0.62 个平均拷贝) 参考基因 (例如 AGO1) 的每个分装平均拷贝数增加，导致双阳性液滴比例更高 (补充文件 3)。自从 2012 年 QX100™ ddPCR 系统发布以来，已

进行了各种研究，以确定其应用是否可以增强或取代目前基于 qPCR 的方法 (19,20,33-36)。一些研究显示 dPCR 和 qPCR 具有相同的灵敏度，但 dPCR 方法的精密度和日间重复性水平有所提高 (35,36)。然而，一些研究显示，与 qPCR 方法相比，dPCR 平台的敏感性和特异性显著提高 (19,20,33,34)。本研究表明 dPCR 平台的灵敏度显著提高，特别是对于胎儿 DNA 相对比例低 (<2%) 的样品 (表 3)。

根据 qPCR 数据，54% 的患者有假阴性结果，在临床环境中不会接受所需的抗 D，有同种免疫和随后的 HDFN 风险。然而，dPCR 结果显示没有假阴性结果，并且在我们的研究队列中，该测定的常规实施将防止 31.1% 的患者不必要的抗 D 施用。先前的研究还报道了当胎儿表达 D-变体时的假阳性或不确定结果 (4,20,24)。假阳性结果不会造成同种免疫的风险，但会导致不必要的抗 D 给药。如果应用于临床环境，对于 Streck BCT 样品，qPCR 结果不确定的 4 名妇女将施用抗 D，这是必要的，因为胎儿是 RHD+。根据 dPCR 数据，只有 1 名女性 (2%) 会接受不需要的抗 D。本研究中用于 RHD 靶标的寡核苷酸引物如 Finning 等 (24) 所述。这些引物本该通过扩增变体样品的外显子 7 而不是外显子 5 来区分 RHD 阳性和 RHD Ψ /DVI (type 1-4) 胎儿基因型。然而，伦理审批的限制阻止了通过分析脐血 DNA 来确定样本 37 (dPCR 结果不确定) 的真实 RHD 基因型。由于 D-变体，dPCR 和 qPCR 将表达相似水平的假阳性，但我们的结果显示 dPCR 具有消除或减少假阴性的潜力，特别是对于低 cfDNA 分数 (<2%) 样品。

总之，本研究表明，与 qPCR 相比，dPCR 显示胎儿性别测定和 RHD 基因分型的准确性提高，特别是对于胎儿 DNA 相对比例低 (<2%) 的次优样品。尽管在大多数大规模验证研究中 qPCR 的准确性相对较高 (3,9,24)，但仍存在假阴性结果并且归因于母体 DNA 降解。现在需要进一步的大规模研究来确定 dPCR 对胎儿 RHD 基因分型的准确性，但是这些结果表明 dPCR 有可能为预防性抗 D 的靶向给药提供更安全和更可靠的非侵入性诊断检测。

参考文献

1. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7.
2. Rijnders RJ, Christiaens GC, Bossers B, van der Smagt JJ, van der Schoot CE, de Haas M. Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Obstet Gynecol* 2004;103:157-64.
3. Avent ND, Chitty LS. Non-invasive diagnosis of fetal sex; utilisation of free fetal DNA in maternal plasma and ultrasound. *Prenat Diagn* 2006;26:598-603.
4. De Haas M, Van der Ploeg C, Scheffer P, Verlinden D, Hirschberg H, Abbink F, et al. A nation-wide fetal RHD screening programme for targeted antenatal and postnatal anti-D. *ISBT Sci Ser* 2012;7:164-7.
5. Avent ND. Prenatal testing for hemolytic disease of the newborn and fetal neonatal alloimmune thrombocytopenia: current status. *Expert Rev Hematol* 2014;7:741-5.

6. Lewis C, Hill M, Skirton H, Chitty L . Non-invasive prenatal diagnosis for fetal sex determination: benefits and disadvantages from the service users' prospective. *Eur J Hum Genet* 2012;20:1127–33.
7. New MI, Tong YK, Yuen T, Jiang P, Pina C, Chan KA , et al. Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E1022–30.
8. Agarwal A, Sayres LC, Cho MK, Cook-Deegan R, Chandrasekharan S . Commercial landscape of noninvasive prenatal testing in the United States. *Prenatal diagnosis* 2013;33:521–31.
9. Avent ND . RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges. *Methods Mol Biol* 2008;444:185–201.
10. Wagner FF, Flegel WA . RHD gene 缺失 occurred in the Rhesus box. *Blood* 2000;95:3662–8.
11. Daniels G, Faas B, Green C, Smart E, Maaskant-van Wijk P, Avent N , et al. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. *Transfusion* 1998;38:951–8.
12. Sillence KA, Madgett TE, Roberts LA, Overton TG, Avent ND . Non-invasive screening tools for Down's syndrome: a review. *Diagnostics* 2013;3:291–314.
13. Van der Schoot C, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens L, De Haas M . Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 2006;13:53–7.
14. Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y, Ernault P, Olivi M, Gaillon T , et al. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:666–9.
15. Bowman JM . Hemolytic disease of the newborn. *Vox Sang* 1996;70:62–7.
16. Kumar S, Regan F . Management of pregnancies with RhD alloimmunisation. *BMJ* 2005;330:1255–8.
17. Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R, Baulard C, Métral S, Le Van Kim C , et al. Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women. *Mol Diagn* 2004;8:23–31.
18. Banch Clausen F, Steffensen R, Christiansen M, Rudby M, Jakobsen M, Jakobsen T , et al. Routine noninvasive prenatal screening for fetal RHD in plasma of RhD-negative pregnant women: 2 years of screening experience from Denmark. *Prenat Diagn* 2014;34:1000–5.
19. Strain MC, Lada SM, Luong T, Rought SE, Gianella S, Terry VH , et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PloS one* 2013;8:e55943.
20. Miotke L, Lau BT, Rumma RT, Ji HP . High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR. *Anal Chem* 2014;86:2618–24.
21. Wong D, Moturi S, Angkachatchai V, Mueller R, DeSantis G, van den Boom D , et al. Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clin Biochem* 2013;46:1099–104.
22. Lo Y, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM , et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768–75.
23. Fan HC, Blumenfeld YJ, El-Sayed YY, Chueh J, Quake SR . Microfluidic digital PCR enables rapid prenatal diagnosis of fetal aneuploidy. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200:543.e1–7.
24. Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G . Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ* 2008;336:816–8.
25. Brojer E, Zupanska B, Guz K, Orzinska A, Kalinska A . Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2005;45:1473–80.
26. Chitty LS, Finning K, Wade A, Soothill P, Martin B, Oxenford K , et al. Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. *BMJ* 2014;349:g5243.
27. Müller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Köhler M , et al. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion* 2008;48:2292–301.
28. Lo YD, Lau TK, Chan LY, Leung TN, Chang AM . Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of

- nucleated cells and plasma DNA. Clin Chem 2000;46:1301-9.
29. Zhong XY, Bürk MR, Troeger C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S . Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma. Obstet Gynecol 2000;96:991-6.
30. Norton SE, Luna KK, Lechner JM, Qin J, Fernando MR . A new blood collection device minimizes cellular DNA release during sample storage and shipping when compared to a standard device. J Clin Lab Anal 2013;27:305-11.
31. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, Huggett JF . Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. Anal Bioanal Chem 2014;406:6499-512.
32. Jones M, Williams J, Gärtner K, Phillips R, Hurst J, Frater J . Low copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, 'definetherain.' J Virol Methods 2014;202:46-53.
33. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S , et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. Anal Chem 2011;84:1003-11.
34. Kim TG, Jeong S-Y, Cho K-S . Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR in mcrA-based methanogen community analysis. Biotechnol Rep 2014;4:1-4.
35. Hayden R, Gu Z, Ingersoll J, Abdul-Ali D, Shi L, Pounds S , et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. J Clin Microbiol 2013;51:540-6.
36. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ , et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. Nat Methods 2013;10:1003-5.
37. Flegel WA . The genetics of the Rhesus blood group system. Blood Transfus 2007;5:50.
38. Barrett AN, McDonnell TCR, Chan KCA, Chitty LS . Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia. Clin Chem 2012;58:1026-32.

3.《基于扩增子测序的无创胎儿 RHD 阳性 D 抗原阴性等位基因分型》

作者： Ken Takahashi,1,2,3 Ohsuke Migita,1,4* Aiko Sasaki,3 Michiko Nasu,5 Akihiro Kawashima,5 Akihiko Sekizawa,5 Taisuke Sato,1,2 Yuki Ito,1,2 Haruhiko Sago,3 Aikou Okamoto,2 Kazuhiko Nakabayashi,6* , Kenichiro Hata1*

作者单位：1 日本东京国家儿童健康与发展研究所母婴生物学系；2 日本东京经济大学医学院妇产科；3 日本东京国家儿童健康与发展中心母婴、新生儿和生殖医学中心；4 日本神奈川圣玛丽安娜大学医学院儿科；5 日本东京昭和大学医学院妇产科；6 日本东京国家儿童健康与发展研究所发育基因组学实验室。

摘要

背景：为了避免因母体抗胎儿 Rh 抗原的同种抗体引起的胎儿和新生儿溶血病，日本的 RhD 阴性孕妇常规注射抗 D 免疫球蛋白。使用细胞游离 DNA 进行胎儿 RHD 基因分型可防止不必要的抗体注射；然而，目前检测 RHD 缺失的基于 PCR 的方法，在没有额外检查的情况下，无法解决非白人

人群中较高频率的 RHD 阳性 D 抗原阴性等位基因。

方法：我们开发了一种扩增子测序方法，检测日本人群中的 4 个主要 RHD 等位基因：D 抗原阳性等位基因（RHD*01，92.9%）和 3 个 D 抗原阴性等位基因（RHD*01N.01，6.6%；RHD*01EL.01，0.3%；RHD*01N.04，0.1%），可以使用从孕妇血浆中获得的细胞游离 DNA 来估计父亲遗传的胎儿 RHD 等位基因型。

结果：即使 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，该方法也能正确确定胎儿 RhD 类型。

结论：该方法是一种可靠的无创性胎儿 RHD 基因分型方法，适用于日本和其他东亚人群。使用同一引物对扩增两个不同区域，并在随后的映射过程中通过序列差异对其进行区分的基因分型原理，在理论上也适用于非洲人中普遍存在的 RHD 阳性 D 抗原阴性等位基因。因此，该方法提供了一个机会，考虑东亚和非洲国家 RhD 阴性孕妇的抗 D 免疫球蛋白的靶向管理，并提高在几个欧洲国家中实施的胎儿 RHD 基因分型的特异性。

1 引言

Rh 血型系统是人类血型中最具多态性的，并且在输血医学中具有仅次于 ABO 的临床意义（1）。在产科中也具有临床重要性，因为针对 Rh 抗原的同种抗体构成胎儿和新生儿溶血病的主要原因。在 Rh 抗原中，D 抗原是最高免疫原性的。D 抗原阴性表型（RhD 阴性）频率在白人中约为 15%，在非洲人中约为 8%，在东亚人中 <1%（2）。RhD 阴性个体不产生 D 抗原，因此在输注 RhD 阳性红细胞或携带 RhD 阳性胎儿时产生抗 D 抗体（3）。值得注意的是，抗 D 导致的严重溶血性疾病可导致胎儿死亡（4）。

产后和产前注射抗 D Ig 预防策略的全球范围的引入，已经极大地减少了 RhD 阴性孕妇的 D 抗原同种免疫（3）。虽然证明是安全的，但作为人类来源的混合产品，抗 D Ig 伴随着理论感染风险，且其生产取决于供体的可获得性（5）。因为当 RhD 阴性妇女携带 RhD 阴性胎儿时不会发生 D 抗原同种免疫，所以胎儿 RHD 基因分型可以防止不必要的抗 D 施用。

Rh 抗原由进化上的祖先基因和重复基因 RHD 和 RHCE 编码，RHD 和 RHCE 以尾对尾方向位于染色体 1p36.1 上 200kb 基因组区域内（1）。两个基因均包含 10 个外显子，并具有高度同源的序列。定义为上游和下游 Rh 盒子的 5'上游和 3'下游 RHD 基因区域显示 98.6%的序列同一性（6）。在白人，RhD 阴性表型最常见的分子原因是 RHD 基因缺失，RHD 阳性 D 抗原阴性等位基因非常罕见（例如德国人群中为 0.6%）（补充表 1）（7）。然而，RHD-CE-D 等位基因和变异等位基因在非

洲和东亚人群中更普遍。在 177 名非洲 RhD 阴性个体中，RHD 缺失、RHDpsi（假基因）和 RHD-CE-D 频率分别为 43%、43%和 15%（补充表 1）（8）。在日本人（9）、韩国人（10 人）和中国人（11 人）中，单核苷酸变异（c.1227G>A）和 RHD-CE-D 与 RHD 缺失的杂合等位基因的总频率分别为 12%、22%和 25%（补充表 1）。

补充表 1 几个人群中的 D 阴性基因型或等位基因

地区	人群	D 阴性基因型或等位基因	百分比	参考文献
东亚	日本人	缺失/缺失	87.70	Ogasawara et al (9)
		1227G>A/缺失	9.00	
		杂交/缺失	2.90	
		其他	0.40	
	韩国人	缺失/缺失	77.90	Kim et al (10)
		1227G>A/缺失	17.90	
		杂交/缺失	4.20	
		其他	0.00	
	中国人	缺失/缺失	75.20	Gu et al (11)
		1227G>A/缺失	21.20	
		1227G>A/1227G>A	1.20	
		杂交/缺失	1.20	
非洲	南非黑人	其他	1.20	
		缺失	10.00	
		RHD psi	69.00	
		杂交	21.00	
	津巴布韦人	其他	0.00	
		缺失	21.00	
		RHD psi	68.00	
		杂交	11.00	
	加纳人	其他	0.00	Singleton et al (8)
		缺失	23.00	
		RHD psi	62.00	
		杂交	12.00	
非裔美国人	其他	3.00		
	缺失	54.00		
	RHD psi	24.00		
	杂交	22.00		
南非混合人种	其他	0.00		
	缺失	81.00		
	RHD psi	17.00		
		杂交	2.00	

		其他	0.00	
欧洲	德国人	缺失/缺失	99.40	Wagner et al (7)
		其他	0.60	

妊娠期间母体血浆中细胞游离胎儿 DNA (cffDNA) 的发现 (12) 允许无创产前检测 (NIPT) 的开发和实际应用 (13)。随后通过检测缺乏 RHD 基因的 RhD 阴性女性血浆中的 RHD 序列证实了使用母体血浆 cffDNA 的胎儿 RHD 基因分型 (14)。基于 cffDNA 的 NIPT 大规模可行，且最近的荟萃分析得出结论它可用于诊断 (15)。一些欧洲国家已经在全国范围内引入了基于 NIPT 的 RHD 基因分型 (16-20)。然而，该方法基于纯合 RHD 缺失的假设，通过定量 PCR 检测 RhD 阴性女性中胎儿 RHD 基因的存在与否，从而产生非缺失 RHD 基因阳性 RhD 抗原阴性等位基因的假阳性结果，除非进行额外的努力，例如 PCR 检测其他外显子 (21) 和使用 Taqman 探针鉴别等位基因 (22)。目前，对于非洲或东亚遗传背景的 RhD 阴性孕妇，由于这些人群中非缺失 RHD 等位基因频率较高，因此不存在简单、可靠、无创的胎儿 RHD 基因分型方法。这可能部分是由于非白种人群缺乏全国胎儿 RHD 基因分型。

在日本人群中，根据血清学 RhD 阴性个体的 0.5% 频率 (23) 及其隐性遗传模式，假设 Hardy-Weinberg 平衡，估计 RhD 阳性和阴性等位基因频率分别为 93% 和 7%，估计 RhD 阳性等位基因 (RHD*01) 纯合子和杂合子频率分别为 86.4% 和 13.1%。从 3526 名血清学 RhD 阴性日本人的 RHD 基因型中鉴定出三种主要的 RhD 阴性基因型：RHD*01N.01/RHD*01N.01 (87.7%)，RHD*01EL.01/RHD*01N.01 (9.0%) 和 RHD*01N.04/RHD*01N.01 (2.9%)，以及几种次要基因型 (总计 0.4%) (9)。最常见的是 RHD*01N.01，由于上游和下游 Rh 盒子内相同的 902bp 序列之间的重组，缺乏完整的 RHD 基因 (1,6,24)。剩余和融合的 Rh 盒部分称为杂交 Rh 盒 (6)。第二和第三常见的 D 抗原阴性等位基因含有有害的基因组改变。RHD*01EL.01 等位基因，称为“亚洲型”DEL (25)，在外显子 9 的最后一个核苷酸处发生单核苷酸变异 (c.1227G>A)，这可能会破坏正常剪接 (26)。在 RHD*01N.04 [RHD*D-CE(3-9)-D] 等位基因，RHD 外显子 3-9 被 RHCE 外显子 3-9 取代 (26)。

在这项研究中，使用日本人作为群体模型 (因为 RhD 阴性日本人群 RHD 阳性等位基因频率高，补充表 1)，我们的目标是使用母体细胞游离 DNA (cfDNA) 开发一种非侵入性胎儿 RHD 基因分型策略，无论母亲或胎儿是否携带 RHD 阳性 D 抗原阴性等位基因，都可以准确估计胎儿 RhD 表型。基于新一代测序 (NGS) 的扩增子测序已应用于各种靶标的非侵入性产前基因分型，如单基因疾病的致病基因 (27)，血小板抗原等位基因 (28) 和 Kell 血型系统 KEL1/2 单核苷酸多态性 (29)。

我们使用 NGS 技术来区分东亚人群中的 4 个主要 RHD 等位基因。

2 材料和方法

2.1 伦理声明

本研究方案，包括参与者招募、样本采集和准备以及基因数据分析，由国家儿童健康与发展中心（NCCHD）（批准号：6991545）和昭和大学（批准号：233）研究伦理委员会批准。

2.2 血液样本采集和 DNA 提取

日本红十字会根据其捐赠血液用于研究和开发的指南提供用于 RHD 基因分型的全血样品。提供了居住在日本的个人捐献的剩余血液，包括 100 例血清学 RhD 阴性和 10 例血清学 RhD 阳性。2014 年 4 月至 2018 年 3 月期间去 NCCHD（日本东京）的血清学 RhD 阴性孕妇（n=24）被招募为制备 cfDNA 的血液供者。收集前由临床遗传学家进行遗传咨询。已获得所有参与者的书面知情同意。

DNA 提取程序：将全血（5mL）收集到 EDTA-2K 管中并离心（1400g，10 分钟，4℃）。将得到的血浆、白膜层和红细胞组分分离并立即-20℃ 冷冻直至用于 DNA 提取。参与者分娩后，将 5 mL 脐血收集到 EDTA-2K 管中。使用 Mag MAX Cell-Free DNA Isolation Kit (Qiagen) 从 800μL 血浆提取 cfDNA。使用 QIASymphony (Qiagen) 从 JRCS 血液样本、白膜层样本（来自参与母亲的血液）或新生儿脐血样本中提取基因组 DNA。

2.3 RhD 阴性和阳性个体的基因分型

设计 PCR 基因分型以检测根据之前的大规模研究（9）预计的日本人群 3 种主要 RhD 阴性基因型（RHD*01N.01/RHD*01N.01，RHD*01.04/RHD*01N.01 和 RHD*01EL.01/RHD*01N.01）和 2 种 RhD 阳性基因型：RHD*01/RHD*01 和 RHD*01/RHD*01N.01。PCR 引物根据先前报道（9）或新设计（补充表 2）。

基因分型 PCR：用 50ng 模板基因组 DNA 在 20μL 反应体系中使用 Ex Taq HS DNA 聚合酶（RR006A，TaKaRa）进行 PCR 扩增，循环条件为：98℃ 变性 20 s；，98℃ 10 s，60℃ 或 64℃ 30 s，72℃ 30 s，35 个循环；72℃ 延伸 2 分钟。引物序列见补充表 2。

Sanger 测序：使用 Ex Taq HS DNA 聚合酶，通过引物 RHbox_KN_F1/R1 和 RHD/RHCE_exon_9_KN_F1/R1 分别扩增 PCR 产物，循环条件如下：98℃ 初始变性 20 s；98℃ 10 s，62℃ 30 s，72℃ 30 s，35 个循环；72℃ 2 分钟。使用 BigDye Terminator v3.1 循环测序试剂盒（美国

ABI) 进行测序反应，使用 BigDye XTerminator 纯化试剂盒 (ABI) 进行纯化。使用 3130xl 基因分析仪 (ABI) 进行测序。

补充表 2 PCR 引物列表

靶区域	引物名	引物序列 (5'→3')	备注
<i>RHD</i> exon 7	D7-F	CTGCTTAACATCCTACAGTA	
	D7-R	CTGTGTTTGTGGGATCACAA	
<i>RHD</i> exon 8	DCE8-F	TACTGACACCGACAGTCCTT	文献报道的引物
<i>RHCE</i> exon 8	DCE8-R	TGCTGTGTCTCTGGCAATGGT	
<i>RHD</i> exon 9	D9-F	CGTTTTGACACACAATATTTTC	(Ogasawara et al (9))
	D9-R	CAGCAAGTCAACATATATACT	
<i>RHD</i> exon 10	D10-F	TGTAATGAGACATTTAGGCT	
	D10-R	TCAACTCCATTTTCTCTGACT	
杂交 Rh 盒	5'BOX-F	CGAAGGTTTCCAAACCCCAA	
	3'BOX-R	TCTTTTCTGGCCTTAACATC	
<i>RHD</i> exon 9	c.1227G>A-F	GCATTTAAACAGGTTTGCTCCT	本研究设计的引物
	c.1227G>A-R	CCTGCAATGCTCCTTACTCC	
上游 Rh 盒	RHbox_KN_F1	TAATATGGGTGGCTGGCTTT	用于扩增子测序
下游 Rh 盒	RHbox_KN_R1	CATGCTTAATTTGTCATTCTTTAC	
<i>RHD</i> exon 9	RHD/RHCE_exon_9_KN_F1	AAAATATGGAAAGCACCTCATG	用于扩增子测序
<i>RHCE</i> exon 9	RHD/RHCE_exon_9_KN_R1	ACTCATAAACAGCAAGTCAACATA	
		TATAC	

2.4 PCR 扩增子接头连接和 MiSeq NGS

以 1000pg cfDNA 为模板，在 Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer (NEB) 中，使用 RHbox_KN_F1/R1 引物或 RHD/RHCE_exon_9_KN_F1/R1 引物 (图 1) 分别获得扩增子，循环条件：98°C 变性 30 秒，然后进行 30 个扩增循环 (98°C 10 秒，62°C 3 秒，72°C 5 秒)。使用 Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) 纯化所得的 PCR 产物。接下来，混合来自同一个体的这两种 PCR 产物 (各 500 pg)，并使用 NEB Next Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina 根据制造商方案进行文库制备，在末端修复和接头连接时将反应体积改为三分之一，并改为 6 个 PCR 扩增循环。使用 MiSeq Reagent Kit v2 Nano 在 MiSeq 平台 (Illumina) 上对所得文库进行配对末端测序 (151bp × 2)。

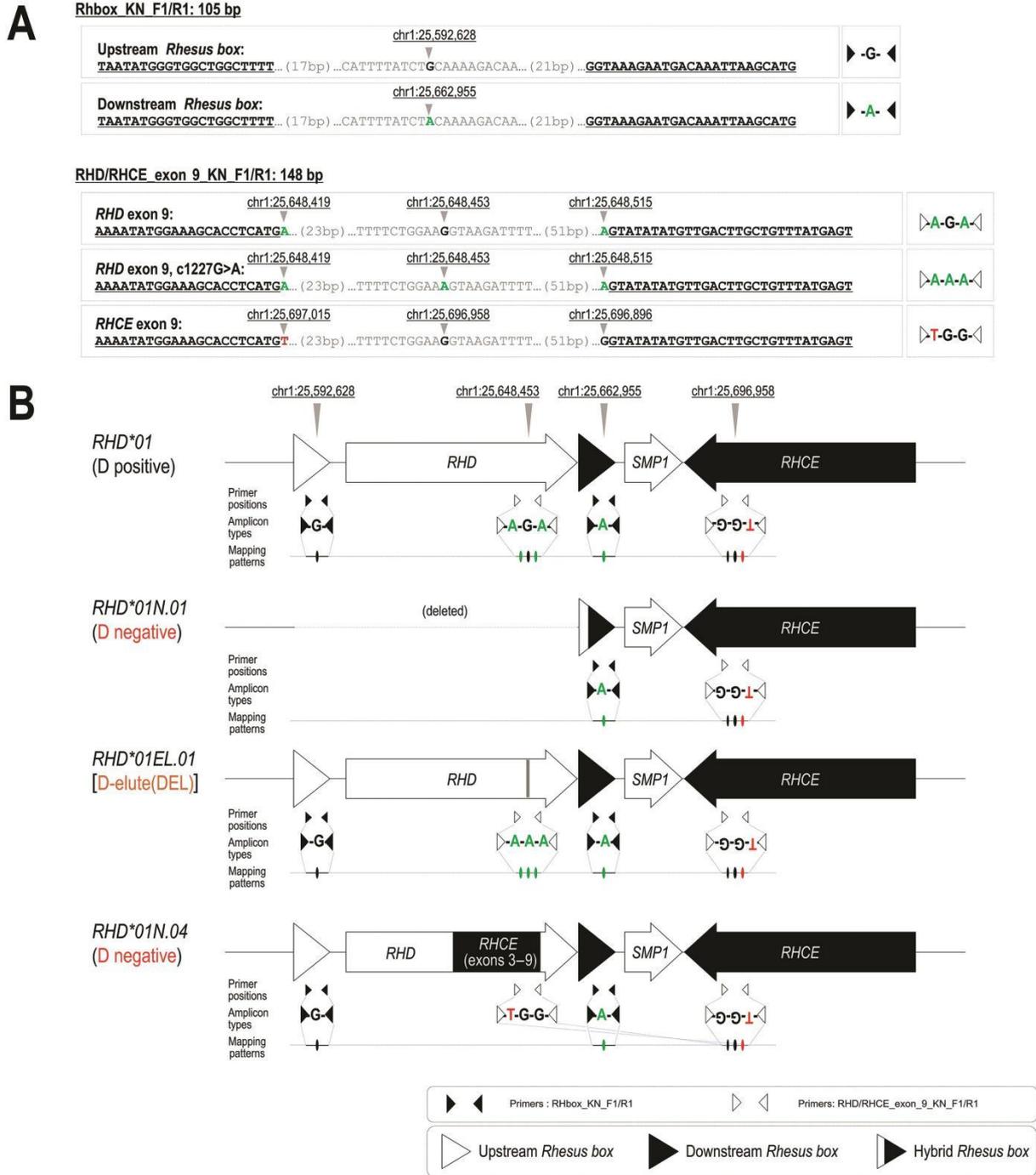


图 1 PCR 引物，用于通过基于扩增子测序的基因分型区分 D 抗原阳性和阴性等位基因。（A）通过引物 RHbox_KN_F1/R1 和 RHD/RHCE_Exon9_F1/R1 扩增的 PCR 扩增子序列。对应于引物位置的核苷酸用下划线和粗体标出。引物 RHbox_KN_F1/R1 扩增来自上游和下游 Rh 盒的 105bp 片段。这两种扩增子可以通过 105bp 产物的第 49 个碱基处的 G 和 A 的序列差异来区分。引物 RHD/RHCE_Exon9_F1/R1 扩增来自 RHD 外显子 9 和 RHCE 外显子 9 的 148bp 片段。这两种扩增子可以通过 148bp 产物的第 23 和第 119 个碱基处的序列差异来区分：分别为 A 和 T，以及 A 和 G。在 RhD 阴性 RHD*01EL.01 等位基因，由于 c.1227A>G 变异，来自 RHD 基因座的 148bp 扩增子的第 54 个碱基是 A 而不是参考基因组中的 G。右图代表 PCR 引物（RHbox_KN_F1/R1，实心三角形；RHD/RHCE_Exon9_F1/R1，空心三角形）和用于区分扩增子类型的核苷酸。显示了用于区分扩增子类型的核苷酸的 hg19 坐标。（B）图示 D 抗原阳性等位基因 RHD*01 和 3 个 D 抗原阴性等位基因

的基因组结构、PCR 引物杂交的位置、扩增子类型以及每种类型扩增子预期比对的基因组区域。RHD、SMP1 和 RHCE 基因用箭头表示。上游和下游 Rh 盒分别显示为空心 and 实心箭头。RHD*01EL.01 等位基因的 RHD 基因中的灰色垂直条表示 c.1227A>G 变异的位置（在 chr1:25648453）。

2.5 数据分析（质量控制、映射和 read 计数）

用 MiSeq Reporter 软件版本 2.3.32（Illumina）、samtools 版本 1.6（<https://sourceforge.net/projects/samtools/>）和 Integrative Genomics Viewer（IGV；<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>）进行序列分析。使用 MiSeq Reporter 为每个文库生成 fastq 文件，修剪接头序列，并将序列 reads 映射到人类参考基因组（hg19）。从生成的 bam 文件，使用 samtools 删除映射分数 ≤ 20 和含有碱基质量分数 ≤ 25 的碱基的 reads。使用 IGV 查看过滤后的 bam 文件，检查 4 个预期基因组区域（上游/下游 Rh 盒，RHD 外显子 9 和 RHCE 外显子 9）中每一个的映射 read 计数以及野生型和变异（c.1227G>A）等位基因的 read 计数。

3 结果

3.1 RhD 阴性和阳性日本人的基因分型

为了确认日本人群中 RHD 阴性基因型频率并鉴定具有 3 种主要 RhD 阴性基因型的个体，我们使用报道的（9）和新设计的引物（补充表 2）对 100 例血清学 RhD 阴性个体进行基因分型。结果发现，87 例 RHD*01N.01/RHD*01N.01（缺失/缺失），9 例 RHD*01EL.01/RHD*01N.01（c.1227G>A/缺失）和 4 例 RHD*01N.04/RHD*01N.01[RHD*D-CE(3-9)-D/缺失]基因型，与报道的频率一致（9）。我们还对 3 例 RhD 阳性个体进行了基因分型，鉴定了 2 例 RHD*01/RHD*01（野生/野生）和 1 例 RHD*01/RHD*01N.01（野生/缺失）。

3.2 用于区分 D 抗原阳性和阴性等位基因的基因组序列的选择

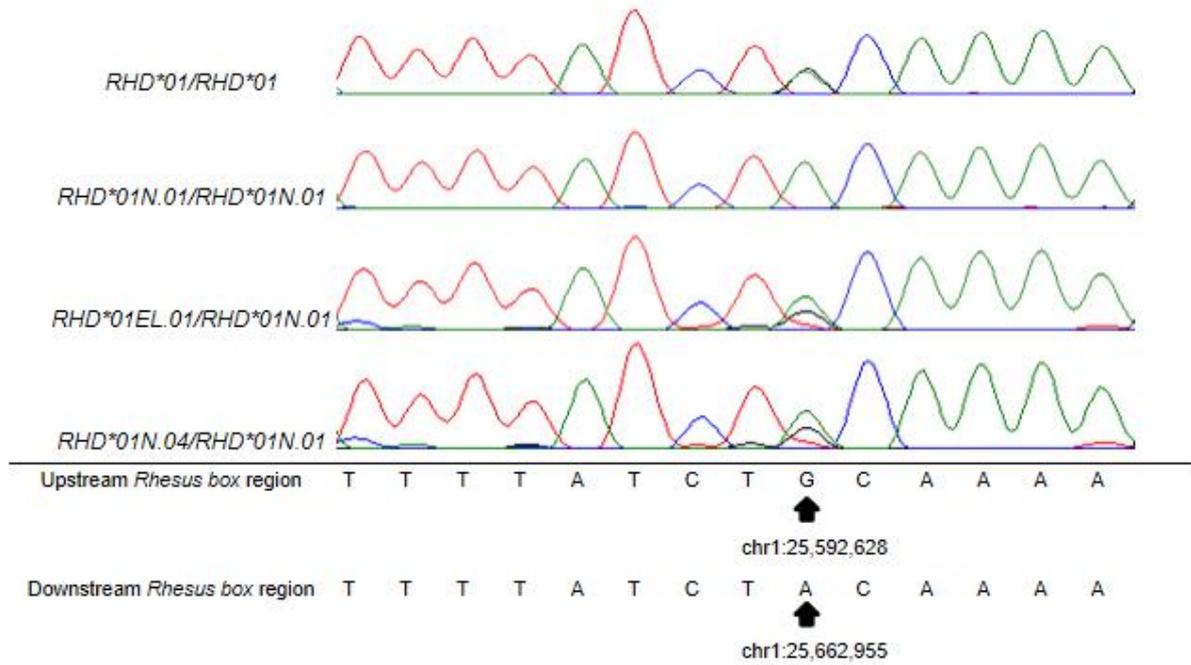
除了高 Rh 盒序列相似性（98.6%）（6）外，RHD 和 RHCE 基因组序列 96%相同，并被认为在灵长类动物进化过程中具有重复性（30）。重复区域的这种高序列相似性经常阻碍特定基因组区域的 PCR 扩增，但允许设计与 2 个同源区域完全匹配的引物以同时扩增这 2 个区域。为了将基于 NGS 的扩增子测序应用于来自 RHD/RHCE 基因座的这种 PCR 扩增子，我们设计了 PCR 引物 RHbox_KN_F1/R1，其序列与上游和下游 Rh 盒完全匹配并扩增来自两个区域的 105bp 扩增子。单个扩增子可以通过第 49 个碱基处的单核苷酸差异来区分，对应于 hg19 核苷酸位置 chr1:25592628（G，上游）和 chr1:25662955（A，下游）（图 1）。我们还设计了 PCR 引物 RHD/RHCE_exon_9_KN_F1/R1，

其扩增来自 RHD 和 RHCE 基因座的 148bp 扩增子，其中正向和反向引物序列分别与两个基因的外显子 9 和内含子 9 序列完全匹配。这些靶区域包含 2 个核苷酸差异，分别在扩增子的第 23 和第 119 个碱基处：在 chr1:25648419 处的 A 和在 chr1:25697015 处的 T，以及在 chr1:25648515 处的 A 和在 chr1:25696896 处的 G。RHD 基因座靶区域还包含 RHD*01EL.01 等位基因，第 54 个碱基处单核苷酸变异 (c.1227G>A)，对应于 chr1:25648453 (图 1)。使用 Sanger 测序，我们证实获得的 PCR 产物含有来自 2 个基因座的扩增子，通过核苷酸位置处的预期单峰或混合峰进行等位基因鉴别 (补充图 1)。预计这 2 种 PCR 产物的 NGS 和所得 reads 在参考基因组的映射通过其映射模式和映射 read 数比率 (补充图 2) 区分 4 种主要 RhD 阳性和 3 种主要 RhD 阴性基因型 (9) (表 1)。通过考虑 4 个父系遗传等位基因和 3 个母系 RhD 阴性基因型 (5 个可能的母系遗传模式) 的所有可能的 20 种组合 (补充图 3)，我们确定相同的策略也可用于使用 RhD 阴性孕妇的 cfDNA 确定胎儿 RHD 基因型。

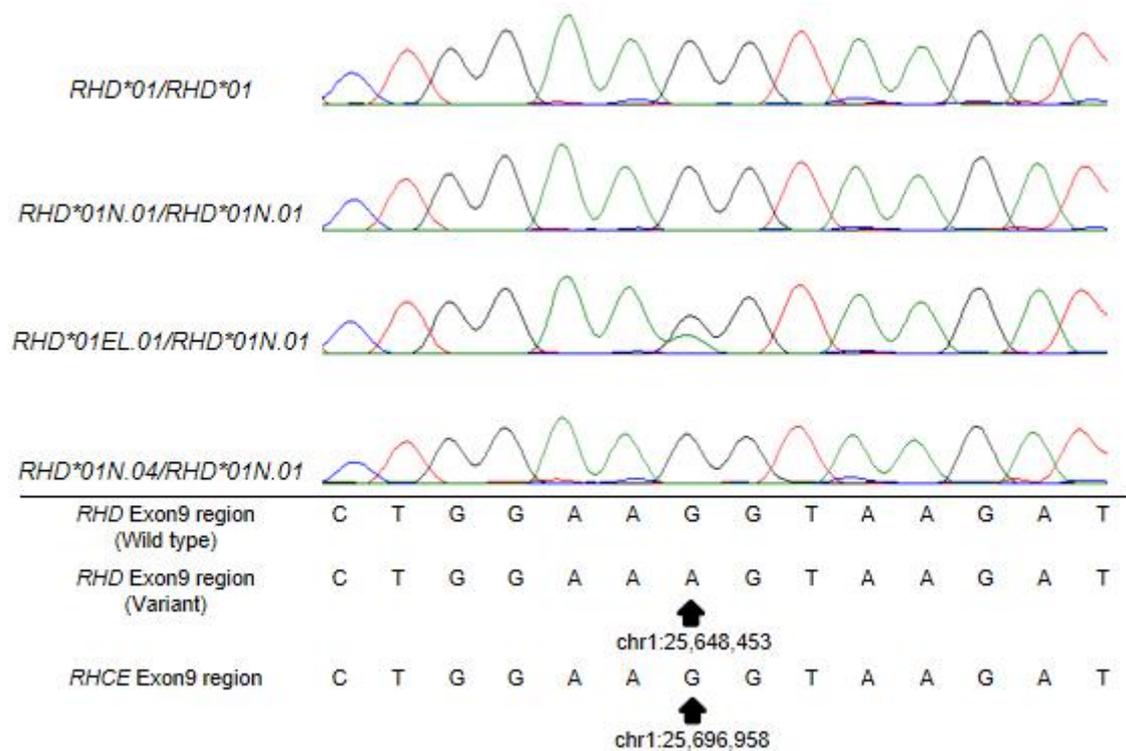
表 1 日本人群中 RHD 基因型的预期频率

Genotype	Expected frequencies	
	Among the Japanese population, %	Among the RhD-negative individuals, %
RhD-positive genotypes		
4 major RhD-positive genotypes	<i>RHD*01/RHD*01</i> <i>RHD*01N.01/RHD*01</i> <i>RHD*01EL.01/RHD*01</i> <i>RHD*01N.04/RHD*01</i>	86.36 13.14 12.31 0.59 0.19
Others		0.05
RhD-negative genotypes		
3 major RhD-negative genotypes	<i>RHD*01N.01/RHD*01N.01</i> <i>RHD*01EL.01/RHD*01N.01</i> <i>RHD*01N.04/RHD*01N.01</i>	0.50 0.439 0.045 0.015 0.002
Others		0.4

A



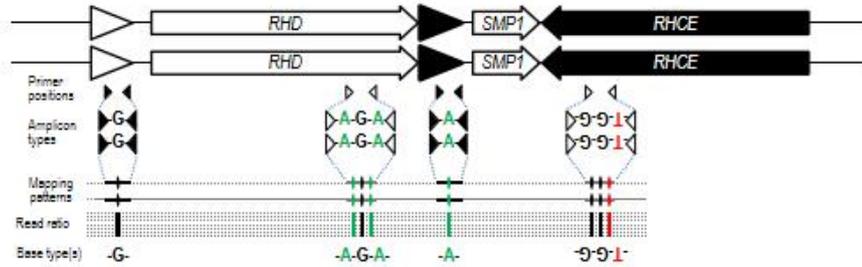
B



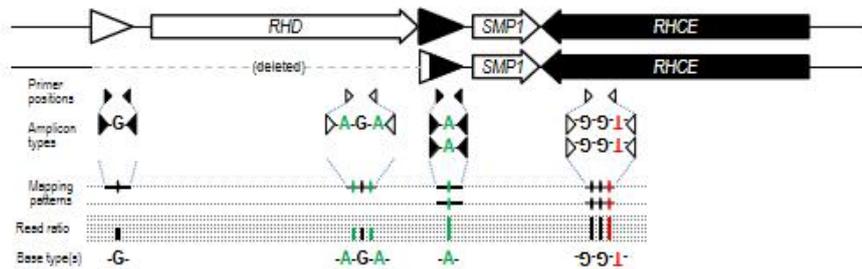
补充图 1 使用来自代表性 RHD 基因型的引物 RHbox_KN_F1/R1 (A) 和 RHD/RHCE_exon_9_KN_F1/R1 (B) 获得的混合扩增子的 Sanger 测序验证。

A

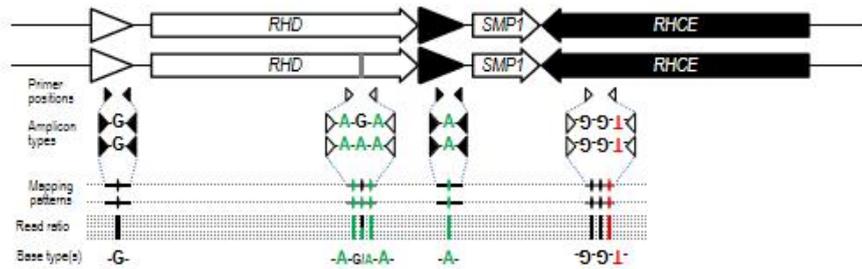
*RHD*01/RHD*01*
(D positive)



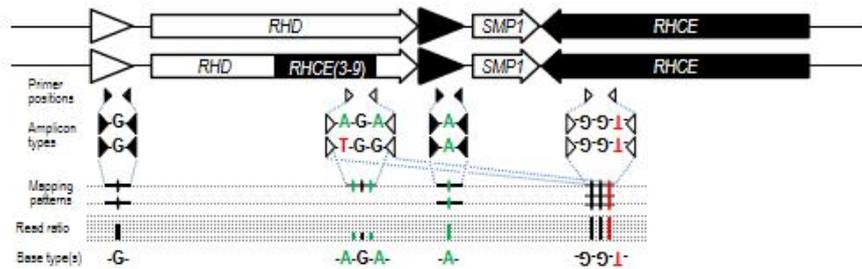
*RHD*01/RHD*01N.01*
(D positive)



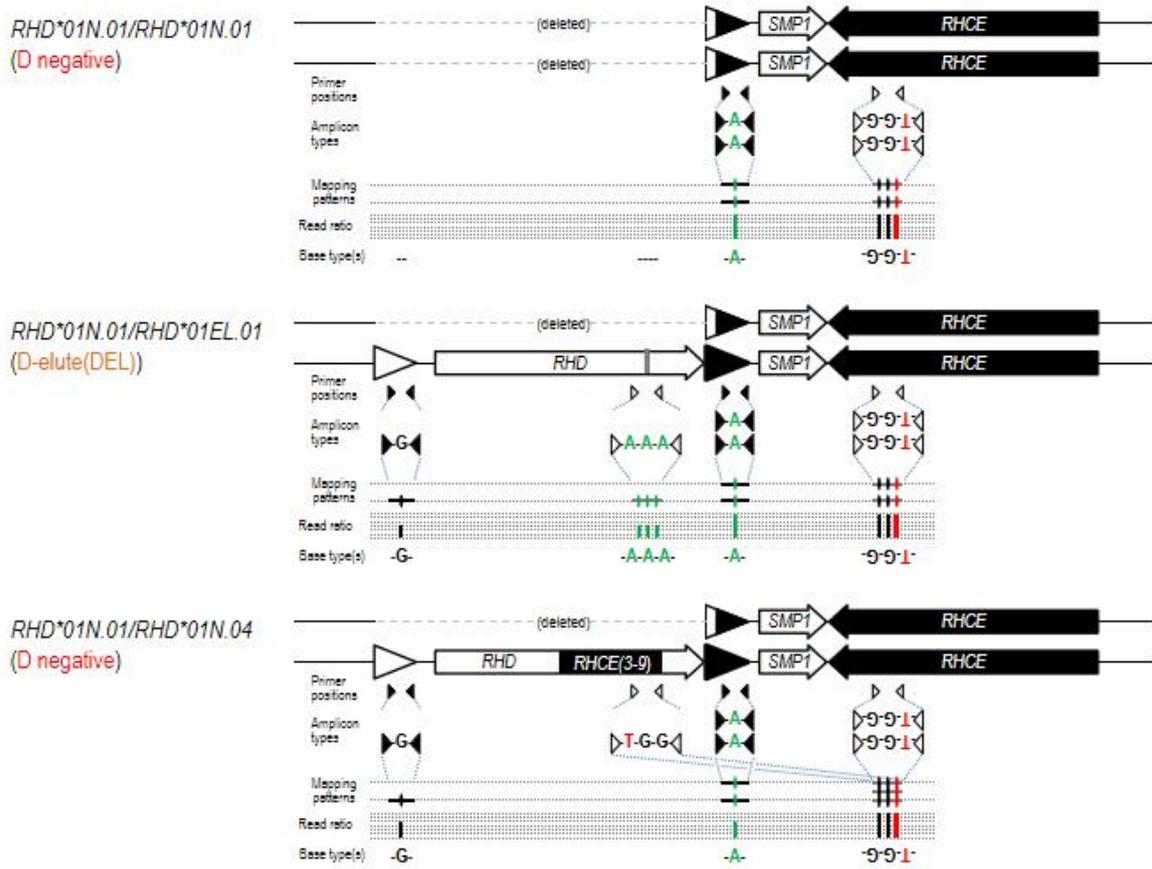
*RHD*01/RHD*01EL.01*
(D positive)



*RHD*01/RHD*01N.04*
(D positive)



B



补充图 2 使用引物 RHbox_KN_F1/R1 和 RHD/RHCE_exon_9_KN_F1/R1 对四种主要 RhD 阳性 (A) 和三种主要 RhD 阴性 (B) 基因型进行基于扩增子测序的基因分型的预期扩增子类型和映射模式

Mother's RHD genotype	Maternally Inherited fetal RHD allele	Paternally inherited fetal RHD allele			
		RHD*01 (+)	RHD*01N.01 (del)	RHD*01EL.01 (s.n.v.)	RHD*01N.04 (hyb)
RHD*01/RHD*01 (D positive)	RHD*01 (+)				
RHD*01N.01/RHD*01N.01 (D negative)	RHD*01N.01 (del)				
RHD*01N.01/RHD*01EL.01 (D-elute)(DEL)	RHD*01N.01 (del)				
	RHD*01EL.01 (s.n.v.)				
RHD*01N.01/RHD*01N.04 (D negative)	RHD*01N.01 (del)				
	RHD*01N.04 (hyb)				

补充图 3 使用引物 RHbox_KN_F1/R1 和 RHD/RHCE_exon_9_KN_F1/R1 对孕妇细胞游离 DNA 进行基于扩增子测序的基因分型的预期扩增子类型和映射模式。母亲 4 种 RHD 基因型（1 种 RhD 阳性和 3 种 RhD 阴性）和 4 种父系遗传的胎儿等位基因导致胎儿 RHD 基因型的 24 种可能组合。在细胞游离 DNA 中母体和胎儿 DNA 比例为 5:1 的情况下，使用 10 行和 2 行分别显示来自母体和胎儿的扩增子类型。来自母亲 RHD 等位基因的预期扩增子类型如下所示：“-G-”和“-A-”分别代表来自上游和下游 Rh 盒的引物 RHbox_KN_F1/R1 产生的扩增子；“-A-G-A-”和“-A-A-A-”分别代表来自 RHD*01（野生型）和 RHD*01EL.01（c.1227G>A）等位基因的 RHD 外显子 9 的引物 RHD/RHCE_exon_9_KN_F1/R1 产生的扩增子；“-T-G-G-”代表来自 RHCE 外显子 9 的扩增子。从 RHD*01N.04 等位基因，引物 RHD/RHCE_exon_9_KN_F1/R1 扩增来自两个基因座（RHD-CE-D 杂交基因座和 RHCE 基因座）的 PCR 产物。D 抗原阳性等位基因（RHD*01）和 3 个 D 抗原阴性等位基因（RHD*01N.01, RHD*01EL.01, RHD*01N.04）用“+”表示阳性，“del”表示缺失，“s.n.v.”表示单核苷酸变异，“hyb”表示杂交。浅黄色背景的四种组合对应于提示 RhD 阴性母亲 RhD 阳性胎儿的预期扩增子测序结果；浅蓝色背景的 16 种组合对应于提示 RhD 阴性母亲 RhD 阴性胎儿的预期扩增子测序结果。

3.3 用于区分 RhD 阳性和阴性基因型的预期和观察扩增子比率的比较

我们对含有 RhD 阳性基因型（RHD*01/RHD*01）和 3 种 RhD 阴性基因型（RHD*01N.01/RHD*01N.01, RHD*01EL.01/RHD*01N.01, RHD*01N.04/RHD*01N.01）的血液 DNA 样本进行扩增子测序，确认对于每种基因型，映射到上游和下游 Rh 盒以及映射到 RHD 外显子 9 [野生 (wt) 或变异 (var)] 和 RHCE 外显子 9 的 read 数观察比率与预期比率一致（图 2 和表 2）。我

们随后以 10:1 的比例检查来自 2 个个体（A 和 B）的基因组 DNA 混合物的映射 read 数，作为血清学 RhD 阴性孕妇 cfDNA 的近似模型，其中“A”对应于母亲，是 3 个 RhD 阴性基因型之一；“B”对应于胎儿，是 4 个 RhD 阳性或阴性基因型之一。虽然 RhD 阴性女性携带的胎儿基因型不可能是 RHD*01/RHD*01，但我们使用 RHD*01/RHD*01 而不是 RHD*01/RHD*01N.01，因为后者基因型的基因组 DNA 最初不可获得。对于模拟含有 9.1% 胎儿 DNA 的母体 cfDNA 的 12 个 A 和 B 组合，我们进行基于扩增子的 RHD 基因分型并获得与预期相似的扩增子比率（补充表 3）。我们还通过获得 RHD*01EL.01/RHD*01N.01 和 RHD*01/RHD*01N.01 基因组 DNA 混合物（后者有 5 种比例：20%，10%，5%，3%和 1%）的数据，评估了基于扩增子的 RHD 基因分型中胎儿 DNA 检测的灵敏度和定量准确性（补充表 4）。在所有混合物中都检测到来自 RHD*01 等位基因的扩增子。RHD*01 等位基因的预期和观察到的扩增子比率显示出高度相关性（1%–20%）。在评估基于扩增子测序的非侵入性胎儿基因分型方法检测 RHD 基因阳性 D 抗原阴性等位基因的可行性和准确性时，我们意外地观察到一些样本（低频，0.08%–11.9%）RHD 外显子 9 扩增子中 chr1:25648439 处存在 C 到 T 转换。但是，在相同样品的重复数据集之间，这种核苷酸变化的频率不一致。当我们重复相同样品组的扩增子测序分析，使用 Ex TaqHS（TaKaRa）而不是 Phusion High-Fidelity PCR Master Mix 对接头连接的文库扩增时，未观察到 chr1:25648439 处的 C 到 T 转换（数据未显示）。因此，我们得出结论，该现象是文库扩增过程中产生的假象，在我们随后的分析中不予考虑。

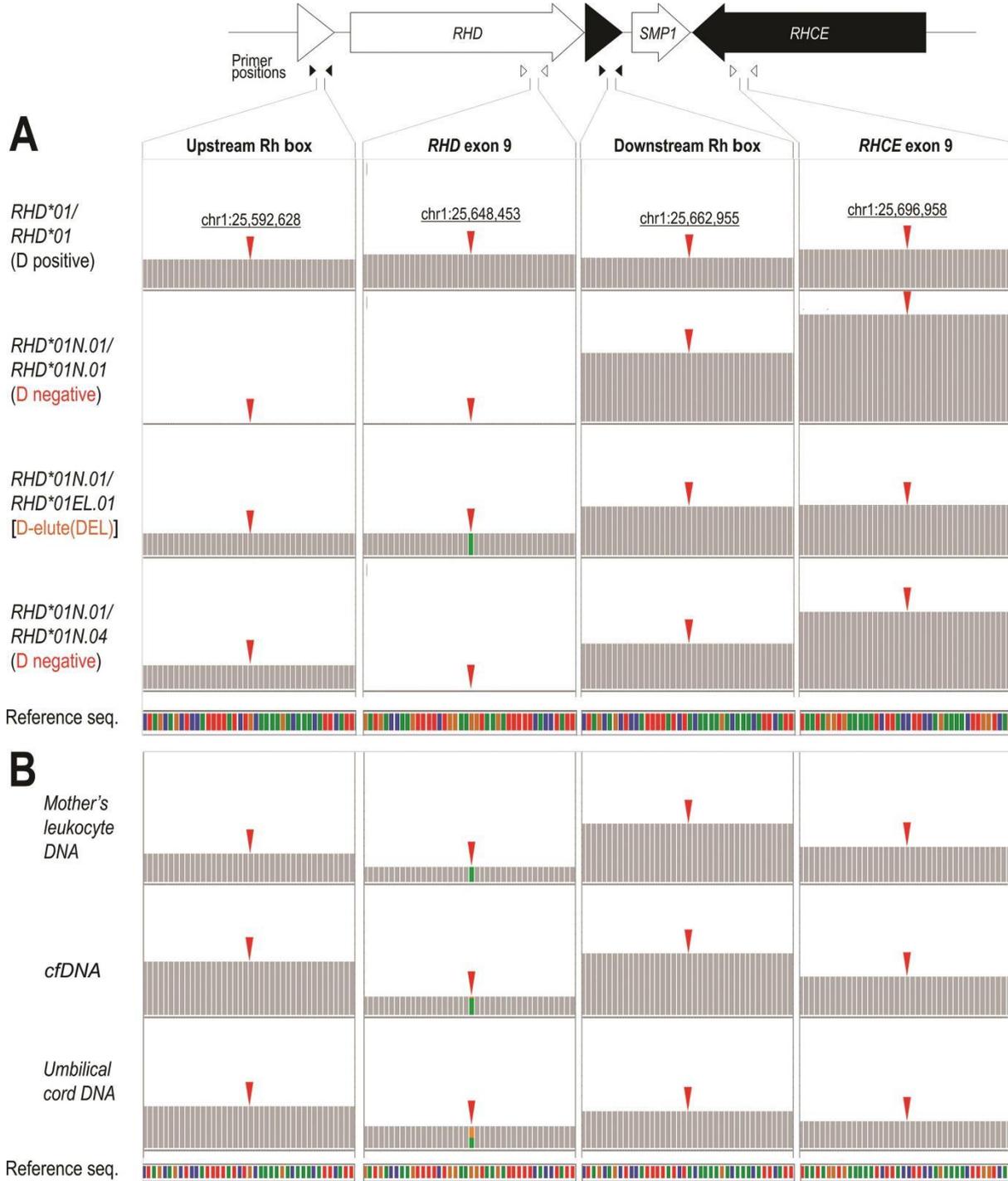


图 2 来自 4 个基因组基因座（上游 Rh 盒、RHD 外显子 9、下游 Rh 盒和 RHCE 外显子 9；对应于从左到右的 4 列）的扩增子的映射 read 数和核苷酸的实例。由 IGV 可视化的每个映射结果（.bam 文件）的 bam 覆盖轨迹图像显示为 4 个区域（每个扩增子区域 41 bp）。在 bam 覆盖轨迹中，对于每个核苷酸位置，参考序列和变异序列的比例用颜色编码：参考核苷酸为灰色，变异核苷酸为蓝色（C）、绿色（A）、红色（T）或橙色（G）。每个核苷酸位置的柱高与映射 reads 数成比例。所有图的数据范围设置为 0 到 50000。红色垂直箭头分别显示 4 列的 chr1:1:25592628, chr1:25648453, chr1:25662955 和 chr1:25696958 的核苷酸位置。图 1 示基于这些核苷酸位置处的序列差异区分相同引物对扩增的 2 种 PCR 扩增子的原理。（A）RhD 阳性和 3 个 RhD 阴性基因型的结果。（B）案例 4 的结果（表 3）。在细胞游离 DNA chr1:25648453 处除了 A（绿色）之外还存在 G（橙色）表明胎儿从父亲遗传了 RhD

阳性等位基因，因此是 RhD 阳性的。

表 2 来自 RhD 阳性和阴性基因型个体的扩增子的预期和观察比率

RHD genotype	Amplicons from Rhesus boxes (primers: RHbox_KN_F1/R1)				Amplicons from RHD/RHCE exon 9 (primers: RHD/RHCE_exon_9_KN_F1/R1)			
	Copy number/cell				Copy number/cell			
	Upstream Rhesus box (G at chr1: 25,592,628)	Downstream Rhesus box (A at chr1: 25,662,955)	Expected ratio Upstream/downstream	Observed ratio (and counts) Upstream/downstream	RHD (wt/var) (G/A at chr1: 25,648,453)	RHCE (G at chr1: 25,696,896) (T at chr1: 25,697,015)	Expected ratio RHD_wt/RHD_var/RHCE	Observed ratio (and counts) RHD_wt/RHD_var/RHCE
RHD*01/RHD*01 (D positive)	2	2	50.0%/50.0%	49.3%/50.7% (11 126/11 423)	2 wt	2	50.0%/0.0%/50.0%	46.1%/0.0%/53.9% (12 698/0/14 818)
RHD*01N.01/RHD*01N.01 (D negative)	0	2	0.0%/100%	0.02%/99.98% (7/25 695)	0	2	0.0%/0.0%/100%	0.007%/0.0%/99.9% (3/0/40 184)
RHD*01N.01/RHD*01EL.01 (D negative)	1	2	33.3%/66.6%	32.2%/67.8% (8653/18 189)	1 var	2	0.0%/33.3%/66.6%	0.01%/31.2%/68.8% (3/8638/19 069)
RHD*01N.01/RHD*01N.04 (D negative)	1	2	33.3%/66.6%	34.0%/66.0% (8981/17 441)	0	3	0.0%/0.0%/100%	0.0%/0.003%/99.9% (0/1/29 159)

补充表 3 来自基因组 DNA (A 和 B) 的 10:1 混合物的 12 种组合的扩增子的预期和观察比率

混合样本的基因型 (A:B = 10:1)	来自 Rh 盒的扩增子 (引物: RHbox_KN_F1/R1)				来自 RHD/RHCE exon 9 的扩增子 (引物: RHD/RHCE_exon_9_KN_F1/R1)			
	A 和 B 中每个细胞拷贝数		从 A 和 B 混合物 (10:1) 获得的映射 reads 的比率		A 和 B 中每个细胞拷贝数		从 A 和 B 混合物 (10:1) 获得的映射 reads 的比率	
	上游 Rh 盒 (chr1: 25,592,628 处 G)	下游 Rh 盒 (chr1: 25,662,955 处 A)	预期比率 (上游/下游)	观察比率 (上游/下游)	RHD (wt/var) (chr1: 25,648,453 处 G/A)	RHCE (chr1: 25,696,896 处 G) (chr1: 25,697,015 处 T)	预期比率 (RHD_wt / RHD_var / RHCE)	观察比率 (RHD_wt / RHD_var / RHCE)
1 RHD*01/RHD*01	A: A: 0 A: 2		6.2% /		A: 0 A: 2		8.3% / 0.0%	8.7% /
	B: 2 B: 2		93.8%	(1,20	B: 2 wt B: 2		/ 91.7%	0.01% /
2 RHD*01/RHD*01	A: A: 1 A: 2		31.5% /		A: 1 A: 2		5.8% / 29.4% /	5.8% /
	B: 2 B: 2		68.5%	(8,35	var B: 2		64.7%	27.8% /
			35.3% /		B: 2 wt			66.4%
			64.7%	(9 /				17 /
				18,216)				10,264

								/
								24,519
)
A:	A: 1	A: 2		A: 0	A: 3	5.8% / 0.0%	4.1% /	
<i>RHD*01N.01/RHD</i>	B: 2	B: 2		B: 2 wt	B: 2	/ 94.2%	0.0%	
<i>*01N.04</i>			34.1% /				/ 95.9%	
B:			65.9%				(1,6	
3 <i>RHD*01/RHD*01</i>			35.3% /				51 /	
			64.7%				0	
							/	
			20,596)				39,073	
)	
A:	A: 0	A: 2		A: 0	A: 2	0.0% / 0.0%	0.0% /	
<i>RHD*01N.01/RHD</i>	B: 0	B: 2		B: 0	B: 2	/ 100%	0.0% /	
<i>*01N.01</i>			0.0% /				100%	
4 B:			100.0%				(
<i>RHD*01N.01/RHD</i>							0 /	
<i>*01N.01</i>							0 /	
							1,3070)	
							7,727)	
)	
A:	A: 1	A: 2		A: 1	A: 2	0.0% / 31.3% /	0.0% /	
<i>RHD*01N.01/RHD</i>	B: 0	B: 2		var	B: 2	68.7%	32.8% /	
<i>*01EL.01</i>				B: 0			67.2%	
B:							(
5 <i>RHD*01N.01/RHD</i>			31.3% /				0 /	
<i>*01N.01</i>			68.7%				9,079	
							/	
			30,024)				18,586	
)	
)	
A:	A: 1	A: 2		A: 0	A: 3	0.0% / 0.0%	0.004%	
<i>RHD*01N.01/RHD</i>	B: 0	B: 2		B: 0	B: 2	/ 100%	/ 0%	
<i>*01N.04</i>							/	
B:							99.996	
6 <i>RHD*01N.01/RHD</i>			31.3% /				%	
<i>*01N.01</i>			68.7%				(
							1 /	
			22,428				0 /	
)				21,881	
)	
)	
A:	A: 0	A: 2		A: 0	A: 2	0.0% / 4.3% /	0.01% /	
<i>RHD*01N.01/RHD</i>	B: 1	B: 2		B: 1	B: 2	95.7%	2.34% /	
<i>*01N.01</i>			4.3% /	var			97.64%	
7 B:			95.7%				(1	
<i>RHD*01N.01/RHD*</i>							/	
<i>01EL. 01</i>							215	
			21,718)					

							/	
							8,952)	
	A:	A: 1	A: 2		A: 1	A: 2	0.0% / 33.3% /	0.0% /
	<i>RHD*01N.01/RHD</i>	B: 1	B: 2		var	B: 2	66.7%	27.2% /
	<i>*01EL.01</i>			33.7% /	B: 1			72.8%
	B:			66.3%	var			(
8	<i>RHD*01N.01/RHD*</i>			33.3% /				0 /
	<i>01EL.01</i>			66.7%				21,608
								/
								27,953)
								57,893
)
	A:	A: 1	A: 2		A: 0	A: 3	0.0% / 3.3%	0.0% /
	<i>RHD*01N.01/RHD</i>	B: 1	B: 2	26.7% /	B: 1	B: 2	/ 96.7%	2.3% /
	<i>*01N.04</i>			73.3%	var			97.7%
9	B:			33.3% /				(
	<i>RHD*01N.01/RHD*</i>			66.7%				0 /
	<i>01EL.01</i>							13,197
)
								58,139)
	A:	A: 0	A: 2		A: 0	A: 2	0.0% / 0.0%	0.0% /
	<i>RHD*01N.01/RHD</i>	B: 1	B: 2		B: 0	B: 3	/ 100%	0.002%
	<i>*01N.01</i>			7.1% /				/
	B:			92.9%				99.998
1	<i>RHD*01N.01/RHD</i>			4.3% /				%
0	<i>*01N.04</i>			95.7%				(
								0 /
								17,882)
								1 /
								47,380
)
	A:	A: 1	A: 2		A: 1	A: 2	0.0% / 30.3% /	0.01% /
	<i>RHD*01N.01/RHD</i>	B: 1	B: 2		var	B: 3	69.7%	36.1% /
	<i>*01EL.01</i>			31.7% /	B: 0			63.9%
1	B:			68.3%				(8
1	<i>RHD*01N.01/RHD</i>			33.3% /				/
	<i>*01N.04</i>			66.7%				21,976
								/
								9,102)
								38,974
)
	A:	A: 1	A: 2		A: 0	A: 3	0.0% / 0.0%	0.0% /
	<i>RHD*01N.01/RHD</i>	B: 1	B: 2	30.6% /	B: 0	B: 3	/ 100%	0.011%
	<i>*01N.04</i>			69.4%				/
1	B:			33.3% /				99.98%
2	<i>RHD*01N.01/RHD</i>			66.7%				(
	<i>*01N.04</i>							0 /
								10,459)
								6 /

补充表 4 来自 5 种不同比例的 RHD*01N.01/RHD*01EL.01 (A) 和 RHD*01/RHD*01N.01 (B) 混合物的扩增子的预期和观察比率

Ratio	Amplicons from Rhesus boxes (Primers: RHbox_KN_F1/R1)				Amplicons from RHD/RHCE exon 9: (Primers: RHD/RHCE_exon_9_KN_F1/R1)			
	Copy number/cell in A and B		Ratio of mapped reads obtained from the mixture of A and B (10:1)		Copy number/cell in A and B		Ratio of mapped reads obtained from the mixture of A and B (10:1)	
	Upstream Rhesus Box (G at chr1: 25,592,628)	Downstream Rhesus Box (A at chr1: 25,662,955)	Expected ratio (upstream / downstream)	Observed ratio and read counts (upstream / downstream)	RHD (wt/var) (G/A at chr1: 25,648,453)	RHCE (G at chr1: 25,696,896) (T at chr1: 25,697,015)	Expected ratio (RHD_wt/ RHD_var / RHCE)	Observed ratio and read counts (RHD_wt/ RHD_var / RHCE)
A:B = 80:20	A: 1 B: 1	A: 2 B: 2	33.3% / 66.7%	33.8% / 66.2% (16912 / 33067)	A: 1 var B: 1 wt	A: 2 B: 2	6.7% / 26.7% / 66.7%	8.2% / 30.1% / 61.7% (1540 / 5653 / 11591)
A:B = 90:10	A: 1 B: 1	A: 2 B: 2	33.3% / 66.7%	31.3% / 68.7% (8441 / 18538)	A: 1 var B: 1 wt	A: 2 B: 2	3.3% / 30.0% / 66.7%	3.2% / 27.0% / 69.8% (361 / 3139 / 8110)
A:B = 95:5	A: 1 B: 1	A: 2 B: 2	33.3% / 66.7%	30.2% / 69.8% (10483 / 24176)	A: 1 var B: 1 wt	A: 2 B: 2	1.7% / 31.7% / 66.7%	1.3% / 25.6% / 73.1% (152 / 2906 / 8290)
A:B = 97:3	A: 1 B: 1	A: 2 B: 2	33.3% / 66.7%	34.9% / 65.1% (9092 / 16995)	A: 1 var B: 1 wt	A: 2 B: 2	1.0% / 32.3% / 66.7%	0.4% / 26.6% / 73.0% (50 / 3458 / 9507)
A:B = 99:1	A: 1 B: 1	A: 2 B: 2	33.3% / 66.7%	35.1% / 64.9% (10458 / 19310)	A: 1 var B: 1 wt	A: 2 B: 2	0.3% / 33.0% / 66.7%	0.4% / 29.8% / 69.8% (66 / 4969 / 11629)

3.4 使用 8 例 RhD 阴性孕妇 cfDNA 基于扩增子的 RHD 基因分型

我们对 2014-2018 年间在 NCCHD 分娩的 24 名 RhD 阴性孕妇的白细胞 DNA 进行 RHD 基因分型，并选择 8 个不同 RHD 基因型的母亲进行胎儿 RHD 基因分型（表 3）。胎龄为 9-30 周。我们根据映射到 Rh 盒的 reads 比率（上游/下游）和野生 RHD 外显子 9、变异 RHD 外显子 9 和 RHCE 外显子 9（RHD_wt/RHD_var/RHCE）的 reads 比率来估计母体和胎儿 RHD 基因型（表 3）。6 个和 2 个胎儿分别估计为 RhD 阳性和 RhD 阴性。当 RhD 阴性母亲是 RhD 阴性等位基因的复合杂合子时，考虑 2 种可能的胎儿 RHD 基因型，如病例 1、4 和 7 所示（表 3 和图 2）。然而，这并不干扰估计胎儿 RhD 表型为阳性，因为检测到“RhD_wt”型扩增子，比例在 1.3%和 3.1%之间（表 3）。除了使用新生儿外周血进行 RhD 血清学分型外，还分别使用血液 DNA 和脐血 DNA 通过基于扩增子的基因分型来确定母体和新生儿 RHD 基因型。我们证实这些 RHD 基因型和 RhD 血清型都与从扩增子测序数据得到的估计基因型/表型一致。

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.01RHD*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.01RHD*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.01RHD*01N.01 F: RHD*01N.01RHD*01N.01	RHD*01N.01/RHD*01N.01	RHD*01N.01/RHD*01N.01	Negative
6	9w0d	0.0% (negative)	M: RHD*01N.01RHD*01N.01 F: RHD*01N.01RHD*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.01RHD*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)

表 3 RhD 阴性孕妇 cfDNA 基于扩增子测序的基因分型估计的胎儿 RhD 表型，以及 RhD 阴性孕妇 cfDNA、RhD 阴性孕妇白细胞基因组 DNA、脐血 DNA 的比率和 read 数。a 通过使用白细胞基因组 DNA 的扩增子测序确定。b 通过使用脐血基因组 DNA 的扩增子测序确定。c w，周；d，天。

因为 NGS reads 的局限性，在低频率（大多每 10000 个 reads 少于 10 个）的映射序列中发现意外核苷酸序列（表 2 和 3，补充表 3）。据报道，Illumina MiSeq 平台这种 DNA 测序错误约发生在 1×10^{-3} 个核苷酸（31）。通过排除包含碱基质量分数 < 26 的 reads，我们消除了大多数此类测序错误。但是，需要考虑意外核苷酸序列的其他潜在来源，包括 PCR 复制错误、标签跳跃、流动槽中的残留物和 DNA 污染。我们在案例 4 的母亲白细胞 DNA 中的 chr1:25648453 处 19905 个总 reads 中检测到 21 个意外核苷酸序列（表 3）。因为白细胞 DNA 是从妊娠期间获得的带有携带 RHD*01 等位基因的 RhD 阳性胎儿的母亲血液白膜层中提取的，cfDNA 污染可能是意外核苷酸序列较多的原因。我

们基于扩增子的无创 RHD 基因分型准确地估计了 8 例 RhD 阴性孕妇的胎儿 RHD 基因型。

4 讨论

我们开发了一种基于扩增子测序的非侵入性胎儿 RHD 基因分型方法，可以从 D 抗原阳性（RHD*01）和 3 个 D 抗原阴性等位基因（RHD*01N.01，RHD*01EL.01 和 RHD*01N.04）中估计父系遗传的胎儿 RHD 等位基因。RhD 阴性孕妇的胎儿 RHD 基因分型目前在几个国家在全国范围内实施，以减少不必要的抗 D Ig 给药（32）。英国的成本效益分析还得出结论，与向所有 RhD 阴性孕妇提供抗 D 相比，无创胎儿 RHD 基因分型可节省成本（13）。然而，美国、澳大利亚和加拿大的这种估计因胎儿 RHD 基因分型和抗 D Ig 成本估计不同而不同（32）。美国血库协会的一项工作组研究建议，只要在患者中检测到不一致的 RhD 分型结果和/或血清学弱 D 表型，就进行胎儿 RHD 基因分型，以减少不必要的抗 D Ig 注射并增加 RhD 阴性红细胞输血的可获得性（33）。常规的产前抗 D 预防政策也提出了关于携带 RhD 阴性胎儿的 RhD 阴性孕妇不必要的抗 D Ig 给药的伦理问题（5）。因此，有必要在东亚国家向 Rh 阴性孕妇引入靶向产前抗 D 预防。

我们不是特异性扩增某些 RHD 等位基因，而是使用单个引物组扩增不同的等位基因或高度同源的区域，随后在映射过程中通过它们 1-3 个碱基的序列差异将它们区分开来。我们的方法仅使用 2 对引物，在没有父亲基因型信息的情况下，使用孕妇 cfDNA 以定量方式区分 D 抗原阳性等位基因和 3 个 D 抗原阴性等位基因（缺失、单核苷酸变异和杂交型）。由于扩增子测序的高 read 深度（数十万 reads/样品）的性质，该方法以定量方式检测母体血浆中的 cfDNA，并且还提供 RHD 和 RHCE 外显子拷贝数信息。因此，作为另一个应用，我们的方法可用于确定 RHD 合子型。

作为识别 RHD 阳性 RhD 阴性等位基因的成本，本文所述的基于扩增子测序的方法比基于 PCR 的胎儿 RHD 缺失等位基因的基因分型具有更高的成本。然而，通过收集大量扩增子（例如，对于 100 个 cfDNA 样品总共 200 个扩增子）进行 1 次 MiSeq 运行，当每个扩增子获得 20000 个 read 对时，每个样品的测序成本可以 <10 美元。尽管根据我们的方案，当前的文库制备成本约为 25 美元，但通过引入使用定制引物（包括靶标特异性、标签和 Illumina 接头序列）的 1 步或 2 步 PCR 法，可将其降至 1/5 或更少。因此，大规模地，我们基于扩增子测序的胎儿 RHD 基因分型能以对 NIPT 合理的成本进行。

RHD*01EL.01 等位基因（“亚洲型”DEL 变异）表达非常弱的 D 抗原，但具有完整的 D 抗原表位库（34）。DEL 表型个体在血清学上被分类为 RhD 阴性，并且只能通过从红细胞表面吸收放散抗 D 来检测（2）。三项针对中国人的研究（35-37）表明，“亚洲型”DEL 变异没有对 D 抗原同种免疫

的风险，因此无需对 DEL 孕妇进行产前抗 D 预防。如果“亚洲型”DEL 个体的此类证据继续积累，那么目前日本等国家采用的对所有 RhD 阴性孕妇（包括“亚洲型”DEL 个体）进行抗 D 预防性给药的医疗政策可能在未来改变。尽管存在这样的争议，RHD*01EL.01 还是可以作为导致同种免疫的其他点突变等位基因的良好模型。

估计大多数 cfDNA 的大小 < 150bp (38)。本研究 RHD/RHCE 外显子 9 的 148bp 扩增子包括区分 RHD 和 RHCE 基因座的 2 个核苷酸位置，但我们的 Rh 盒（上游/下游）结果表明 1 个核苷酸差异足以将序列 reads 准确地映射到 RHD 或 RHCE 基因座。因此，通过采用扩增仅包含区分 RHD/RHCE 外显子 9 的 1 个核苷酸位置的较短扩增子的 PCR 引物，有可能提高我们方法中检测 cfDNA 的分析灵敏度。

因为我们目前的引物组设计用于检测 2 个主要的 RHD 阳性 D 抗原阴性等位基因 RHD*01EL.01（单核苷酸变异）和 RHD*01N.04 [RHD*D-CE(3-9)-D]，我们的方法将错误地检测其他次要 RHD 阳性 D 抗原阴性等位基因（日本人群总频率 0.4%）（9）为 D 抗原阳性等位基因。不过，扩增子测序的一个优点是灵活性和可扩展性，可以设计额外引物组来检测这些罕见等位基因。因此，我们的扩增子测序策略应该很容易适用于主要的 RHD 阳性 D 抗原阴性等位基因，如非洲人群中的 RHDpsi（8），其在外显子 4 中含有 37bp 重复插入，在第 210 位过早引入终止密码子；5 个单核苷酸变异（外显子 4 中 c.609G>A，外显子 5 中 c.654G>C、c.667T>G 和 c.674C>T，外显子 6 中 c.807T>G）。先前报道的检测 RHDpsi 等位基因的基于 PCR 的胎儿基因分型方法，使用在 3'末端与野生型等位基因匹配但与 RHDpsi 等位基因错配的 PCR 引物，以及区分野生型核苷酸和外显子 5 中错义变异的 Taqman 探针（22）。然而，对于 RHDpsi 等位基因的准确胎儿基因分型，建议检测多个外显子而不是仅检测外显子 5（21）。已经表明使用在 3'末端具有错配的引物进行差异单倍型扩增会导致基因分型错误（39）。相比之下，我们基于测序的方法有望直接靶向 37 bp 复制，这是 RHDpsi 等位基因的主要特征。我们方法的原理也适用于区分在白种人群中观察到的 RHD 阳性 RhD 阴性等位基因，如 RHD*06 等位基因（40）。

我们的胎儿 RHD 基因分型方法首次为东亚国家引入 RhD 阴性孕妇基因分型服务提供了机会，并为其他非白人国家建立了一个模型，以建立针对每个国家常见的 RHD 阳性 D 抗原阴性等位基因的基因分型策略。此外，我们的方法如果作为欧洲国家非白人个体的选项引入，也可能提高欧洲国家全国胎儿 RHD 基因分型的特异性。

参考文献

1. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000;95:375-87.

2. Reid ME , Lomas-Francis C. The blood group antigen facts book. 2nd Ed. New York (NY): Elsevier Academic Press; 2004.
3. de Haas M , Finning K, Massey E, Roberts DJ. Anti-D prophylaxis: past, present and future. *Transfus Med*2014;24:1–7.
4. Bowman J. Thirty-five years of Rh prophylaxis. *Transfusion*2003;43:1661–6.
5. Kent J , Farrell AM, Soothill P. Routine administration of Anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. *BMC Pregnancy Childbirth*2014;14:87.
6. Wagner FF , Flegel WA. RHD gene 缺失 occurred in the Rhesus box. *Blood*2000;95:3662–8.
7. Wagner FF , Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet*2001;2:10.
8. Singleton BK , Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*2000;95:12–8.
9. Ogasawara K , Suzuki Y, Sasaki K, Osabe T, Isa K, Tsuneyama H. Molecular basis for D–Japanese: identification of novel DEL and D–alleles. *Vox Sang*2015;109:359–65.
10. Kim B , Lee ST, Kim S, Choi JR, Kim HO. Application of multiplex ligation-dependent probe amplification assay for genotyping major blood group systems including DEL variants in the D-negative Korean population. *Ann Lab Med*2018;38:32–8.
11. Gu J , Wang XD, Shao CP, Wang J, Sun AY, Huang LH. Molecular basis of DEL phenotype in the Chinese population. *BMC Med Genet*2014;15:54.
12. Lo YM , Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*1997;350:485–7.
13. Mackie FL , Hemming K, Allen S, Morris RK, Kilby MD. The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *BJOG*2017;124:32–46.
14. Lo YM , Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med*1998;339:1734–8.
15. Yang H , Llewellyn A, Walker R, Harden M, Saramago P, Griffin S. High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal rhesus D status in RhD-negative women: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*2019;17:37.
16. de Haas M , Thurik FF, van der Ploeg CP, Veldhuisen B, Hirschberg H, Soussan AA, et. Sensitivity of fetal RHD screening for safe guidance of targeted anti-D immunoglobulin prophylaxis: prospective cohort study of a nationwide programme in the Netherlands. *BMJ*2016;355:i5789.
17. Tynan JA , Angkachatchai V, Ehrich M, Paladino T, van den Boom D, Oeth P. Multiplexed analysis of circulating cell-free fetal nucleic acids for noninvasive prenatal diagnostic RHD testing. *Am J Obstet Gynecol*2011;204:251.e1–6.
18. Darlington M , Carbonne B, Mailloux A, Brossard Y, Levy-Mozziconacci A, Courtney A. Effectiveness and costs of non-invasive foetal RHD genotyping in rhesus-D negative m其他: a French multicentric two-arm study of 850 women. *BMC Pregnancy Childbirth*2018;18:496.
19. Clausen FB , Steffensen R, Christiansen M, Rudby M, Jakobsen MA, Jakobsen TR. Routine noninvasive prenatal screening for fetal RHD in plasma of RhD-negative pregnant women-2 years of screening experience from Denmark. *Prenat Diagn*2014;34:1000–5.
20. van der Schoot CE , de Haas M, Clausen FB. Genotyping to prevent Rh disease: has the time come? *Curr Opin Hematol*2017;24:544–50.
21. Manfroi S , Calisesi C, Fagiani P, Gabriele A, Lodi G, Nucci S. Prenatal non-invasive foetal RHD genotyping: diagnostic accuracy of a test as a guide for appropriate administration of antenatal anti-D immunoprophylaxis. *Blood Transfus*2018;16:514–24.
22. Grootkerk-Tax MG , Soussan AA, de Haas M, Maaskant-van Wijk PA, van der Schoot CE. Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion*2006;46:2142–8.

23. Nussbaum RL , McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson genetics in medicine. 8th Ed. New York (NY): Elsevier; 2015.
24. Colin Y , Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood*1991;78:2747–52.
25. Chen JC , Lin TM, Chen YL, Wang YH, Jin YT, Yue CT. RHD 1227A is an important genetic marker for RhD(e) individuals. *Am J Clin Pathol*2004;122:193–8.
26. Gassner C , Doescher A, Drnovsek TD, Rozman P, Eicher NI, Legler TJ. Presence of RHD in serologically D–, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion*2005;45:527–38.
27. Luo Y , Jia B, Yan K, Liu S, Song X, Chen M. Pilot study of a novel multi-functional noninvasive prenatal test on fetus aneuploidy, copy number variation, and single-gene disorder screening. *Mol Genet Genomic Med*2019;7:e00597.
28. Wienzek-Lischka S , Krautwurst A, Fröhner V, Hackstein H, Gattenlöhner S, Bräuninger A. Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a using targeted massively parallel sequencing. *Transfusion*2015;55:1538–44.
29. Rieneck K , Bak M, Jønson L, Clausen FB, Krog GR, Tommerup N. Next-generation sequencing: proof of concept for antenatal prediction of the fetal Kell blood group phenotype from cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion*2013;53:2892–8.
30. Arce MA , Thompson ES, Wagner S, Coyne KE, Ferdman BA, Lublin DM. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals. *Blood*1993;82:651–5.
31. Fox EJ , Reid-Bayliss KS, Emond MJ, Loeb LA. Accuracy of next generation sequencing platforms. *Next Gener Seq Appl*2014;1:1000106.
32. Moise KJ , Hashmi SS, Markham K, Argoti PS, Bebbington M. Cell free fetal DNA to triage antenatal rhesus immune globulin: is it really cost-effective in the United States? *Prenat Diagn*2019;39:238–47.
33. Sandler SG , Flegel WA, Westhoff CM, Denomme GA, Delaney M, Keller MA. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. *Transfusion*2015;55:680–9.
34. Körmöczi GF , Gassner C, Shao CP, Uchikawa M, Legler TJ. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion*2005;45:1561–7.
35. Shao CP , Xu H, Xu Q, Sun GD, Li JP, Zhang BW. Antenatal Rh prophylaxis is unnecessary for “Asia type” DEL women. *Transfus Clin Biol*2010;17:260–4.
36. Wang QP , Dong GT, Wang XD, Gu J, Li Z, Sun AY. An investigation of secondary anti-D immunisation among phenotypically RhD-negative individuals in the Chinese population. *Blood Transfus*2014;12:238–43.
37. Wang M , Wang BL, Xu W, Fan DD, Peng ML, Pan J. Anti-D alloimmunisation in pregnant women with DEL phenotype in China. *Transfus Med*2015;25:163–9.
38. Fan HC , Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clin Chem*2010;56:1279–86.
39. De Sarkar N , Majumder M, Roy B. Differential haplotype amplification leads to misgenotyping of heterozygote as homozygote when using single nucleotide mismatch primer. *Electrophoresis*2012;33:3564–73.
40. Stegmann TC , Veldhuisen B, Bijman R, Thurik FF, Bossers B, Cheroutre G. Frequency and characterization of known and novel RHD variant alleles in 37782 Dutch D-negative pregnant women. *Br J Haematol*2016;173:469–79.

4. 《妊娠早期使用细胞游离胎儿 DNA 进行胎儿 RHD 基因分型的 诊断准确性》

作者：Alexandre Vivanti 1, Alexandra Benachi 1, François-Xavier Huchet 2, Yves Ville 3, Henri Cohen 4, Jean-Marc Costa 5

作者单位：1 法国克拉玛特巴黎南部大学安托万·贝克莱尔医院妇产科和生殖医学科；2 法国巴黎医学生物学实验室；3 法国巴黎内克儿童医院妇产科；4 法国巴黎蒙特苏里斯研究所母婴部；5 法国圣乌恩 L'Aumône Cerba 实验室专业生物学和遗传学系。

摘要

背景：目前全世界都在使用细胞游离胎儿 DNA 的 RHD 基因分型。尽管这项技术已经迅速普及，但它的最佳使用仍然存在争议。这种筛查试验主要用于治疗妊娠晚期（最后 3 个月）RhD 阴性的孕妇，从而避免系统性的抗-D 预防，但这种策略已被证明是成本高效益低的。在科学文献中，关于在妊娠早期（前 3 个月）用母体血浆中的细胞游离 DNA 对胎儿 RHD 进行基因分型的报道很少。

目的：本研究旨在通过单外显子实时 PCR 分析评估妊娠早期无创性胎儿 RHD 基因分型的性能。

研究设计：这是一项回顾性观察性多中心研究。在妊娠 10-14 周时，从未免疫和免疫妇女的母体血液中提取细胞游离胎儿 DNA。用定量 PCR 测定 RHD 序列，扩增外显子 10。结果与通过新生儿脐血取样获得的 RhD 表型数据进行了比较。

结果：共收集了 416 份 RhD 阴性孕妇妊娠早期的血清样本。该试验的总体敏感性和特异性分别为 100%（95%置信区间，96.9-100.0）和 95.2%（95%置信区间，90.5-97.6）。阴性和阳性预测值分别为 99.8%（95%置信区间 94.9-100.0）和 97.1%（95%置信区间 94.2-98.6）。9 例（2.2%）胎儿 RHD 状态不确定。

结论：单外显子定量 PCR 在妊娠早期无创检测胎儿 RHD 具有较高的准确性。

1 引言

自从 Lo 等人报道¹检测孕妇血浆中的细胞游离胎儿 DNA 以来，已经开发了许多应用，为非侵入性产前诊断带来了全新的时代。作为一项主要应用，非侵入性 RhD 基因分型已经彻底改变了 RhD 阴性妇女胎儿 RHD 状态的确定。在通过 PCR 进行 RHD 基因分型之前，在侵入性程序即绒毛膜绒毛取样或羊膜穿刺术之后确定胎儿 RHD 状态。目前，该检测方法是基于检测 RhD 阴性妇女血浆中的 RHD 基因序列²。该试验最初是针对 RhD 免疫妇女的小群体提出的，以排除 RhD 不相容的任何风险，或

者相反地，使患者护理适应有溶血性疾病和胎儿贫血风险的妊娠。此后，在未免疫妇女的大群体中评估了 RhD 基因分型，结果令人满意^{3,4,5,6}。

2002 年，我们的团队在法国的常规实践中首次引入非侵入性胎儿 RHD 基因分型检测。仅基于通过实时 PCR 检测 RHD 基因外显子 10，该测定最初在 102 例孕早期孕妇的队列中进行评估，表现出完美的准确性（100%敏感性和特异性）⁷。接下来，在 283 例妇女的队列中评估该测定，对于这些妇女，可以 100%准确地再次实现可靠的胎儿 RHD 基因型测定³。

在这里，我们报告了妊娠早期常规进行胎儿 RHD 状态的非侵入性产前测定的结果。

2 材料和方法

2.1 研究人群

回顾性纳入 2007 年 1 月至 2012 年 12 月期间法国巴黎地区 5 个产科（巴黎美国医院、Mutualiste Montsouris 研究所、Necker - Enfants Malades 中心医院、Antoine Bécclère 中心医院和 Franco-Britannique 医院研究所）共 416 例 RhD 阴性孕妇。所有血液样本均在 10-14 妊娠周（WG）期间获得，作为常规咨询或特定 RhD 免疫后产前诊断咨询的一部分。RhD 阴性妇女中非侵入性胎儿 RHD 测定的医学适应症为：**系统筛查未免疫的 RhD 阴性妇女，以便在需要时指导侵入性手术（绒毛膜绒毛取样或羊膜穿刺术）后的抗 D 给药，或有 RhD 免疫风险的事件（腹部创伤，流产，或子宫出血）。**

2.2 样品

将血液样品（7mL）收集到 Vacutainer SST[®]管（法国 Becton Dickinson）中。凝固后立即通过在 4℃ 以 3000g 离心 10 分钟获得血清，分装并储存在 -80℃。如果不立即处理，则处理前血液样品室温下保存最多 72 小时。胎儿为 RhD 阴性的患者不给予抗 D 免疫球蛋白。

2.3 RHD 基因实时 PCR

如其他文献⁸所述进行人 RHD 基因序列检测，而小鼠 GALT 基因用作 DNA 提取的阳性对照。简而言之，作为 DNA 提取和扩增步骤的示踪剂，在 DNA 提取之前立即将少量（250pg）小鼠 DNA（法国 Sigma）添加到每个患者的样品（1mL 血清）中。然后使用 PCR 模板制备试剂盒（法国 Roche Diagnostics）提取总 DNA，并用 50μL 洗脱缓冲液洗脱吸附的 DNA，每个 PCR 反应使用 10μL DNA。扩增在 Light-Cycler V2.0 仪器（法国 Roche Diagnostics）中进行。使用 FastDNAMaster 杂交探针试剂盒（法国 Roche Diagnostics）以 20 μL 的终体积进行 PCR 反应，每种引物 0.5mmol/L（表 1），每种探

针 0.25mmol/L (法国 Sigma)，1.25 单位尿嘧啶-DNA 糖基化酶 (UDG) (法国 Biolabs) 和 4.75mmol/L 氯化镁。在最初 50°C 温育 1 分钟后，在 95°C 下进行 8 分钟的第一变性步骤，然后进行 50 个循环的扩增：变性 (95°C，10 秒，升温速率 20°C/秒)，退火 (56°C，10 秒，升温速率 20°C/秒) 和延伸 (72°C，20 秒，升温速率 2°C/秒)。每个样品处理两次用于 DNA 提取，并且对每种 DNA 提取物一式两份进行 RHD 测定。在每次运行期间，从携带 RhD 阳性或 RhD 阴性胎儿的妇女获得的血清用作阳性和阴性对照。当检测到 RHD 基因的荧光信号时，RHD 反应被认为是阳性，而当仅检测到小鼠 GALT 基因的信号时，RHD 反应被认为是阴性。当 RHD 反应观察到的交叉点值 (荧光信号) 比阳性对照早得多时，认为是不确定的。那种特定情况意味着在母体血清中检测到的 RHD 序列的量太大，不可能源于胎儿。基于这些发现，可以得出结论，RHD 基因序列存在于母体基因组中，表明母体存在 RHD 基因的变异。当所有 RHD PCR 反应均为阴性时，认为是 RhD 阴性基因型，当四个 PCR 反应中至少三个为阳性时，认为是 RHD 阳性基因型。将结果与新生儿脐血样品的 RhD 血清学结果进行比较。

表 1 PCR 测定中使用的引物和探针的细节

Primer name	Target	Sequence (5'-3')	Modification
RHE10A	Human <i>RHD</i> gene	GCCTGCATTTGTACGTGAGA	None
RHE10B	Human <i>RHD</i> gene	CAAAGAGTGGCAGAGAAAGGA	None
IS11	Mouse <i>GALT</i> gene	GCGCTTCCCGAGGTACACTAT	None
IS12	Mouse <i>GALT</i> gene	ATGTCACATCTGCCCGAACTCC	None
Probe name	Target	Sequence (5'-3')	Modification
RHE10C	Human <i>RHD</i> gene	GCAGGCACTGGAGTCAGAGAAAA	5'LCRed640 3'Ph
RHE10D	Human <i>RHD</i> gene	TGACAGCAAAGTCTCCAATGTTCCG	3'FITC
IS9	Mouse <i>GALT</i> gene	TGGTGATCCTGCCGTTTCCTTGTCTT	5'LCRed705 3'Ph
IS10	Mouse <i>GALT</i> gene	GCCCTGATGTGGTCACAGTCAAGCA	3'FITC

2.4 数据和统计分析

对于纳入的每个妇女，收集的数据如下：非侵入性 RHD 测定时的胎龄，RHD 测定指征，RHD 基因实时 PCR 结果，作为金标准的新生儿 RhD 测定 (脐血采样)，不规则抗体的产前和产后筛查，产前或产后抗 D 给药以及父母的地理起源。使用 JMP 10 Statistical Discovery (美国 SAS Institute) 分析数据。所有估计值均以 95% 置信区间 (CI) 表示。

2.5 伦理批准的细节

这项观察性回顾性研究得到了法国妇产科学院机构审查委员会的批准（CEROG OBS 2013-02-04 R1）。所有数据均已取消标识，以确保患者隐私和机密。根据法国有关产前诊断的法规，已获得所有患者的书面知情同意。

3 结果

在测试胎儿 RHD 状态的 416 例 RhD 阴性妇女中，采血时的平均胎龄（WG）为 13.1（±1.0）。总共 25 个程序（6.0%）在 10-11 WG 期间进行。大多数妇女（90.6%）作为系统筛查的一部分进行检测，22 例（5.3%）在侵入性手术前进行检测，17 例（4.1%）由于已存在 RhD 免疫而进行检测。在测试胎儿 RHD 状态的妇女中，48 例（11.5%）来自非洲或加勒比地区。新生儿 RhD 状态 162 例（38.9%）阴性，254 例（61.1%）阳性。

在本研究队列中，9 例（2.2%）胎儿 RHD 状态不确定（图 1），其中 6 例来自非洲或加勒比地区。关于这些不确定的结果，基于脐血血清，2 例新生儿被确定为 RhD 阳性，7 例被确定为 RhD 阴性。

407 例（97.8%）母体血清胎儿 RHD 状态的非侵入性检测结果是确定的：259 例（63.6%）阳性，148 例（36.4%）阴性。关于这些确定的结果，基于脐血血清，259 例 RHD 基因检测阳性胎儿中，252 例产后被确定为 RhD 阳性，7 例被确定为 RhD 阴性。148 例 RHD 基因检测阴性胎儿产后全部被确定为 RhD 阴性。该测试的总体敏感性和特异性分别为 100%（95%CI: 96.9-100.0）和 95.2%（95%CI: 90.5-97.6）。在我们的队列中，阴性和阳性预测值分别为 99.8%（95%CI: 94.9-100.0）和 97.1%（95%CI: 94.2-98.6）。

根据产前和产后对不规则抗体的筛查，未免疫妇女在妊娠期间均未被致敏。在 17 例免疫妇女中，所有 RHD 状态均正确确定，其中 7 例胎儿检测为 RhD 阴性。在 RHD 产前非侵入性基因分型检测假阳性的 7 例妇女中，有 4 例在妊娠期间接受了抗 D 免疫球蛋白治疗。

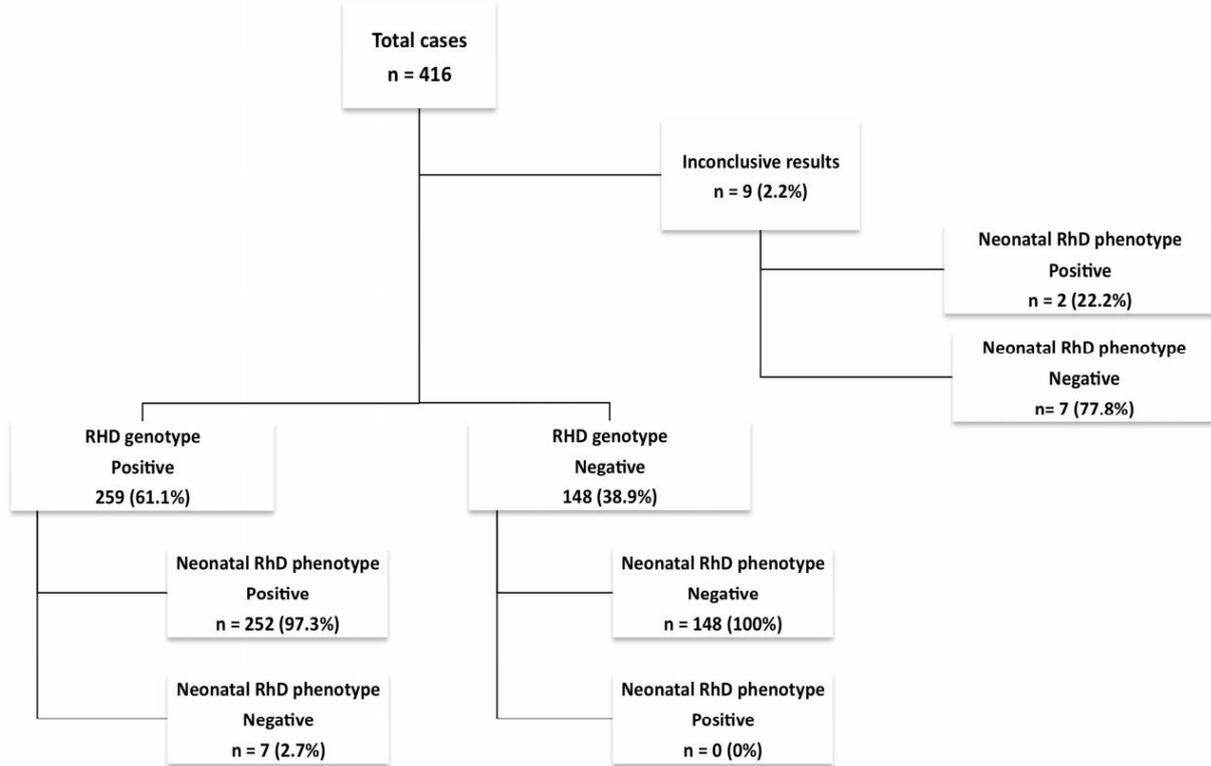


图 1 流程图：用妊娠早期母体血清细胞游离胎儿 DNA 进行非侵入性胎儿 RHD 基因分型的结果

4 讨论

我们的研究结果显示，即使在妊娠早期和混合人群中，使用单外显子检测也可以非常准确地确定胎儿 RHD 状态。

使用细胞游离胎儿 DNA 早期检测 RHD 基因型可能导致高假阴性率，对怀有 RhD 阳性胎儿的已致敏的 RhD 阴性孕妇产生严重后果。然而，在我们的研究中，怀有 RhD 阳性胎儿的孕妇都得到了**一致和正确的诊断（100%敏感性）**。**这种高水平的准确性支持在 10 WG 后的常规临床实践中使用非侵入性 RHD 状态测定。**

大多数发达国家常规进行非侵入性 RHD 测定，许多研究小组在过去 10 年中评估了其总体准确性，并进行了两项荟萃分析。首先，Geifman-Holtzman 等⁹检索了 37 份出版物，共 3261 份采自 8-42 WG 的样本。总体诊断准确率为 91.4%（排除 DNA 缺失和/或新生儿 RHD 状态未经验证的样本后为 94.8%）。妊娠早期 RHD 状态测定仅涉及 218 例（6.7%）样本，诊断准确率为 90.8%。最近，Zhu 等¹⁰进行了更大规模的荟萃分析，包括 41 项研究和 11129 份样本。排除 352 个样本后，总体准确率为 98.5%，灵敏度为 99%，特异性为 98%。孕早期 RHD 状态测定（当明确识别时）显示 99% 的诊断准确性（882 个样品）。

第一项针对单外显子（外显子 10）qPCR 孕早期检测的大型研究，于 2002 年发表⁷。这项研究

涉及 102 例 14 WG 前的妇女，结果 100% 的敏感性和特异性。这些结果与另一项涉及 111 例 RhD 阴性妇女的孕早期研究¹¹一致。后者的工作重点是检测 9-13 WG 期间的外显子 5 和 7。该测定的特异性和灵敏度分别为 93% 和 100%，诊断准确率为 97%。迄今为止最大的特定孕早期队列（591 个样本）由 Akolekar 等¹²于 2011 年发表，总体准确率为 98.8%。然而，有很多不确定的结果（n=84，占整个队列的 14.3%），这可能是由于非洲妇女比例很高（19.3%）。大多数高加索人 RhD 阴性表型被认为是由完全 RHD 缺失的纯合性引起的¹³。而 RHD*Pseudogene 可能导致一半以上的非洲妇女的 RhD 阴性表型¹⁴。该 RHD 变异含有插入外显子 4 中的 37 个碱基对，其可能在位置 210 处引入终止密码子，同时还包含外显子 6 中的另一个终止密码子。RHD*Pseudogene 的存在是非洲种族结果不确定的主要原因。在我们的队列中，48 例（11.5%）妇女来自非洲或加勒比地区，其中 6 例表现出不确定的 RHD 基因分型。最近发表了一项涉及大型队列的前瞻性多中心研究，结果按胎龄分层¹⁵。在该队列的 4913 例妇女中，有 956 例胎龄在 11-13 WG。该测试的灵敏度（外显子 5 和 7 的 PCR）达到 99.8%，其中 75 例（7.8%）结果不确定。在 11 WG 之前执行测试时，假阴性率比 11-13 WG 期间显著增加（16/856 vs. 1/956）。最近，Picchiassi 等¹⁶报道意大利使用类似双外显子策略（第 5 和 7 外显子），检测 193 例早期孕妇，总体准确性为 93.3%（敏感性为 92.8%，特异性为 94.1%）。

我们的数据与先前发表的使用单外显子扩增的研究一致。Wikman 等报道高性能水平，但只有在 8 WG 后，以三重模式分析外显子 4⁶。使用多外显子方法进行 RHD 基因分型被认为更合适，因为它可以检测 RhD 阴性表型相关的一些 RHD 阳性等位基因（RHD 基因变异），从而降低假阳性率。此类 RHD 基因变异的鉴定依赖于对不同靶外显子之间差异的分析。然而，这种差异也可能是由于分析误差导致，特别是当胎儿 DNA 的数量证明很低时，如在妊娠早期。因此，描述了高比率的“no-call”报告^{12,15}，实际上，迄今为止发表的大多数研究都未能证明多外显子分析的优越性。在临床实践中，这些不可报告的结果可能会导致抗 D 注射。

此外，单个靶标的重复检测已被证明可提高母体血浆中胎儿 DNA 检测的灵敏度¹⁷。这种方法无法合理地应用于多外显子策略，因为这将大大增加测定的成本。最后，尽管单外显子基因分型方法可能导致更多的假阳性，从而导致特异性略低，但它可能被证明是一种更合适且更具成本效益的方法，可提供具有可接受性能的实用系统性筛选¹⁸。

目前，在 10-11 WG 进行非侵入性胎儿 RHD 测定可能足够准确，可以常规开展。在妊娠早期胎儿检查同时进行常规产前检查，可能有助于减少妊娠期间抗 D 免疫球蛋白的使用，同时及时为未致敏妇女提供合适的护理，妇女和卫生服务成本都降至最低。

然而，在成本效益分析中，RHD 基因分型必须与系统性抗 D 给药相平衡。第一项分析得出结论，

妊娠早期胎儿 RHD 基因分型并不是一种有效的降低成本的策略，无论是否给予产前预防^{8,19,20}。然而，最近的加拿大数据支持靶向产前抗 RhD 预防方案的可行性，似乎具有足够的成本效益以保证大规模开展²¹。瑞典模型²²也得出了类似的结论，与没有常规产前抗 D 预防相比，系统性预防显示成本和免疫风险较低。

总之，妊娠早期的 RHD 基因分型似乎是最佳的，因为这种策略选择可以包括在系统的筛查方案中，从而避免在胎儿 RhD 阴性状态的情况下进行额外的访视或进一步的调查，更重要的是因为继续对所有 RhD 阴性孕妇注射抗 D 似乎在伦理上不可接受²³。出于这个原因，英国国家卫生服务机构建议将 RHD 基因分型扩展到全国所有孕妇²⁴。然而，这将需要一种既具有成本效益又高度敏感的简单而稳健的测定法，因为未检测到的免疫可能会产生严重后果。此外，理想的测定应产生低比率的不可报告结果，以避免系统的抗 D 给药。基于单外显子分析的 RHD 基因分型可能被证明是安全性和实用性之间良好平衡，如果一式三份⁶或一式四份（本文）进行，因为该过程显示可以提高细胞游离胎儿 DNA 分析的灵敏度²⁵。缺乏对胎儿 DNA 存在的阳性对照无疑是有问题的，仍需要在不增加补充步骤、额外成本和相当大工作量的情况下确定最佳对照²⁶。

参考文献

- 1- Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., and Wainscoat, J.S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350, 485–487.
- 2- Lo, Y.M., Hjelm, N.M., Fidler, C., Sargent, I.L., Murphy, M.F., Chamberlain, P.F., Poon, P.M., Redman, C.W., and Wainscoat, J.S. (1998). Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N. Engl. J. Med.* 339, 1734–1738.
- 3- Gautier, E., Benachi, A., Giovannardi, Y., Ernault, P., Olivi, M., Gaillon, T., and Costa, J.-M. (2005). Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192, 666–669.
- 4- Rouillac-Le Sciellour, C., Sérazin, V., Brossard, Y., Oudin, O., Le Van Kim, C., Colin, Y., Guidicelli, Y., Menu, M., and Cartron, J.-P. (2007). Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD. *Transfus Clin Biol* 14, 572–577.
- 5- Bombard, A.T., Akolekar, R., Farkas, D.H., VanAgtnael, A.L., Aquino, F., Oeth, P., and Nicolaides, K.H. (2011). Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negative women. *Prenat. Diagn.* 31, 802–808.
- 6- Wikman, A.T., Tiblad, E., Karlsson, A., Olsson, M.L., Westgren, M., and Reilly, M. (2012). Noninvasive single-exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 120, 227–234.
- 7- Costa, J.-M., Giovannardi, Y., Ernault, P., Lohmann, L., Nataf, V., El Halali, N., and Gautier, E. (2002). Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br. J. Haematol.* 119, 255–260.
- 8- Benachi, A., Delahaye, S., Leticee, N., Jouannic, J.-M., Ville, Y., and Costa, J.-M. (2012). Impact of non-invasive fetal RhD genotyping on management costs of rhesus-D negative patients: results of a French pilot study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 162, 28–32.
- 9- Geifman-Holtzman, O., Grotegut, C.A., and Gaughan, J.P. (2006). Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood—a metaanalysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195, 1163–1173.

- 10- Zhu, Y.-J., Zheng, Y.-R., Li, L., Zhou, H., Liao, X., Guo, J.-X., and Yi, P. (2014). Diagnostic accuracy of non-invasive fetal RhD genotyping using cellfree fetal DNA: a meta analysis. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 27, 1839-44.
- 11- Cardo, L., García, B.P., and Alvarez, F.V. (2010). Non-invasive fetal RHD genotyping in the first trimester of pregnancy. *Clin. Chem. Lab. Med.* 48, 1121-1126.
- 12- Akolekar, R., Finning, K., Kuppusamy, R., Daniels, G., and Nicolaides, K.H. (2011). Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11-13 weeks of gestation. *Fetal. Diagn. Ther.* 29, 301-306.
- 13- Wagner, F.F., and Flegel, W.A. (2000). RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 95, 3662-3668.
- 14- Singleton, B.K., Green, C.A., Avent, N.D., Martin, P.G., Smart, E., Daka, A., Narter-Olaga, E.G., Hawthorne, L.M., and Daniels, G. (2000). The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 95, 12-18.
- 15- Chitty, L.S., Finning, K., Wade, A., Soothill, P., Martin, B., Oxenford, K., Daniels, G., and Massey, E. (2014). Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. *BMJ* 349, g5243-g5243.
- 16- Picchiassi E, Di Renzo GC, Tarquini F, Bini V, Centra M, Pennacchi L, Galeone F, Micanti M, Coata G (2015). Non-Invasive Prenatal RHD Genotyping Using Cell-Free Fetal DNA from Maternal Plasma: An Italian Experience. *Transfus Med Hemother.* 42, 22-8.
- 17- Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, Voslarova S, Kofer J, Komrska V, Habart D (2003). Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenat Diagn.* 23, 235-8.
- 18- Tiblad E, Taune Wikman A, Ajne G, Blanck A, Jansson Y, Karlsson A, Nordlander E, Holländer BS, Westgren M (2013). Targeted routine antenatal anti-D prophylaxis in the prevention of RhD immunisation--outcome of a new antenatal screening and prevention program. *PLoS One.* 8, e70984.
- 19- Szczepura, A., Osipenko, L., and Freeman, K. (2011). A new fetal RHD genotyping test: costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. *BMC Pregnancy Childbirth* 11, 5.
- 20- Hawk, A.F., Chang, E.Y., Shields, S.M., and Simpson, K.N. (2013). Costs and clinical outcomes of noninvasive fetal RhD typing for targeted prophylaxis. *Obstet Gynecol* 122, 579-585.
- 21- Teitelbaum, L., Metcalfe, A., Clarke, G., Parboosingh, J.S., Wilson, R.D., and Johnson, J.M. (2015). Costs and benefits of non-invasive fetal RhD determination. *Ultrasound Obstet Gynecol* 45, 84-88.
- 22- Neovius M, Tiblad E, Westgren M, Kublickas M, Neovius K, Wikman A. Costeffectiveness of first trimester non-invasive fetal RHD screening for targeted antenatal anti-D prophylaxis in RhD-negative pregnant women: a model-based analysis (2015). *BJOG.* doi: 10.1111/1471-0528.13801.
- 23- Kent J, Farrell AM, Soothill P (2014). Routine administration of Anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. *BMC Pregnancy Childbirth.* 14,87.
- 24- Soothill PW, Finning K, Latham T, Wreford-Bush T, Ford J, Daniels G (2015). Use of cffDNA to avoid administration of anti-D to pregnant women when the fetus is RhD-negative: implementation in the NHS. *BJOG.* 122, 1682-6.
- 25- Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, Voslarova S, Kofer J, Komrska V, Habart D (2003). Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenat Diagn.* 23, 235-8.
- 26- Scheffer PG, de Haas M, van der Schoot CE (2011). The controversy about controls for fetal blood group genotyping by cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Curr Opin Hematol.* 18, 467-73.

5. 《循环游离 DNA 确定妊娠早中晚三期的胎儿 RHD 状态》

作者：Moise KJ Jr, Gandhi M, Boring NH, O'Shaughnessy R, Simpson LL, Wolfe HM, Baxter JK, Polzin W, Eddleman KA, Hassan SS, Skupski DW, Ryan G, Walker M, Lam G, Brown R, Skoll MA, Robinson C, Sheikh A, Bronsteen R, Plante LA, McLennan G, Chikova A, Paladino T

作者单位：美国德克萨斯州休斯顿贝勒医学院妇产科；美国俄亥俄州立大学韦克斯纳医学中心；美国哥伦比亚大学医学中心；美国北卡罗来那大学医学院；美国宾夕法尼亚州费城托马斯·杰斐逊大学西德尼·金梅尔医学院；美国俄亥俄州辛辛那提市三州母婴医学协会；美国纽约西奈山伊坎医学院产科、妇科和生殖科学系；美国密歇根州底特律韦恩州立大学/底特律医学中心妇产科；美国纽约长老会皇后和威尔康奈尔医学院；加拿大西奈山医院；美国华盛顿州西雅图常青医院；美国菲尼克斯围产期协会；加拿大魁北克蒙特勒麦吉尔大学；加拿大英属哥伦比亚大学；美国南卡罗来纳医药大学；美国光谱健康医院；美国密歇根州皇家橡树区威廉·博蒙特医院；美国宾夕法尼亚州费城德雷塞尔大学医学院；美国 Sequenom 公司。

摘要

目的：评估一种利用循环细胞游离 DNA 检测胎儿 RhD 状态的新方法的准确性。

方法：这是一项前瞻性观察研究。在 520 名未同种免疫 RhD 阴性的患者中，在妊娠早中晚三期的每一期（每 3 个月）收集母亲的血液样本。使用 SensiGENE RHD 测试对血浆样本进行循环细胞游离 DNA 分析，该测试使用了如前所述的外显子 4 和 7 的引物，并纳入了 RHD 基因外显子 5 的新引物设计。使用出生时的脐血进行新生儿血清学 RhD 分型，结果存储在单独的临床数据库中。数据揭盲后，将 DNA 分析结果与新生儿血清学结果进行比较。

结果：在妊娠早期、中期和晚期的样本中，分别有 5.6%、5.7%和 6.1%出现 RHD 假基因或 RHD 变异导致的无结论性结果。RhD 的假阳性率（RhD 阴性胎儿，RHD 阳性结果）分别为 1.54%（95%置信区间[CI] 0.42-5.44%）、1.53%（CI 0.42-5.40%）和 0.82%（CI 0.04-4.50%）。只有一例假阴性诊断（RhD 阳性胎儿，RHD 阴性结果），发生在妊娠早期（0.32%；95% CI 0.08-1.78%）。重复样本间基因分型不一致，与同一天在一个采集点采集的两名患者的样本标签错误有关。早中晚三期的总体测试结果一致（ $P>0.99$ ）。

结论：循环细胞游离 DNA 可准确预测妊娠早中晚三期的胎儿 RhD 状态。

1 引言

自 20 世纪 60 年代后期产后 Rh 免疫球蛋白（RhIG）广泛使用，以及 20 世纪 80 年代中期产前 RhIG 常规给药以来，北美 Rh 同种免疫的发生率显著下降。1993 年，Lo 等¹报道成功使用母体血浆中循环细胞游离 DNA 准确预测胎儿 RhD 状态。最近对涉及超过 11000 个样本的 37 篇出版物进行的荟萃分析发现，对于准确确定胎儿 RhD，阳性预测值为 95%，阴性预测值为 98%。² 该分析仅包括一项在美国实验室中进行的研究，使用来自英国人群的存储样本。³ 循环细胞游离 DNA 检测 RHD 现在在包括美国在内的许多国家常规用于同种免疫妊娠的管理。⁴

根据孟德尔遗传学，38%的 RhD 阴性孕妇将携带 RhD 阴性胎儿。在这些情况下，产前 RhIG 是不

必要的。因此，人们对这些孕妇不必要地暴露于基于血浆的产品提出了伦理和临床问题。⁵ 对克雅氏病的恐惧导致美国成为 RhIG 的唯一血浆来源，导致该产品可获得性有限，因此许多欧洲国家尚未常规使用产前 RhIG。丹麦、荷兰和瑞典部分地区现在使用常规循环细胞游离 DNA 检测来确定胎儿 RHD 状态，以确定哪个妊娠患者是产前 RhIG 的候选者。⁵⁻⁷

本试验的目的是在统计学上有力的前瞻性研究中估计改进的循环细胞游离 DNA 测定的准确性。此外，我们试图评估妊娠早、中、晚三期中是否有特定的某一期这个检测最准确。

2 材料和方法

我们进行了一项前瞻性的观察性研究。纳入 520 名患者。我们之前的初步研究中的患者未包括在本次调查中。⁸ 纳入标准：RhD 阴性孕妇，妊娠早期，初次抗筛无红细胞同种免疫的证据。在体外受精的情况下，妊娠日期由月经日期或转移日期确定。所有日期均由孕早期超声检查证实。

批准从协调中心（贝勒医学院；H21656）的研究审查委员会和北美胎儿治疗网络的指导委员会获得。此外，各参与中心的机构审查委员会也批准了该方案。所有患者均签署了书面知情同意书。

参与者在妊娠 11-13 6/7、16-19 6/7 和 28-29 6/7 周进行了静脉穿刺（共 3 次）。将血液置于 10ml 乙二胺四乙酸管中，并在室温下由快递公司连夜运送至加利福尼亚州圣地亚哥的 Sequenom 实验室。在收集后 72 小时内，将血液样品以 $\times 1600g$ 离心 10 分钟，然后 1ml 分装，条形码唯一性编码，储存在 -80°C 。如研究方案中所定义，未分析在 72 小时窗口之外收到的样品，因为尚未确定超过此时间点的稳定性。每次抽血四份 1ml 分装样品用于 DNA 提取。使用基于磁珠的分离，在 Microlab STAR 液体处理器上自动提取 DNA。分娩时，使用标准血清学方法对新生儿进行 RhD 分型以确定表型。

所有临床数据均由各个站点的协调员输入定制的基于 web 的数据库（MedSciNet AB，瑞典斯德哥尔摩卡罗林斯卡研究所）。研究发起人定期进行实地考察，以确保源文件和临床数据库之间的准确性。向 MedSci AB 程序员报告实验室结果，他们将临床数据与实验室结果相匹配。在研究结束时，最终数据被发布给首席研究员（K.J.M.）和一位独立的统计学家。

SensiGENE 胎儿 RHD 基因分型测试是目前美国唯一可用于确定胎儿 RHD 状态的循环细胞游离 DNA 测试。 简而言之，基质辅助激光解吸/电离-飞行时间质谱平台用于检测对照和胎儿遗传序列。该测定查询 RHD 基因外显子 4、5 和 7 的等位基因，并用探针检测外显子 4 中 37 bp 插入（RHD 假基因）。基因 TGIF 用作从提取到检测的对照。对于 RHD 基因型测定，如果仅检测到 3 个靶标中的 1 个，或一个都没有检测到，则将样品报告为 RhD 阴性。如果检测到所有 3 个靶标，则将样品报告为 RHD 阳性。如果仅检测到 3 个靶标中的 2 个，则报告为不确定。如果 RHD 基因变异在我们能检测的

3 个外显子之外，或者如果检测到 RHD 假基因，结果也被认为是不可确定的。

基于 RHD 测定的检测限，要求样品胎儿拷贝数大于 104 才能被接受。^{3,9} 少于 104 个胎儿拷贝的样品因为“数量不足”被排除在最终分析之外。

本研究中的所有样品均通过 Sample ID 测试进行基因分型，该测试利用了杂合度为 45-55% 的 44 种单核苷酸多态性。¹⁰ 这样就可以比较三个孕期的样本进行遗传匹配，以确认它们是从同一患者那里获得的。基于该组的区分能力使得任何两个独特样本之间发生随机匹配的概率为 1.8×10^{-19} 。在对数据进行揭盲之前，先确定样品从收集到处理因错误标记而发生的任何不匹配。

该研究被设计获得至少 125 个 RhD 阴性和 125 个 RhD 阳性胎儿表型。假设 RhD 阴性率为 10%，RhD 阳性个体的杂合率为 45%，413 例患者的样本量将产生 125 例 RhD 阴性新生儿。假设测试的准确性为 98%，则准确性的 95% 置信区间 (CI) 为 96-99%。计算样本量增加 25% (至 520 名患者) 以将流产、失访患者、入选但后来确定不符合纳入标准的患者、数量不足的样本以及其他导致参与者或样本排除的因素计算在内。

我们用单侧 95%CI 下限估计正确预测的比例，计算循环细胞游离 DNA 预测新生儿 RhD 表型的假阳性率、假阴性率、敏感性、特异性和准确性。准确度定义为真阳性和真阴性之和除以样本总数。McNemar 测试用于确定妊娠三期测试结果的一致性。P 值 < .05 被认为具有统计学意义。

3 结果

2009 年 9 月至 2011 年 4 月期间，在美国和加拿大的 17 个研究地点招募了连续患者 (clinicaltrials.gov # NCT00871195)。在研究人群中未观察到不良事件。在妊娠早期，由于标签错误、在稳定期后实验室才收到样品或样品无法定位 (图 1)，15 个样品未检测。由于缺乏确诊的新生儿血清学、患者不合格或重复采样，另外 40 个样本被排除在外。根据 DNA 拷贝数不足，确定孕早期的一个样品数量不足 (由于没有确诊的新生儿血清学，该样品也被排除在外)。研究中没有其他样本因胎儿拷贝数不足被排除在外。因此，最终的研究人群包括 467 名患者。新生儿血清学检查显示 312 例 RhD 阳性单胎，11 组 RhD 阳性双胞胎，1 组 RhD 阳性三胞胎，129 例 RhD 阴性单胎，4 组 RhD 阴性双胞胎，1 组 RhD 阴性三胞胎和一组 RhD 阴性和阳性双胞胎。因此，达到了提出的 413 的预研究样本量估计。

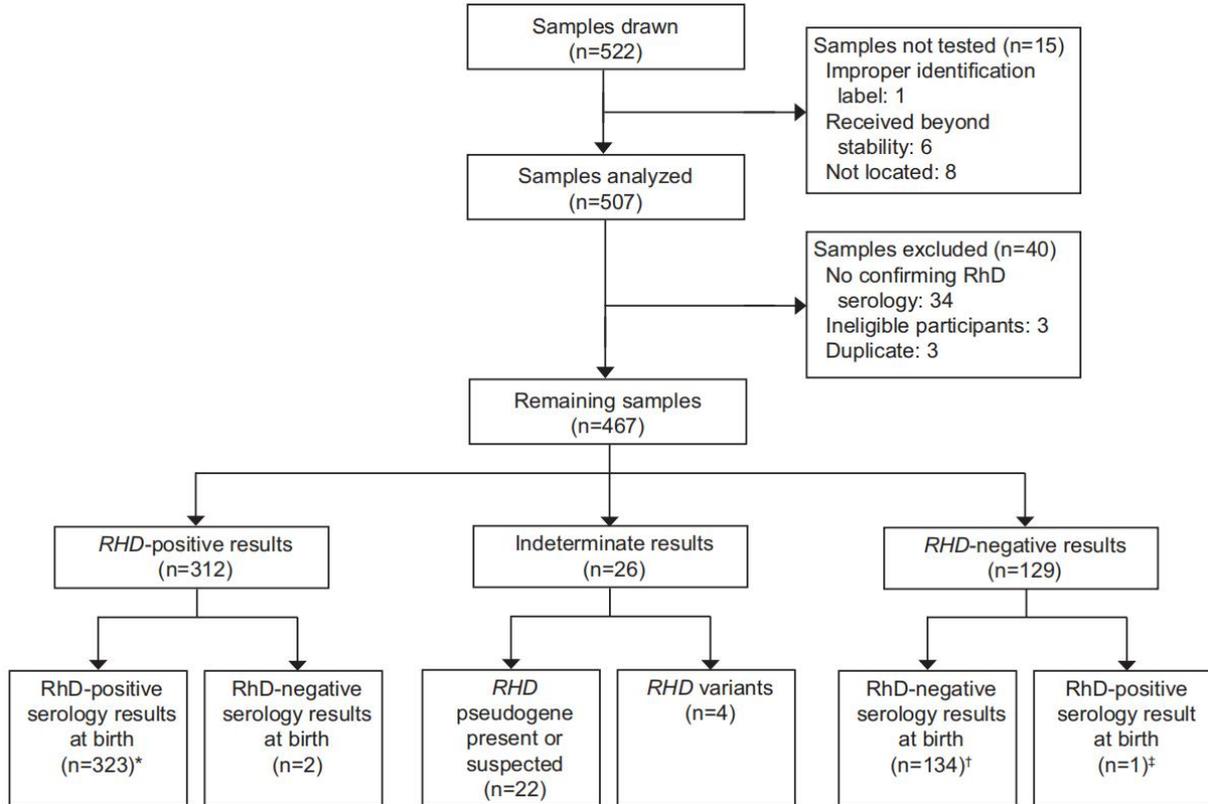


图 1 孕早期抽取的样本的结果。*包括 1 组三胞胎和 11 组双胞胎的血清学结果。†包括 1 组三胞胎和 4 组双胞胎的血清学结果。‡错误标记导致的样本错误。

母亲的平均±标准差年龄为 31.0±5.19 岁；中位妊娠次数为 2（范围 1-13）。自称种族为 86.9% 高加索人或白人，11.2% 非裔美国人或黑人，13.1% 西班牙裔或拉丁裔，0.8% 亚洲人和 1.2% 其他人。孕早期获得样本的中位胎龄为 12.3 周（范围为 10.7-14.7 周）。从孕早期的 9 个参与者病例中没有获得或者排除了孕中期样本（图 2）。在妊娠中期获得样本的中位胎龄为 18.0 周（范围 15.1-24.4 周）。从孕中期的 33 个参与者病例中没有获得或者排除了孕晚期样本（图 3）。在妊娠晚期获得样本的中位胎龄为 28.7 周（范围 26.0-32.4 周）。

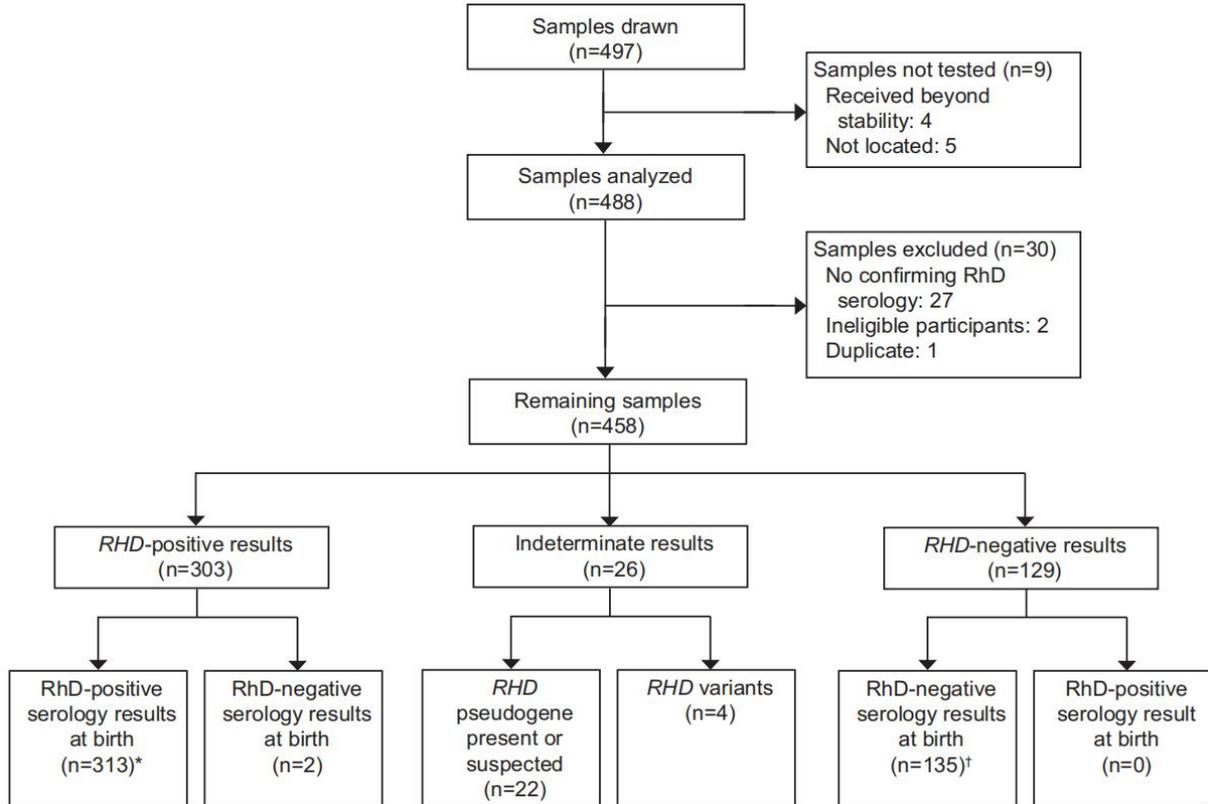


图 2 孕中期抽取的样本的结果。*包括 1 组三胞胎和 10 组双胞胎的血清学结果。†包括 1 组三胞胎和 4 组双胞胎的血清学结果。

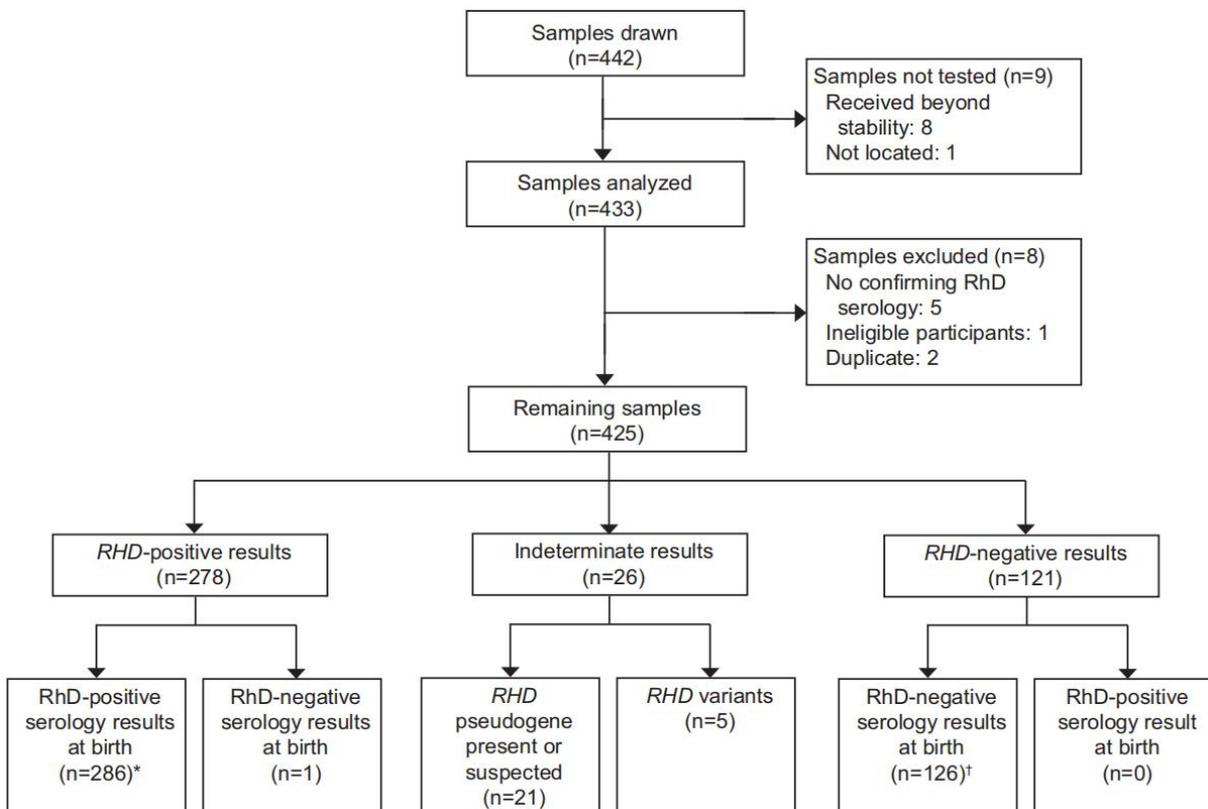


图 3 孕晚期抽取的样本的结果。*包括 9 组双胞胎的血清学结果。†包括 1 组三胞胎和 3 组双胞胎的

血清学结果。

图 1-3 描绘了在每个孕期中抽取的样品的结果。在妊娠早期、中期和晚期样本中分别有 5.6%，5.7% 和 6.1% 出现 RHD 假基因或 RHD 变异导致的不确定结果。假阳性诊断率（循环细胞游离 DNA RHD 阳性结果的 RhD 阴性胎儿）分别为 1.54%（95%CI 0.42-5.44%）、1.53%（CI 0.42-5.40%）和 0.82%（CI 0.04-4.50%）。只有一个假阴性诊断（循环细胞游离 DNA RHD 阴性结果的 RhD 阳性胎儿），发生在妊娠早期（0.32%；95%CI 0.08-1.78%）。对不匹配的重复样本的基因分型显示，孕早期的这一假阴性病例与同一天在其中一个收集地点收集的两名患者的样本标签错误有关。当根据孕中期和孕晚期的基因分型校正样品的身份时，发现孕早期的一个假阴性 RHD 结果是错误的。校正了错误标记后，假阴性率为 0.0%（95%CI 0.00-1.22%）。总体测试结果在所有三个孕期都一致（ $P>.99$ ）（表 1）。

表 1 总体结果

	1st Trimester (n=467)	2nd Trimester (n=458)	3rd Trimester (n=433)
Median gestational age (wk) (range)	12.3 (10.7–14.7)	18.0 (15.1–24.4)	28.7 (26.0–32.4)
Inconclusive results (%)	5.6	5.7	6.1
False-positive	1.54 (0.42–5.44)	1.53 (0.42–5.40)	0.82 (0.04–4.50)
False-negative	0.32 (0.08–1.78)	0 (0–1.26)	0 (0–1.37)
Sensitivity	99.68 (98.22–99.94)	100 (98.74–100)	100 (98.63–100)
Specificity	98.46 (94.56–99.58)	98.47 (94.60–99.58)	99.18 (95.50–99.96)
Accuracy	99.32 (98.03–99.77)	99.53 (98.33–99.87)	99.75 (98.59–99.99)

数据%（95%置信区间），除非另有说明。

4 讨论

本研究发现循环细胞游离 DNA 在确定胎儿 RhD 状态方面具有高度准确性。该结果不受抽取母体样本时孕期的影响。

循环细胞游离 DNA 检测的假阳性和不确定结果将导致不必要地使用产前 RhIG；但是，不会有致敏的风险。常规使用循环细胞游离 DNA 来确定是否需要产前 RhIG 的一个缺点是胎儿被错误地确定为 RhD 阴性而没有给予 RhIG。因此，循环细胞游离 DNA 的这种假阴性结果将导致错过预防同种免疫的机会。在我们的研究中，这只发生在妊娠早期血液采样时，发生率 0.32%。荷兰最近的一项研究指出，没有 RhIG 的产前同种免疫仅发生在 0.31%（95%CI 0.21-0.41%）的病例中。¹¹ 在出生时使用脐带血清学，将纠正罕见的循环细胞游离 DNA 错误，且可以产后施用 RhIG。

本研究中不确定的结果主要是由于 RHD 假基因的存在。RHD 假基因是一种 RHD 基因的 DNA 变异，其中存在通常 RHD 基因的所有外显子，但也存在一个阻止翻译成 RhD 抗原的终止密码子。假基因纯合或半合子患者为 RhD 血清阴性，而携带 1 拷贝野生型 RHD 基因和 1 拷贝假基因的杂合子患者

为血清阳性。携带假基因的 22 例患者中有 14 例（63%）属于非裔美国人。这并不奇怪，因为以前的研究已报道在这个种族人群中存在 24% 的 RHD 假基因。¹² 我们的测定不能确定母亲或胎儿是否是 RHD 假基因的携带者；因此，结果报告为“不确定”，并带有检测到假基因的注释。在这 22 名患者中，三分之二的新生儿被发现血清学 RhD 阳性，表明他们的母亲是 RHD 假基因的来源。因此将指示这些患者施用 RhIG。其他三分之一的新生儿（n=7）被发现血清学 RhD 阴性，因此胎儿（可能还有母亲）是 RHD 假基因的来源。在这些情况下，RhIG 是不必要的。

本研究共有 15 组双胞胎和 2 组三胞胎。然而，只有其中 1 组双胞胎之间的 RhD 不一致；在这种情况下，母亲样本被正确报告为 RHD 阳性。据报道，与单胎妊娠相比，双胞胎的游离 DNA 水平较低。¹³ 这可能与这种妊娠中已知的母体血容量增加的稀释效应有关。此外，在 RhD 阳性的“消失”双胞胎的临床情况下，对于剩余的 RhD 阴性双胞胎可能会导致看似假阳性的诊断。¹⁴ 在这种情况下，将指示 RhIG 施用，尽管在存活的双胞胎出生后，将确定 RhIG 的产前施用是不必要的。本研究中提供的有限数据不允许我们评估循环细胞游离 DNA 在确定多胎妊娠中每个胎儿的 RhD 状态中的准确性。

在美国实施对所有 RhD 阴性女性使用循环细胞游离 DNA 确定胎儿 RhD 类型的常规无创筛查，相比在妊娠 28 周常规 RhIG 给药，每年可节省超过 150 万剂 RhIG。在其他产前事件如前置胎盘出血或侵入性手术时，也可以避免额外剂量的这种血液制品。这些成本节约必须抵消检测的成本。英国和魁北克的成本分析报告都认为这种政策成本高；而加拿大阿尔伯塔省的报告认为这种政策具有成本效益。¹⁵⁻¹⁷ Hawk 等¹⁸ 进行了成本分析，发现只有当检测价格为 119 美元或 RhIG 成本升至 825 美元时，循环细胞游离 DNA 方法才不会给美国医疗保健系统增加额外成本。

本研究的优势在于在 17 个不同临床地点招募了大量患者。一个局限性是入组的大多数患者是白人（87%），13% 非裔美国人，只有少数患者代表其他种族。尽管研究人群代表了美国人群中 RhD 阴性的发生率，但来自非高加索人的少量样本可能会限制目前循环细胞游离 DNA 检测对其他人群的有效性。当前研究的另一个弱点是样品不是前瞻性运行的，而是冷冻并分批进行分析。在 72 小时窗口之外到达实验室的样品未进行评估，因为在此时间范围之外尚未分析稳定性。在临床情况下，对于在美国各地运送样品，72 小时窗口可能很窄。自本研究完成以来，循环细胞游离 DNA 现在常规收集在 Streck BCT 采血管中，该采血管含有无甲醛防腐剂，可使 DNA 稳定长达 5 天。使用这些收集管可以缓解样品延迟运输的问题。

总之，循环细胞游离 DNA 提供了准确确定胎儿 RhD 状态的手段。妊娠 10 周后胎儿 RhD 状态的孕早期评估可能是决定哪些 RhD 阴性孕妇应接受产前 RhIG 的有用工具。这种实践上的改变每年将避

免向大约 150 万美国妇女不必要地施用血液制品。

应进行成本分析和敏感性分析，以确定维持美国医疗保健系统成本适中的循环细胞游离 DNA RHD 检测的成本。

参考文献

1. Lo YM, Bowell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MD, et al. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. *Lancet* 1993;341:1147–8.
2. Zhu YJ, Zheng YR, Li L, Zhou H, Liao X, Guo JX, et al. Diagnostic accuracy of non-invasive fetal RhD genotyping using cell-free fetal DNA: a meta analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014;27:1839–44.
3. Bombard AT, Akolekar R, Farkas DH, VanAgtmael AL, Aquino F, Oeth P, et al. Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negative women. *Prenat Diagn* 2011;31:802–8.
4. Moise KJ Jr, Argoti PS. Management and prevention of red cell alloimmunization in pregnancy: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2012;120:1132–9.
5. Kent J, Farrell AM, Soothill P. Routine administration of Anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. *BMC Pregnancy Childbirth* 2014;14:87.
6. Clausen FB, Christiansen M, Steffensen R, Jørgensen S, Nielsen C, Jakobsen MA, et al. Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in D- pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion* 2012;52:752–8.
7. Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, Olsson ML, Westgren M, Reilly M. Noninvasive single-exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 2012;120:227–34.
8. Moise KJ Jr, Boring NH, O’Shaughnessy R, Simpson LL, Wolfe HM, Baxter JK, et al. Circulating cell-free fetal DNA for the detection of RHD status and sex using reflex fetal identifiers. *Prenat Diagn* 2013;33:95–101.
9. Bombard AT, Akolekar R, Farkas DH, VanAgtmael AL, Aquino F, Oeth P, et al. Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negative women. *Prenat Diagn* 2011;31:802–8.
10. Morris S, Gel ES, Smith JV, Paulauskis JD, Boom DV, Oeth P, et al. Two algorithms for biospecimen comparison and differentiation using SNP genotypes. *Pharmacogenomics* 2013;14:379–90.
11. Koelewijn JM, de Haas M, Vrijkotte TG, Bonsel GJ, van der Schoot CE. One single dose of 200 microg of antenatal RhIG halves the risk of anti-D immunization and hemolytic disease of the fetus and newborn in the next pregnancy. *Transfusion* 2008; 48:1721–9.
12. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 2000; 95:12–8.
13. Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaidis KH, Ordoñez E, Cirigliano V, Dierickx H, et al. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:61–6.
14. Thurik FF, Ait Soussan A, Bossers B, Woortmeijer H, Veldhuisen B, Page-Christiaens GC, et al. Analysis of false-positive results of fetal RHD typing in a national screening program reveals vanishing twins as potential cause for discrepancy. *Prenat Diagn* 2015; 35:754–60.
15. Szczepura A, Osipenko L, Freeman K. A new fetal RHD genotyping test: costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. *BMC Pregnancy Childbirth* 2011;11:5.
16. Duplantie J, Martinez Gonzales O, Bois A, Nshimyumukiza L, Gekas J, Bujold E, et al. Cost-effectiveness of the management of rh-negative pregnant women. *J Obstet Gynaecol Can* 2013; 35:730–40.
17. Teitelbaum L, Metcalfe A, Clarke G, Parboosingh JS, Wilson RD, Johnson JM. Costs and benefits of non-invasive fetal

RhD determination in Alberta. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45: 84–8.

18. Hawk AF, Chang EY, Shields SM, Simpson KN. Costs and clinical outcomes of noninvasive fetal RhD typing for targeted prophylaxis. *Obstet Gynecol* 2013;122:579–85.

6. 《RhD 阴性妇女胎儿 RhD 状态的高通量无创产前检测：一项系统综述和荟萃分析》

作者：Huiqin Yang 1, Alexis Llewellyn 2, Ruth Walker 2, Melissa Harden 2, Pedro Saramago 3, Susan Griffin 3, Mark Simmonds 2

作者单位：1 英国埃克塞特大学医学院；2 英国约克大学评论和传播中心；3 英国约克大学卫生经济学中心。

摘要

背景：对于发现携带 RhD 阴性胎儿的 RhD 阴性妇女，对胎儿 RhD 状态的高通量无创产前检测（NIPT）可以避免不必要的抗 D 免疫球蛋白治疗。我们的目的是通过进行系统综述和荟萃分析，评估高通量 NIPT 对已知对 RhD 抗原未致敏的 RhD 阴性女性胎儿 RhD 状态的诊断准确性。

方法：纳入用于确定胎儿 RhD 状态的高通量 NIPT 前瞻性队列研究。符合条件的人群是 RhD 阴性且已知对 RhD 抗原未致敏的孕妇。指标测试是用于确定胎儿 RhD 状态的母体血浆的高通量、NIPT 细胞游离胎儿 DNA 测试。考虑的参考标准是出生时的血清学脐血检测。截至 2016 年 2 月，对 MEDLINE、EMBASE 和 Science Citation Index 数据库进行了搜索。两名审稿人独立筛选标题和摘要，并评估被认为可能相关的全文。使用 QUADAS-2 评估偏倚风险。拟合双变量和分层汇总受试者操作特征（HSROC）模型，以计算灵敏度、特异性、假阳性和假阴性率的汇总估计，以及相关的 95% 置信区间（CI）。

结果：通过电子检索共发现 3921 份参考文献记录。8 项研究被纳入本系统综述。有 6 项研究被认为存在低偏差风险。HSROC 模型证明高通量 NIPT 检测对妊娠 11 周或之后接受检测的女性具有高诊断性能。在诊断准确性的初步分析中，检测结果不确定的女性被视为阳性。假阴性率（错误分类为 RhD 阴性）为 0.34%（95%CI 0.15-0.76），假阳性率（错误分类为 RhD 阳性）为 3.86%（95%CI 2.54-5.82）。关于非白人女性和多胎妊娠的证据有限。

结论：高通量 NIPT 足以准确检测 RhD 阴性妇女的胎儿 RhD 状态，并可显著减少常规抗-D 免疫球蛋白的不必要治疗。这些发现是否适用于非白人妇女和多胎妊娠妇女尚不确定。

1 引言

RhD 阴性血型的孕妇可能携带 RhD 阳性胎儿。母体循环中胎儿 RhD 阳性细胞的存在可导致 RhD 阴性的母亲产生针对 RhD 抗原的抗 D 抗体。这种称为致敏的免疫反应可以在妊娠期间的任何时间发生，但最常见于妊娠晚期和分娩期间[1]。

致敏过程本身对母亲没有不良影响，通常不会影响其发生的妊娠。然而，如果已对 RhD 抗原致敏的妇女随后再次妊娠 RhD 阳性胎儿，则该妇女的抗 D 抗体可能穿过胎盘，导致胎儿和新生儿溶血病（HDFN）。

这可能导致严重的胎儿贫血，导致胎儿心力衰竭、体液滞留和肿胀（水肿）、高胆红素血症、核黄疸和围产期死亡[2]。

用抗 RhD 免疫球蛋白预防可以显著降低 RhD 阴性妇女致敏的风险，从而降低 HDFN 的患病率[3]。在妊娠晚期引入常规产前预防导致致敏性降低，导致 HDFN 相关死亡率从 1969 年以前的 100000 例新生儿中的 46 例降至 1991 年的 100000 例新生儿中的 1.6 例[4]。

目前，英国国家健康与临床卓越研究所（NICE）产前保健指南建议女性应在妊娠早期进行血型 and RhD 状态检测[5]。在鉴定为 RhD 阴性且没有预先形成的抗体的那些女性中，推荐施用抗 D 免疫球蛋白作为预防，以及在潜在致敏事件后施用抗 D 免疫球蛋白以防止致敏发生。常规产前预防时抗 D 免疫球蛋白剂量可以是在妊娠 28 周和 34 周给两剂，或在 28-30 周内给一剂[5]。

胎儿 RhD 状态的非侵入性产前检查（NIPT）使用实时定量聚合酶链反应（PCR）方法检测细胞游离胎儿 DNA——母体血浆中游离循环的从胎盘脱落的细胞外 DNA 小片段。高通量 NIPT 使用能够同时进行大量测试的自动化平台进行测试，因此适用于孕妇的大规模人群筛查。用于胎儿 RhD 状态的高通量 NIPT 可以使预测携带 RhD 阴性胎儿的 RhD 阴性女性不使用抗 D 免疫球蛋白。发现携带 RhD 阴性胎儿的孕妇可以避免使用抗 D 免疫球蛋白（一种人多克隆血浆衍生产品）进行不必要的治疗，以及与血液制品给药相关的潜在风险。此外，这些女性在潜在致敏事件后可能不需要提供抗 D 免疫球蛋白，并且分娩时可能不再需要进行血清学脐血检测。高通量 NIPT 已经在一些欧洲国家以这种方式使用[6,7]。

然而，高通量 NIPT 对未知是否对 RhD 抗原致敏的 RhD 阴性妇女的胎儿 RhD 状态的诊断准确性尚不确定。美国国立卫生研究院卫生技术评估计划委托进行系统评价和经济评估，以评估高通量 NIPT 检测 RhD 阴性妇女胎儿 RhD 状态的诊断准确性和成本效益。该系统评价是关于高通量 NIPT 的更大报告的一部分，该报告还考虑了其临床价值和实施以及全面经济分析中的更广泛问题[8]。这项工作被用来给最新的 NICE 指南关于高通量 NIPT 检测胎儿 RhD 状态的建议提供信息[9]。

2 方法

最初更广泛评价的完整方法学在其他地方有报道[8]。本节总结了诊断准确性评价的方法学。

2.1 数据源和搜索

我们根据 PRISMA 声明[10]进行系统评价，并在 PROSPERO 上注册本评价。对以下数据库搜索从建库到 2015 年 11 月的相关研究：MEDLINE，MEDLINE In-Process，CINAHL，Cochrane 对照试验注册中心（CENTRAL），Cochrane 系统评价数据库（CDSR），效果评价摘要数据库（DARE），EMBASE，健康技术评估（HTA）数据库，妇幼保健，PubMed，和科学引文索引。此外，在以下资源搜索正在进行的、未发表的或灰色文献：ClinicalTrials.gov，会议记录引文索引：科学，欧盟临床试验注册，PROSPERO 和 WHO 国际临床试验注册平台门户。2016 年 2 月进行了更新搜索。

已发表和未发表的文献都是通过系统搜索电子资源、与该领域专家协商以及相关系统评价和纳入研究的参考检查确定的。搜索策略由一位信息专家开发，见表 S1。

表 S1 MEDLINE 搜索策略

1	Rh-Hr Blood-Group System/ (10006)
2	(RhD or "rhesus D" or "Rh(D)" or "Rh-(D)" or Rh D).ti,ab. (3323)
3	(Rh-negative or Rh-positive).ti,ab. (898)
4	(Rhesus negative or Rhesus positive).ti,ab. (228)
5	((rh or rhesus) adj2 (factor or factors or antigen\$ or system or group)).ti,ab. (3438)
6	or/1-5 (13812)
7	Rh Isoimmunization/ (1505)
8	((isoimmuni\$ or iso-immuni\$ or isoimmune or iso-immune) adj6 (rh or rhesus or maternal or pregnan\$)).ti,ab. (1164)
9	((alloimmuni\$ or allo-immuni\$ or alloimmune or allo-immune) adj6 (rh or rhesus or maternal or pregnan\$)).ti,ab. (870)
10	((unsensiti#ed or un-sensiti#ed or non-sensiti#ed) adj6 (rh or rhesus or maternal or pregnan\$)).ti,ab. (25)
11	((sensiti#ation\$ or sensiti#ed) adj6 (rh or rhesus or maternal or pregnan\$)).ti,ab. (1074)
12	((fetomaternal or feto-maternal or foetomaternal or foeto-maternal) adj2 immuni#ation).ti,ab. (80)
13	((rh or rhesus) adj2 (immuni#ation or autoimmuni#ation)).ti,ab. (695)
14	or/7-13 (4428)
15	exp Erythroblastosis, Fetal/ (11006)
16	((hemolytic or haemolytic) adj2 (disease\$ or disorder\$)).ti,ab. (4465)
17	HDFN.ti,ab. (95)
18	((rhesus or rh) adj2 (disease\$ or disorder\$)).ti,ab. (742)
19	((rhesus or rh or RhD) adj2 (incompatib\$ or antagonism)).ti,ab. (750)
20	((erythroblastoses or erythroblastosis) adj2 f?etal\$).ti,ab. (760)
21	or/15-20 (13551)

22	6 or 14 or 21 (25723)
23	Prenatal Diagnosis/ (33273)
24	Maternal Serum Screening Tests/ (153)
25	Hematologic Tests/ (5564)
26	((prenatal or pre-natal or antenatal or ante-natal) adj3 (test\$ or screen\$ or diagnos\$ or determin\$ or detect\$)).ti,ab. (32925)
27	((fetal or foetal or fetus\$ or foetus\$) adj3 (test\$ or screen\$ or diagnos\$ or determin\$ or detect\$)).ti,ab. (20036)
28	(NIPD or NIPT).ti,ab. (328)
29	or/23-28 (69981)
30	Genotyping Techniques/ (2761)
31	((genotype\$ or genotyping) adj2 (fetal or foetal or fetus\$ or foetus\$ or prenatal or pre-natal or antenatal or ante-natal)).ti,ab. (606)
32	((genotype\$ or genotyping) adj2 (maternal or pregnan\$)).ti,ab. (789)
33	((genotype\$ or genotyping) adj2 (noninvasive or non-invasive)).ti,ab. (71)
34	cell-free fetal DNA.ti,ab. (489)
35	cffDNA.ti,ab. (87)
36	or/30-35 (4483)
37	22 and 29 (1795)
38	22 and 36 (276)
39	37 or 38 (1869)
40	(editorial or comment).pt. (946538)
41	39 not 40 (1824)
42	exp animals/ not humans/ (4137930)
43	41 not 42 (1815)

2.2 研究选择

用于确定胎儿 RhD 状态的高通量 NIPT 的前瞻性队列研究符合纳入标准。我们认为使用自动化平台（包括自动 DNA 提取和液体处理）进行、能够快速处理大量样品、以大规模筛选为目标的 NIPT 测试是高通量的。该试验用于诊断（而不是筛查）致敏妇女的研究被排除在外。

人群的纳入标准、指标测试、参考标准和结果如下：

- 符合条件的人群是 RhD 阴性且不知道是否对 RhD 抗原致敏的孕妇。
- 指标测试是用于确定胎儿 RhD 状态的母体血浆的高通量 NIPT 细胞游离胎儿 DNA 测试。
- 考虑的参考标准是出生时的血清学脐带血检测。
- 符合条件的研究必须报告诊断准确性数据，例如真阳性、假阳性、真阴性和假阴性检测结果的绝对数量。

两名研究人员独立筛选搜索策略确定的所有报告的标题和摘要，随后获得全文进行评估。仅搜索以英文发表的报告。出版日期没有限制。获得所有被认为可能相关的研究的全文副本，两位审阅

者独立评估它们是否纳入。任何分歧均由协商或第三位审阅者解决。

2.3 数据提取

对于一项给定研究有多份报告，或者当我们不能排除重叠人群的可能性时，我们选择最新或最完整的报告。一位审阅者独立从全文研究中提取细节，包括研究设计、参与者、指标、比较和参考标准测试，以及结果数据。数据提取由另一位审阅者检查。任何分歧都是通过协商或第三位审阅者解决的。

我们提取了每个研究中评估的每个指标测试的真阳性、真阴性、假阳性和假阴性的数量，以构建 2×2 表。如果报告，我们提取未确定或无法解释的结果数量的数据。如果某些数据不清楚或缺失，则联系研究作者。

2.4 质量评估

使用诊断准确性研究质量评估 (QUADAS-2) 检查表的修改版本评估偏倚风险[11]。QUADAS-2 工具由四个关键部分组成：(1) 患者选择，(2) 指标测试，(3) 参考标准，以及 (4) 患者通过研究、指标测试和参考标准的流程。根据偏倚风险评估每个部分。前三个部分也要评估它们的 (1) 参与者和环境，(2) 指数测试或解释，以及 (3) 参考标准定义的目标条件是否适用于英国的情况。一位审阅者根据偏倚风险独立评估所有纳入研究的质量。质量评估由另一位审阅者检查。任何分歧均由协商或第三位审阅者解决。

2.5 数据综合

对于诊断准确性结果，计算敏感性、特异性以及假阳性和假阴性率的估计值，并在森林图和受试者工作特征 (ROC) 曲线中呈现，以评估研究内和研究之间测试准确性的异质性。分层双变量模型[12]适用于计算敏感性、特异性、假阳性和假阴性率以及相关 95% 置信区间 (CI) 的总结估计。拟合分层汇总 ROC (HSROC) 模型[13]以产生汇总 ROC 曲线。两种模型共同模拟敏感性和特异性，并考虑它们之间的相关性。敏感性和特异性的异质性也使用 I^2 统计量进行评估。所有分析均使用 R 软件进行[14,15]。由于 NIPT 检测非常准确，我们根据假阳性率 (FPR) (误检为阳性并提供不必要的抗 D 预防) 和假阴性率 (FNR) (误检为阴性；因为女性不接受抗 D 预防而有致敏风险) 而不是传统的敏感性和特异性来表示结果。

一些 NIPT 结果是不确定的，无法预测胎儿的 RhD 状态。目前英国的做法是将这种检测结果视为

预测 RhD 阳性胎儿，这种方法被用于诊断准确性的主要分析。通过纳入和排除这些不确定的测试结果进行敏感性分析以探索结果的稳健性。进一步的敏感性分析仅包括英国（布里斯托尔）的研究，因为本综述旨在为英国的实践提供信息。此外，由于测试准确性可能根据 NIPT 进行时的妊娠期而变化，我们通过绘制诊断准确性与时间的关系图，并对测试时间进行元回归来调查测试时间的影响。没有对小研究效果或发表偏倚进行分析，因为确定的研究太少，无法证明。

3 结果

数据库的文献检索确定了 3921 篇参考文献。在对标题和摘要进行初步筛选后，227 个被认为具有潜在相关性，并被排序进行全文筛选。总共有 8 项研究[6,7,16-19]被纳入高通量 NIPT 检测的诊断评价。6 项研究报告了不一致的结果。图 1 显示了一个流程图，概述了筛选过程，包括排除全文论文的原因。

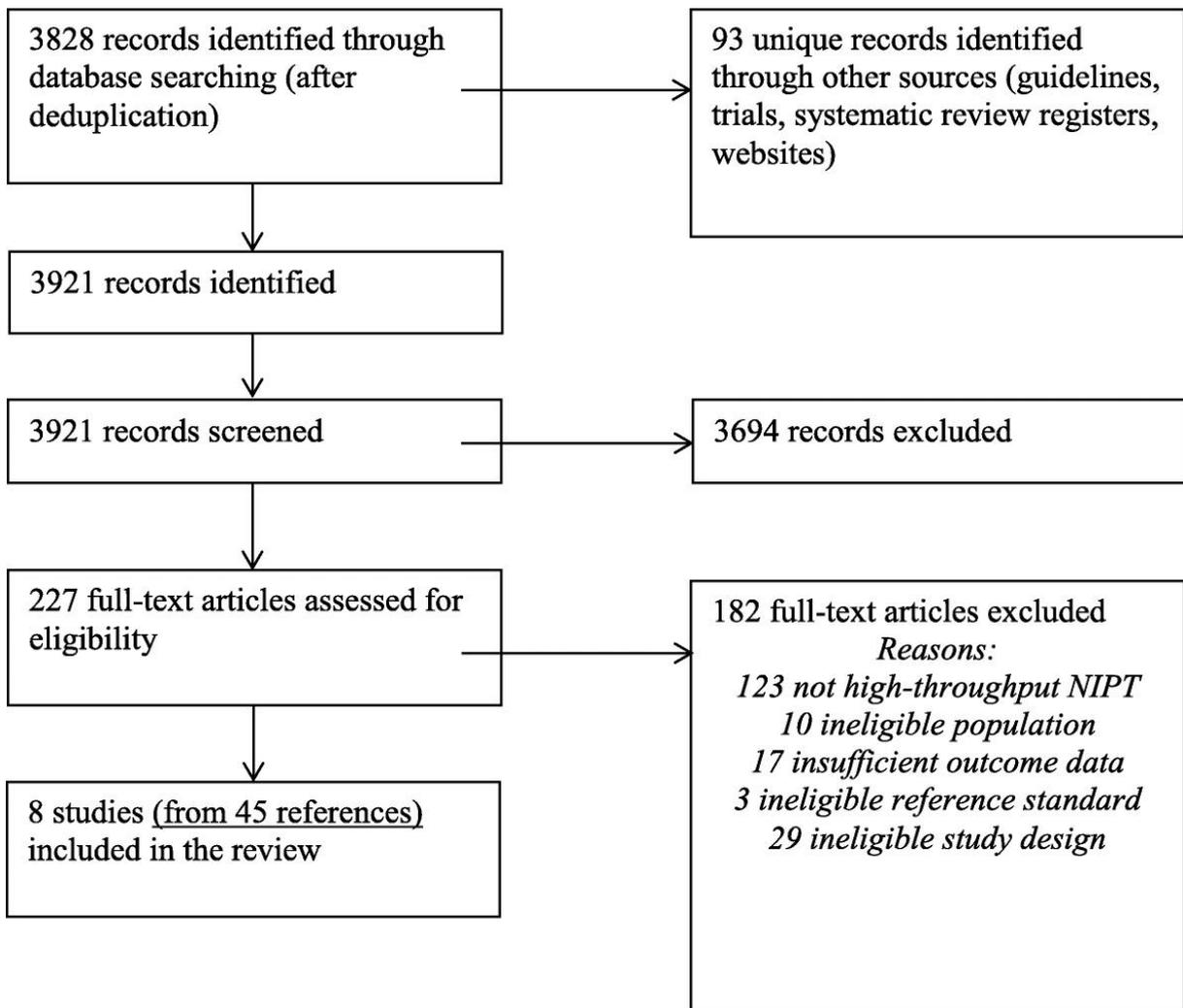


图 1 流程图：研究选择过程

表 1 列出了纳入的诊断准确性研究的特征的总结信息。所有研究均为在欧洲国家进行的前瞻性研究。在英格兰进行了四项研究[16,17,18,19]，其中三项基于布里斯托尔[16,17,18]。研究样本量从 282 到 18383 不等。大多数研究招募了胎龄在 10 到 28 周之间的孕妇。大多数参与者是白人，大多数妊娠是单胎。所有研究均使用母体血浆作为样本来源。所有研究均采用自动 DNA 提取仪。这些研究使用了许多自动化平台，包括 MDx BioRobot, MagNa Pure 96, MagNa Pure LC 和 COBAS AmpliPrep。对于 PCR，除了 Wikman 等[20]的研究（仅靶向外显子 4 并使用 GAPDH DNA 作为对照）外，所有研究的 RHD 测定均靶向至少两个外显子（通常为外显子 5 和 7）和至少两个对照（RhD 阳性 DNA 和 RhD 阴性 DNA）。所有研究中使用的参考标准都是脐血血清学，除了 Akolekar 等[17]没有描述其参考标准。报道的不确定结果的发生率从 1.0%[20]到 14.3%[19]不等。

表 1 诊断准确性研究的特征

Study (First author/year)	Location	DNA extraction tool	Exons targeted	Controls	Reference standard	Gestational age at time of NIPT (median/range)	Sample size ^a	Confirmed RhD positive	Confirmed RhD negative	Inconclusive test results (%)	Reasons for inconclusive results (n of cases)
Akolekar 2011 [19]	UK (London)	MDx BioRobot (Qiagen)	5 and 7	RhD+, RhD-, RhD ^ψ +, No DNA	*Serologically at delivery	12.4 (11-14)	586	410	176	84 (14.3)	Maternal or fetal RHD variant and insufficient maternal plasma for further analysis (NR)
Banch Clausen 2014 [6]	Denmark	QIASymphony SP; MagNA Pure LC; MagNA Pure Compact Instrument (Roche)	5 and 10, or 5 and 7, or 7 and 10	RhD+, RhD- [£]	Cord blood serology [~]	25 (23-28)	12,668	7830	4838	274 (2.2)	Maternal weak D (93); maternal silent RHD variant (38); high level of maternal background DNA (29); technical problems (19); maternal D ^{VI} (14); weak PCR signal (13); suspected maternal RHD positive (3); no reported cause (65)
Chitty 2014 [16]	UK (Bristol)	MDx BioRobot (Qiagen)	5 and 7	RhD+, RhD-, RhD ^ψ +, No DNA	Cord blood serology	19 (5-35)	4913	2890	2023	393 (8.0)	NR
Finning 2008 [17]	UK (Bristol)	MDx BioRobot (Qiagen)	5 and 7	RhD+, RhD-, RhD ^ψ +, No DNA	Cord blood serology [?]	28 (8-38)	1869	1156	713	56 (3.0)	Insufficient DNA (30); suspected maternal RHD gene (25); failure to extract DNA from plasma (1)
Grande 2013 [25]	Spain	COBAS AmpliPrep (Roche)	5 and 7, 10 [§]	RhD+, RhD-	Cord blood serology	24-26	282	186	96	NR	NR
Soothill 2015 [18]	UK (Bristol)	MDx BioRobot (Qiagen)	5 and 7	RhD+, RhD-, RhD ^ψ +, No DNA	Cord blood serology	15-17 (mostly)	499*	315	184	61 (12.2)	NR
Thurik 2015 [7]	Netherlands	MagNa Pure 96 (Roche)	5 and 7	RhD+, RhD-	Cord blood serology [^]	26	18383*	11,283	7100	NR	NR
Wikman 2012 [20]	Sweden	MagNA Pure LC (Roche)	4	GAPDH	Serology from cord blood or citrate samples from newborns [*]	8-40	3291*	2073	1218	32 (1.0)	RHD variant (14); no second sample (18, of which 13 were spontaneous abortions and miscarriages)

α 血液样本数量，除非另有说明；*参加人数；#不包括 8 周前的妊娠；§第二次 DNA 提取，仅用于确认 RHD 阴性结果；£ 也包括多个使用无菌水的无模板对照；! 5 名 DNA 不足的母亲被排除在分析之外，未被归类为不确定 NR：未报告；RhD+：RhD 阳性；RhD-：RhD 阴性；PCR：聚合酶链式反应；GAPDH：3-磷酸甘油醛脱氢酶；~区域 1：用 ID-Card DiaClon ABD-Confirmation for donors (瑞士 DiaMed) 和单克隆抗 D (细胞系 ESD-1M, 175-2) 检测最弱 RhD 类型和部分 D^{VI} 表型；区域 2：用 IgM 单克隆抗 D 克隆 175-2 (DiaMed) 在凝胶基质试验中直接凝集；进一步使用实验室自制 Dw1 抗 D 进行凝胶基质测试，用于初始阴性测试。对于差异，从脐带血中提取 DNA 并测试 RHD 外显子 10，并使用 RH 分型试剂盒 (德国 Biologische Analysensystem) 通过 PCR-SSP 进一步分析；区域 3：用单克隆抗体 Diagast 抗 D IgM (参考号 71000) 直接凝集检测 RHD 阳性。对于意外的阴性反应，额外用抗 D IgG LOR17 进行 IAT，检测 RHD 阴性；区域 4：通过使用 Seraclone 抗 D (RH1) 混合物 Ref 802032 (德国 Biotest) 进行脐带血红细胞的血清学测试；区域 5：在盐水中用 2 种完全抗 D (Medion Diagnostics, IgM 抗

D[MS201]和 Seralone, [Rh1]226) 对脐带血红细胞进行血清学检测。对于两种试剂的反应均小于 3+, 进一步用两种 IgG 抗 D 进行 IAT 研究 D 表达。>未提取脐带血样本 DNA。^使用两种单克隆抗 D 试剂 LHM 59/20 (LDM3) +175-2 和 ESD-1M+175-2, 使用 WA-Diana 系统 (DiaMed) 进行脐带血血清学检测。用 RHD 多重连接依赖性探针扩增 (MLPA) 测定基因组 DNA 分析母体和胎儿 RHD 变异基因。通过 RHD MLPA 研究突变分析和拷贝数变异。由于母体或胎儿 RHD 变异导致的不一致的阳性结果被鉴定并排除在研究之外。排除 PCR 信号较弱的样品。使用 Kleihauer - Betke 检验, 并对白细胞 DNA 进行 15 个系统的多重短串联重复序列 (STR) -PCR, 排除脐带血采集相关的错误。+使用 DiaClon ABO/Rh for Newborns DVI+ gelcards 进行血型分型

3.1 偏倚风险

表 2 总结了偏倚风险评估的结果。大多数纳入的研究被判定为偏倚风险低, 但有两项研究[7,19] 被判定为偏倚风险高。Akolekar 等[19]的研究报道, 目标 RhD 阴性妇女是从一个数据库中选择, 但不清楚这种选择是否是随机进行的。这项研究招募了大部分非洲人 (19.3%), 这可能不代表英国孕妇的一般人群。这可能导致不确定结果的比例高于平均水平 (14.3%)。在这项研究中, 参考标准的特征也很少报道。在 Thurik 等[7]的研究中, 只有 80%的参与者获得了参考标准。没有说明这么多参与者没有进行脐带血血清学检查的原因。该研究还报告说, 其预测算法每天进行判断并根据需要进行修改, 这可能会在诊断准确性估计中引入偏差。

表 2 纳入研究的偏倚风险

Study	Risk of bias				Applicability concerns		
	Patient selection	Index test	Reference standard	Flow and timing	Patient selection	Index test	Reference standard
Akolekar (2011) [19]	High	High	Unclear	Unclear	High	Low	Unclear
Banch-Clausen (2014) [6]	Low	Low	Low	Low	Unclear	Low	Low
Chitty (2014) [16]	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Finning (2008) [17]	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Grande (2013) [25]	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Soothill (2015) [18]	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low	Low
Thurik (2015) [7]	Low	High	Low	High	Low	Low	Low
Wikman (2012) [20]	Low	Low	Low	Low	Unclear	High	Low

High: 偏倚风险高; Low: 偏倚风险低

NIPT 作为一种自动化程序被认为对人为错误的风险有限, 除一项研究外, 所有研究的 RHD 检测都使用了多种对照[20]。NIPT 的指标测试独立于参考标准进行, 认为两者的结果不会互相影响; 因此, 认为纳入偏差风险低。似乎大多数研究前瞻性地从临床实践中招募连续样本。只有三项研究指出, 在筛查计划进行期间, 他们的诊断阈值是预先确定的[6,16,17]。

除两项研究[19,20]外, 其他研究结果都认为高通量 NIPT 适用于全国筛查目的。特别是, Wikman

等[21]的研究中使用的 NIPT 测试仪靶向外显子 4，这与至少靶向两个外显子（5、7 和/或 10）的所有其他纳入研究不同。人们普遍认为，应该靶向外显子 5 和 7 的组合来区分特别存在于非洲血统个体中的假基因 RHD Ψ [22]。

3.2 荟萃分析

双变量荟萃分析的结果如表 3 所示。这些结果表明 NIPT 是一个高度准确的测试。假阴性率（女性不会接受抗 D 预防，因此有致敏风险）非常低，为 0.34%（95%CI 为 0.15 至 0.76）。当对测试结果不确定的女性当做阳性进行治疗时，假阳性率为 3.86%（95%CI 为 2.54 至 5.82）。排除不确定的测试结果将其降低至 1.26%（95%CI 0.87 至 1.83）。因此，大多数假阳性结果发生在测试结果不确定的女性身上。

表 3 假阳性和阴性率的双变量荟萃分析

Analysis case	Number of studies	False negative rate (at risk of sensitisation)		False positive rate (unnecessary anti-D)	
		Estimate (%)	95% CI	Estimate (%)	95% CI
Inconclusive tests treated as test positive	8	0.34	0.15–0.76	3.86	2.54–5.82
Excluding all women with inconclusive test results	8	0.35	0.15–0.82	1.26	0.87–1.83
Studies conducted in Bristol only	3	0.21	0.09–0.48	5.73	4.58–7.16

研究之间有一些不一致的证据。假阴性率的 I^2 为 75%，假阳性率的 I^2 为 99%。应该注意的是，这些高度异质性部分是由于测试高准确性和研究样本量大（和因此导致的小的研究内方差，因为 I^2 随着研究内平均方差下降而增加）。它们不一定表明研究之间存在有临床意义的差异。假阳性率的异质性可能是不同报告和处理不确定测试的结果。

在布里斯托尔进行的研究假阴性率较低（0.21%，95%CI 0.09 至 0.48），因此假阳性率较高（5.73%，95%CI 4.58 至 7.16）。这表明使用 MDx Bio Robot 仪器的布里斯托尔高通量 NIPT 测试方法可能使用与其他国家不同的测试阈值，这进一步最大限度地减少了假阴性结果。

图 2 显示了这个主要分析的双变量和总结 HSROC 曲线的结果，以假阳性和假阴性率表示。黑色圆圈是来自双变量模型的总结效应估计，黑色曲线是 HSROC 曲线。该图显示，除了两项偏远的研究 [19,20] 外，这些研究在假阴性结果方面基本一致。Wikman 等[20]在妊娠早期进行了大多数 NIPT 试验，早于其他研究。这些研究在假阳性率方面不太一致。这很可能是因为这些研究有不同数量的不确定的测试结果，以及处理这些结果的不同方法。【注：图 2 未能找到，文献显示的图 2 明显是图 S1（不同胎龄 NIPT 假阳性率）】

3.3 NIPT 测试的时间安排

图 3 显示不同胎龄高通量 NIPT 测试假阴性率。这表明，孕早期后（即约 13 妊娠周后）假阴性率是一致的，与时间无关，但在孕早期内假阴性率较高。这种模式在 Chitty 研究[16]中最为明显，该研究报告了一系列测试时间的诊断准确性。鉴于数据量有限，无法进行正式的统计检验来证实这一结论。图 S1 显示不同胎龄高通量 NIPT 测试假阳性率。此图没有明显的模式。

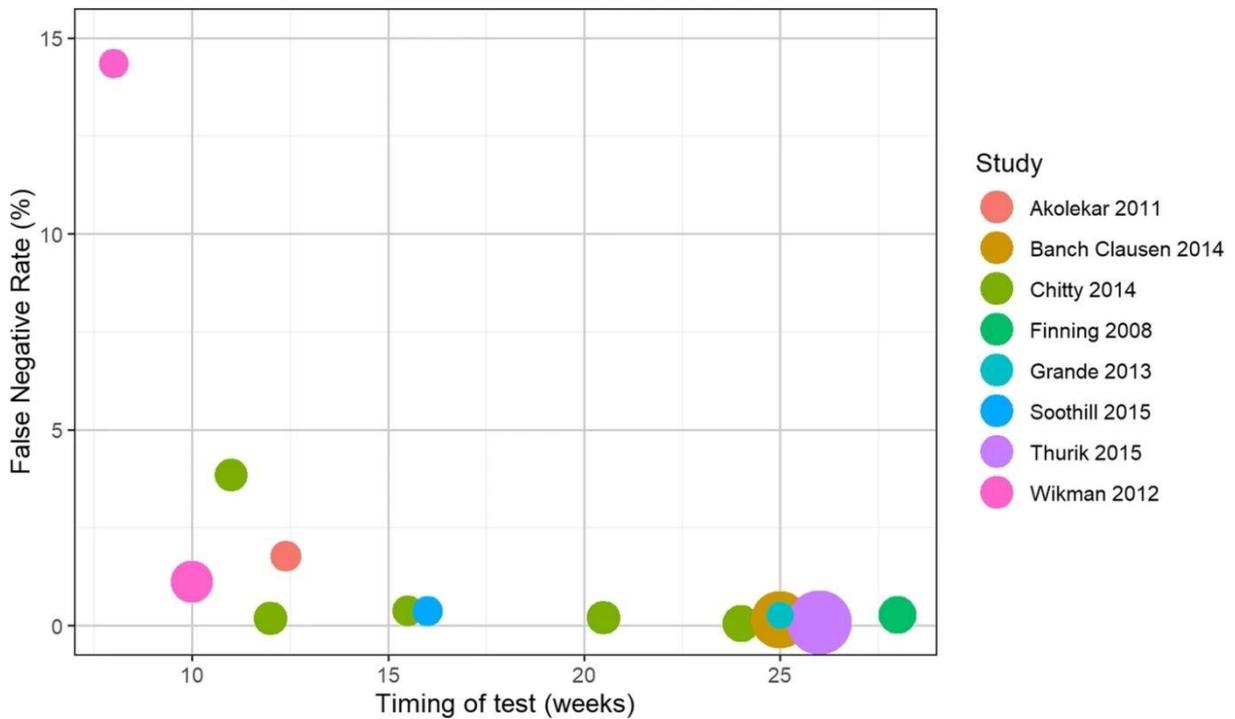


图 3 不同胎龄 NIPT 假阴性率

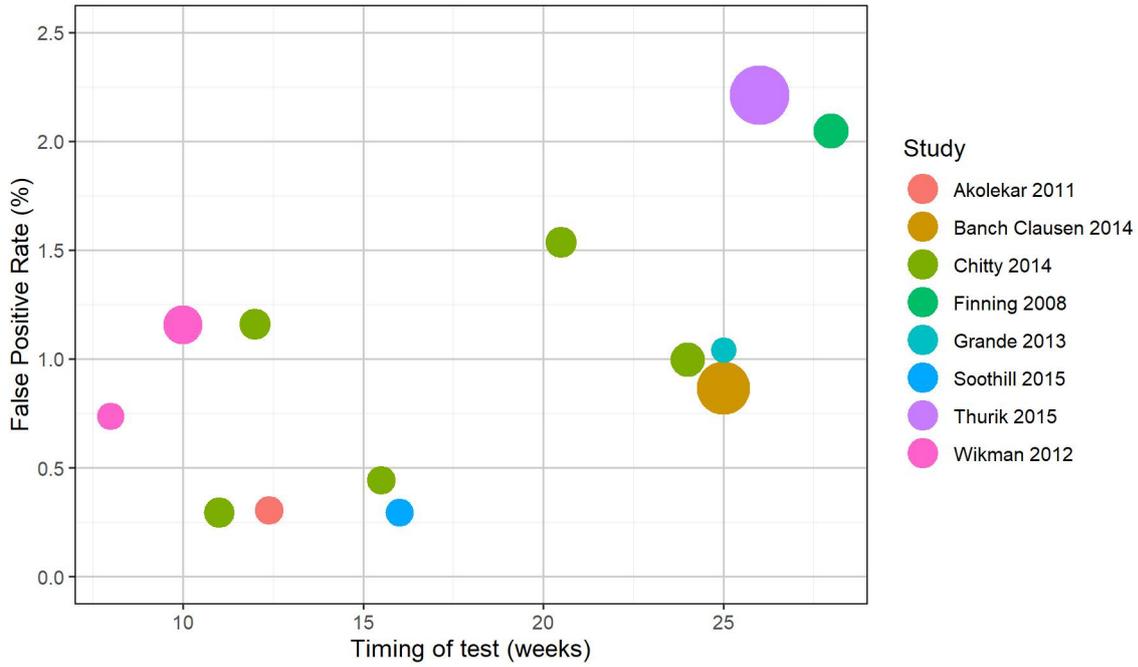


图 S1 不同胎龄 NIPT 假阳性率

我们还评估了高通量 NIPT 测试时间对不确定测试结果数量的影响。如图 S2 所示，提示该测试的不确定结果的百分比随着胎龄的增加而降低。这在 Chitty 等[16]的研究中最为明显。

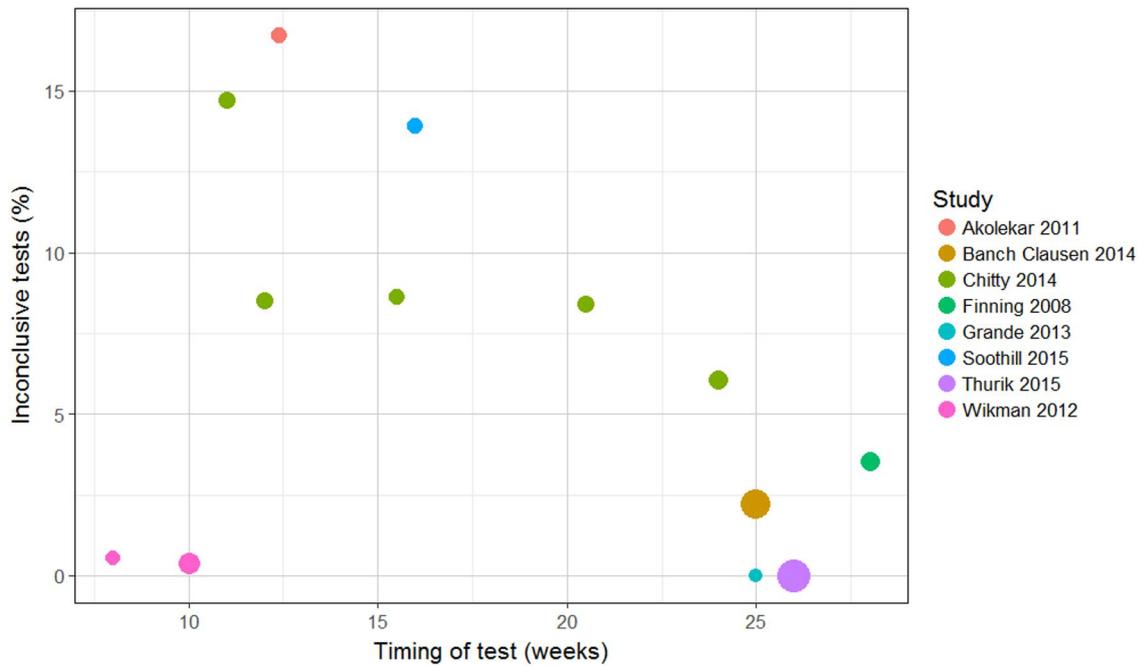


图 S2 不同胎龄 NIPT 不确定结果率

3.4 对英国实践的影响

我们通过进行模拟研究来考虑在英国实施 NIPT 指导抗 D 预防的可能影响，使用来自本综述的数据模拟英国人群的代表性（输入参数见表 S2）。

表 S2 从已发布数据得出的概率估计值，用于模拟研究

概率	估计值	来源
Rh 阳性胎儿	60.7%	基于布里斯托尔的诊断研究
Rh 阳性胎儿（有不确定 NIPT）	70.7%	基于布里斯托尔的诊断研究
假阴性 NIPT 检测	0.21%	诊断性荟萃分析（布里斯托尔研究）
不确定 NIPT 检测	6.7%	基于布里斯托尔的诊断研究
假阳性检测（如果确定）	1.5%	诊断性荟萃分析（布里斯托尔研究）*
遵守产前抗 D（无 NIPT）	99%	2013 年英国审计
应用 NIPT	96%	De Haas 2012 (临床有效性评估)
遵守产后抗 D	99%	2013 年英国审计
遵守产前抗 D（如果拒绝或错过 NIPT 检测）	80%	Soothill (2015) (临床有效性评估)
遵守产前抗 D（如果 NIPT 不确定）	99%	Soothill (2015)
在阴性 NIPT 妇女中应用产前抗 D	6%	Soothill (2015)
NIPT 后遵守产后抗 D	99%	没有数据。假设与无 NIPT 相同
用产前抗 D 和产后抗 D，致敏	0.35%	Pilgrim et al 2009 HTA 报告
仅用产后抗 D，致敏	0.95%	Pilgrim et al 2009 HTA 报告
未用抗 D，致敏	10.7%	From Pilgrim, and Crowther et al. 1997
致敏妇女中随后的妊娠	62%	Chitty (2014)使用，未给出来源
致敏妇女中 RhD 阴性胎儿死亡	5%	Chitty (2014)使用，未给出来源

根据三项布里斯托尔研究的结果，我们假设 60.7% 的 RhD 阴性女性有 RhD 阳性胎儿，6.7% 的女性有不确定的 NIPT 结果。鉴于上述假设、诊断性荟萃分析结果和附加文件 4 中描述的参数，使用 NIPT 将导致 65.9% 的 RhD 阴性女性接受抗 D 预防。这将使接受不必要的抗 D 药物的妇女人数从 38.9% 减少到 5.7%。错过潜在有益抗 D 药物的女性人数将从 0.6% 上升到 1.2%，导致潜在的更多致敏：如果产后脐带血检测继续进行，则每 10 万名女性额外增加 3 名，如果不再进行，则每 10 万名女性增加 13 名。使用普遍抗 D 给药的致敏率估计为每 100000 名妇女 280 人，因此这种增加很小。

然而，这意味着 0.12% 的 RhD 阳性胎儿的妇女不会接受抗 D 治疗，因此有致敏的风险。

4 讨论

在本系统评价中，我们确定了 8 项评估高通量 NIPT 诊断准确性的研究。其中 6 项研究被判定为偏倚风险低。Meta 分析显示高通量 NIPT 测试的诊断准确性非常高。

高通量 NIPT 的诊断准确性因胎龄而异。数据表明，高通量 NIPT 测试在妊娠早期不够准确，但在此后的任何时间都始终准确。这可能是由于妊娠早期细胞游离胎儿 DNA 浓度低[23]，而妊娠早期结束后细胞游离胎儿 DNA 浓度增加[24]。

鉴于高通量 NIPT 检测的诊断准确性非常高，在全国所有 RhD 阴性妇女中实施高通量 NIPT 进行胎儿 RhD 筛查是可行的。结果表明，它将大大减少对产前抗 D 预防的需求，同时仅略微增加由于假阴性测试结果而致敏的风险。从妊娠中期开始的任何时候（可能与常规产前血液检查一致）都可以进行 NIPT 检测，假阳性率低。任何全国性的 NIPT 筛查计划都需要仔细的后勤管理，以确保将血液样本运送到实验室并快速检测，并将结果可靠地返回给全科医生和助产士。

4.1 限制

我们进行了广泛的文献检索，试图最大限度地检索潜在的相关研究。其中包括对各种书目数据库进行电子检索，以及筛选临床试验登记册和会议记录以确定未发表的研究。但是，只包括英文研究；因此，可能错过了一些潜在相关的非英文研究。诊断准确性研究的荟萃分析显示有一些不一致。观察到的异质性可能是由于高通量 NIPT 使用的方法不同（例如，使用不同的诊断准确度阈值，以及靶向外显子的不同数量和类型，测试时的胎龄，以及处理不确定测试结果的不同方法）。此外，纳入研究的报告也有差异。特别是，两项研究[7,25]没有报告测试结果不确定的数量，一些研究没有报告结果不确定的详细原因。模拟研究假设输入概率是准确的，并且没有考虑其估计中的任何不确定性。因此，模拟研究的结果应该被认为只是说明性的，而不是确切的效果估计。

4.2 对未来研究的启示

需要进一步的大型前瞻性队列研究来评估非白种女性高通量 NIPT 的诊断准确性。这是特别值得关注的，因为非白人女性更可能有不太准确的测试结果。例如，在非洲裔人群中，由于存在 RHD 假基因[26]，产前检测来自母体血液的胎儿 RhD 类型将导致该特定人群中假阳性结果的较高比率。还需要进一步研究以改进 NIPT 测试本身，特别是为了减少不确定测试结果的数量。

5 结论

这项系统评价的结果表明，在 11 或以后的妊娠周进行的高通量 NIPT 对 RhD 阴性女性胎儿 RhD 状态的检测具有很高的诊断性能，假阳性和假阴性率非常低。使用高通量 NIPT 检测作为 RhD 阴性妇女胎儿 RhD 状态的常规筛查试验，可以在很大程度上消除不必要的预防性抗 D 治疗暴露。由于证据有限，NIPT 在非白人妇女和多胎妊娠中的准确性尚不清楚。

参考文献

1. Urbaniak SJ, Greiss MA. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev.* 2000;14(1):44–61.
2. Murray NA, Roberts IA. Haemolytic disease of the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2007;92(2):F83–8.
3. Kumar S, Regan F. Management of pregnancies with RhD alloimmunisation. *BMJ.* 2005;330(7502):1255–8. <https://doi.org/10.1136/bmj.330.7502.1255>.
4. Pilgrim H, Lloyd-Jones MRA. Routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD negative women: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2009;13:1–126.
5. National Institute for Health and Care Excellence. Routine antenatal anti-D prophylaxis for women who are rhesus D negative (TA156). London: National Institute for Health and Care Excellence; 2008.
6. Banach Clausen F, Steffensen R, Christiansen M, et al. Routine noninvasive prenatal screening for fetal RHD in plasma of RhD-negative pregnant women - 2 years of screening experience from Denmark. *Prenat Diagn.* 2014;34(10):1000–5. <https://doi.org/10.1002/pd.4419>.
7. Thurik FF, Ait Soussan A, Bossers B, et al. Analysis of false-positive results of fetal RHD typing in a national screening program reveals vanishing twins as potential cause for discrepancy. *Prenat Diagn.* 2015;35(8):754–60. <https://doi.org/10.1002/pd.4600>.
8. Saramago P, Yang H, Llewellyn A, Walker R, Harden M, Palmer S, Griffin S, Simmonds M. High-throughput non-invasive prenatal testing for fetal rhesus D status in RhD-negative women not known to be sensitised to the RhD antigen: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2018;22(13):1–172. (<https://www.nice.org.uk/guidance/dg25>).
9. High-throughput non-invasive prenatal testing for fetal RHD genotype: NICE Diagnostics guidance [DG25]; National Institute for Health and Care Excellence (NICE) November 2016.
10. Liberati A AD, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JP, Clarke M, Devereaux PJ, Kleijnen J, Moher D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ.* 2009;339:b2700.
11. Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Int Med.* 2011;155(8):529–36.
12. Reitsma JB, Glas AS, Rutjes AW, et al. Bivariate analysis of sensitivity and specificity produces informative summary measures in diagnostic reviews. *J Clin Epidemiol.* 2005;58(10):982–90. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2005.02.022>.
13. Rutter CM, Gatsonis CA. A hierarchical regression approach to meta-analysis of diagnostic test accuracy evaluations. *Stat Med.* 2001;20(19):2865–84.
14. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. 2008 <http://www.R-project.org>.
15. Simmonds MC, Higgins JP. A general framework for the use of logistic regression models in meta-analysis. *Stat Meth med Res.* 2016;25(6):2858–77.

16. Chitty LS, Finning K, Wade A, et al. Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. *BMJ*. 2014;349:g5243. <https://doi.org/10.1136/bmj.g5243>.
17. Finning K, Martin P, Summers J, et al. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ*. 2008;336(7648):816–8. <https://doi.org/10.1136/bmj.39518.463206.25>.
18. Soothill PW, Finning K, Latham T, et al. Use of cfDNA to avoid administration of anti-D to pregnant women when the fetus is RhD-negative: implementation in the NHS. *BJOG*. 2015;122(12):1682–6. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.13055>.
19. Akolekar R, Finning K, Kuppusamy R, et al. Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11-13 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther*. 2011;29(4):301–6. <https://doi.org/10.1159/000322959>.
20. Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, et al. Noninvasive single-exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2012;120(2 Pt 1):227–34. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31825d33d9>.
21. Wikman T, Tiblad E, Westgren M. Noninvasive prenatal screening for RHD: the Stockholm study. *Vox Sang*. 2012;103(Suppl. 1):33–4. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2012.01615-1.x>.
22. Singleton BK, Green CA, Avent ND, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*. 2000;95(1):12–8.
23. Lun FM, Chiu RW, Chan KC, et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008;54(10):1664–72. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.111385>.
24. Wang E, Batey A, Struble C, et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2013;33(7):662–6. <https://doi.org/10.1002/pd.4119>.
25. Grande M, Ordonez E, Cirigliano V, et al. Clinical application of midtrimester non-invasive fetal RHD genotyping and identification of RHD variants in a mixed-ethnic population. *Prenat Diagn*. 2013;33(2):173–8. <https://doi.org/10.1002/pd.4035>.
26. Faas BH, Beckers EA, Wildoer P, et al. Molecular background of VS and weak C expression in blacks. *Transfusion*. 1997;37(1):38–44.



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