

《最新血型基因分型综述分享》

本期内容和大家分享一篇近年高分血型基因分型英文综述——《Blood group genotyping》，由纽约血液中心的 Westhoff CM 于 2019 年发表在《Blood》，影响因子 16.562。

摘要

基因组学正在影响医学的所有领域。在输血医学中，基于 DNA 的基因分型被用于替代基于血清学抗体的方法来确定血型以匹配供者和受者。大多数抗原多态性是由各自基因中的单核苷酸多态性变化引起的，针对这些变化的 DNA 阵列已通过基于抗体的分型进行比较而得到验证。重要的是，检测没有血清学试剂的抗原的能力是鉴定抗体和找到匹配的供体单位的一项重大医学进步，可以挽救生命。本文综述了红细胞和血小板血型抗原基因分型在多个医学领域的应用进展。这些包括：评估胎儿或新生儿疾病风险及 Rh 免疫球蛋白的产前医学；移植选择骨髓供者，为高度同种异体免疫的患者提供输血支持，确认肾供者的 A2 状态；需要慢性输血的贫血患者的全面的分型；接受干扰输血前检测的单克隆抗体治疗的肿瘤患者。基因组学方法第一次允许常规地选择抗原匹配多于受体 ABO/RhD 的供体单位，以减少并发症。与此相关的是，慢性疾病患者和健康者中全基因组测序的发展将提供患者全面扩展的血型档案，作为其病历的一部分，用于告知最佳输血疗法的选择。

目录

- 1 引言
- 2 红细胞基因分型方法及应用
 - 2.1 ABO 和 RhD
 - 2.2 输血前相容性检测
 - 2.3 扩展的抗原匹配
 - 2.4 输血前检测中的单克隆抗体干扰
- 3 镰状细胞病（SCD）中的红细胞基因分型
- 4 骨髓移植中的红细胞基因分型
- 5 产前检测（胎儿和新生儿同种免疫性血小板减少（FNAIT）、HDFN 和 RHD 分型）
 - 5.1 父亲的检测
 - 5.2 胎儿的检测
 - 5.3 RHD 基因分型和 Rhlg
- 6 供血者的基因分型
 - 6.1 确定供者 RhD 类型
 - 6.2 确定供者 ABO 类型以保留供者
- 7 NGS
- 8 改变的实践、成本和报销
- 9 总结

1 引言

基于抗体的方法的血型分型已经成为确定 ABO、Rh 和红细胞(RBCs)上存在的“扩展”血型抗原的标准，自从 ABO 系统被发现以来，现在已有>300 个血型抗原。血型抗原被定义为红细胞(血小板和中性粒细胞)上的多态，它在个体之间存在差异，并通过妊娠或输血刺激免疫抗体的产生(A 和 B 抗原作为红细胞上的碳水化合物表位是一个例外，因为这些抗体是环境微生物暴露的结果)。特异多态性与抗体产生的关联对于确定抗原至关重要，因为通过基

因组测序可以发现红细胞膜蛋白中增加的遗传变异，但这些可能不是免疫原性的。

可获得 ABO 和 Rh (D, C, c, E, e) 以及约 18 种其他常见血型抗原特异性的商业抗体试剂；然而，对于许多临床意义重大的抗原，尚无分型试剂。抗体试剂的敏感性和特异性可能会发生变化，“扩展或稀有”抗原的分型一直是自动化的挑战，因为载体蛋白和/或碳水化合物通常是跨膜复合物的一部分，抗原表位的识别通常需要维持原有的构象。50 多年来，基于抗体的分型试剂在本行业起到了良好作用，但至少在美国，缺乏 ABO/ RhD 以外血型分型的自动化、试剂和劳动力费用高，以及输血的常规分型一般缺乏特异性，受限于 ABO 和 RhD 是最重要的血型。表 1 比较了基于抗体和基于 DNA 的分型。

表 1 血型抗原分型的方法比较

基于抗体的分型
≤1h 时限
手工
需要新鲜红细胞
存在的设备
直接检测抗原表达
受输入的红细胞或结合的 IgG 干扰
缺乏针对某些有临床意义抗原的试剂
可能漏检弱/可变的抗原表达
低分辨率
基于 DNA 的分型
24h 时限
自动
所有细胞源*
特殊的设备 and 环境
间接“预测”抗原表达
不受输入的红细胞或结合的 IgG 干扰
可以对任意已知遗传基础的抗原分型
可检出弱抗原表达
可能高分辨率

包括来自母亲血浆中细胞游离 DNA 的胎儿分型

2 红细胞基因分型方法及应用

大多数血型抗原，除了 ABO 和 RhD，都源于 SNPs，这使得基因型分析的设计和解释变得简单明了。这导致了靶向 12 个血型系统(非 ABO 或 RhD)中 35 - 37 个抗原的 DNA 阵列以及靶向 HPA 1-9、11 和 15 的 HPA 板的商业化。实现和许可包括通过对大量样品进行并行检测且与基于抗体的分型和基因测序进行比较，验证 SNP 与抗原之间的联系。目前，该领域在通过 DNA 测定“预测”RBC 抗原表型方面已有十多年的经验，其结果与用特定抗体检测红细胞高度相关。DNA 阵列主要用于血液中心，或也收集供体单位的大型医院，用于供体样本的高通量扩展分型。大多数医院输血服务实验室没有 DNA 方法所需的设备和专用环境，病人样本被转到血液中心进行检测。

2.1 ABO 和 RhD

用于扩展红细胞分型的 DNA 阵列通常不包括 ABO 和 RhD，尽管对大多数个体来说，通过询问多个 SNP 可以准确地确定它们。问题在于，A 或 B 等位基因或 RHD 等位基因任何地方的单一突变都可能导致转移酶失活(即 O 表型)或 RhD 缺失(即 RhD-表型)。因为 DNA 阵列不能针对基因中的每一个核苷酸，所以新的或不常见的突变检测不到，而且 ABO 或 RhD 不正确的可能性是不可接受的。由于血清学 ABO/RhD 分型快速、准确且相对便宜，预计与其他血型抗原相比，基因分型将不会作为确定 ABO/RhD 的唯一手段。然而，ABO 基因分型正越来越多地用于移植登记，通常收集口腔拭子而不是红细胞样本，以帮助选择供体。ABO 基因分型也有助于解决患者和献血者的正反定型不符，通过检测口腔拭子标本，确定大量输血患者的原始血型，以保留 O 型献血者库存，或确定移植受者的原始血型。ABO 基因分型也用于确认可能已输血或红细胞在抗 A1 试剂的血清学测试中反应不一致的肾供者的 A2 亚型。

2.2 输血前相容性检测

目前对病人样本的输血前检测包括 ABO 和 RhD 分型和抗体筛选，以检测血浆中对血型抗原的抗体。如果阳性，必须确定抗体靶点，并通过对患者红细胞分型显示其缺乏该抗原，进一步确认。输血的供体红细胞也必须被分型并显示缺乏该抗原，并且需要与供体红细胞和患者血浆进行相容性测试。

由于对 RBC 抗原免疫的患者是“应答者”，增加了产生额外抗体的风险，一些主动输血服务执行扩展抗原分型，特别是当患者面临进一步输血时。目的是确定患者缺乏且如果暴露有产生免疫抗体风险的常见抗原。然后，一些主动输血服务可能会根据情况选择为患者与捐赠者匹配附加抗原，以避免进一步的抗体并发症。即使最初不采取行动，扩展的抗原分型也会通过缩小必须排除的不同抗体特异性的数量、仅包括那些病人缺乏的抗原，来加快未来的输血前检测。扩展抗原谱分析最好通过基因分型来完成，因为测试涉及单一的自动化分析，已被证明更准确和提供更多的信息。作为病人输血记录的一部分，检测只需要执行一次。表 2 总结了基于 DNA 的基因分型与基于抗体的方法相比具有优势的情况。

表 2 基于 DNA 的基因分型在输血医学中的应用

1	对单一试验检测多种抗原的患者分型
2	对近期输过血或红细胞包被免疫球蛋白的患者分型
3	对自身免疫性溶血性贫血患者分型(输血时选择抗原阴性红细胞，寻找潜在同种异体抗体时吸附自身抗体)
4	对接受干扰输血前检测的单克隆抗体治疗的患者分型
5	当商用抗血清无法获得时，对红细胞分型
6	对产科患者分型，以确定弱 D 和部分 D 表型，以确定 Rh 免疫球蛋白（Rhlg）的使用者，并避免使用有限的 RhD 阴性血液
7	解决血型定型不符
8	确定 RHD 和 HPA 的父系杂合情况
9	对胎儿分型以确定 HDFN 或 FNAIT 的风险
10	SCD 中 Rh 抗原的准确匹配

2.3 扩展的抗原匹配

为需要输血的女性患者配型 ABO/RhD 和 K(一种 Kell 系统抗原)在几个欧洲国家和澳大利亚很常见,以避免新生儿因 K 致敏而发生溶血性疾病,这与新生儿的发病率和死亡率有关。在一些欧洲系统中,妇女和接受慢性输血的患者也常规避免其他 Rh 抗原(C、c、E 或 e)同种异体免疫。在美国,对于镰状细胞病(SCD)患者来说,预防性的 C、E 和 K 抗原匹配越来越普遍。C、c、E、e、K 以及 Fya/b、Jka/b 和 Ss 的抗原匹配也越来越多地应用于因存在温自身抗体或药物干扰而常规检测无法证实相容性的患者。这种方法代替了输血时使用“有临床意义的血型抗原匹配”的供体单位的“最小不相容”的血液。

这可以减少迟发型输血反应的风险,可以规避额外的异源免疫,还可以通过消除重复劳动密集型吸附去除自身抗体(或药物抗体)检测潜在特定红细胞同种抗体的需要或减少其频率,来改善病人护理和测试周期。

2.4 输血前检测中的单克隆抗体干扰

一些单克隆抗体药物治疗会干扰输血前测试。最常见的是抗 CD38 (达雷木单抗), 2015 年被批准用于治疗多发性骨髓瘤。另外的抗 CD38 药物治疗法(MOR202 和 isatuximab)也在临床使用中,测试抗 CD38 在其他条件下疗效的临床试验是一个活跃的研究领域。靶向 CD47 的单克隆抗体也在一期临床试验中。与干扰间接抗球蛋白测试的抗 CD38 相反,抗 CD47 干扰输血前所有阶段的测试,包括 ABO 分型。接受抗 CD47 的患者也有一定程度的贫血和血小板减少,这增加了他们可能需要输血的可能性。AABB 推荐获得病人的治疗前样本进行基线 ABO/ RhD 分型和抗体筛查,单克隆抗体治疗开始之前执行扩展红细胞表型或基因型检测。正如前面所讨论的那样,使用扩展抗原匹配供体单位输血可以减少重复输血前检查的数量和复杂性。

3 镰状细胞病 (SCD) 中的红细胞基因分型

同种异体免疫是慢性输血的一个严重并发症,特别是对 SCD 和 β 地中海贫血患者。许多方案尝试通过输注 D、C、E 和 K (某些还包括 Fya/b、Jka/b 和 S) 抗原匹配的供者单位来预防或者减少同种抗体的风险。推荐在首次输血前对 SCD 患者进行扩展抗原检测(美国血液学学会委员会 SCD 管理指南手稿)。这可以通过血清学分型或 DNA 方法完成,不过基因分型提高了准确性并提供了更多信息。例如,红细胞基因分型大约可以识别出 20%的红细胞类型为 C+ 但 C 抗原改变的 SCD 患者。他们应该接受 C-供体单位,因为在几个队列中已经显示,如果输注 C+供体单位,三分之一的患者会产生抗 C。基因分型也能识别缺乏高频抗原的患者,尽管预防往往不可能,但有了这些信息可以避免误诊,因为在实验室检测时,抗体看起来是温自身抗体。基因分型还提醒输血服务在 Dombrock (Doa/b, Joa, Hy), 其他 Kell (Kpa/b, Jsa/b), 其他 Rh (V/Vs), 和 Colton (Coa/b), Yt (a/b), Lutheran (Lua/b), Diego (Dia/b) 和 Scianna (Sc1/2) 系统中的不相容。这些抗体可能具有临床意义并威胁生命,但难以识别;以前没有任何方法可用于分型供者来寻找相容的单位。当观察到输注的红细胞有溶血现象,同时检测不到新抗体时,应考虑这些系统中的不相容性。

即使血清学上 D、C、E 抗原匹配,SCD 患者有时也产生 Rh 抗体。这些抗体在多次输血患者中发现,这些患者的红细胞经血清学分型呈抗原阳性,或经血清学分型确定为抗原阴性但未暴露于供体红细胞上的抗原。这是因为 Rh 表位很复杂,而非洲黑人个体的 RH 基因是多样的。因此,患者和经常用于给他们输血的非裔美国献血者都有编码血清学反应性不清晰的 Rh 表位的 RHD 和 RHCE 等位基因。总的来说,当预防性匹配基于血清学时,约 6%的 RhD+ 非裔美国 SCD 患者有出现有临床意义的抗 D 的风险,约 21%的 C+患者有出现抗 C 的风险,

21%的患者有出现抗 c 或抗 e 的风险。与 HLA 相似,一些 SCD 患者的血清学分型没有充分匹配 Rh 抗原以避免异源免疫;因此需要高分辨率的分型。重要的是,SCD 患者和非裔美国献血者的 RH 等位基因频率相似,这表明通过 RH 基因分型进行高分辨率 Rh 匹配在未来可能是可行的,并使得能够更好地利用非裔美国献血者清单。

4 骨髓移植中的红细胞基因分型

虽然包括 ABO 在内的大多数红细胞抗体对移植没有障碍,但同种异体抗体可引起并发症。越来越多地使用减少的清髓性预处理导致受体和供体来源的淋巴细胞和受体浆细胞的持续混合嵌合。现有的抗体可导致红细胞延迟生成或移植供体红细胞溶血,新的抗体(无论来自供体或患者)可使输血支持和恢复复杂化。对于有红细胞同种异体抗体的移植患者,在移植前对供者和受者进行稀有血型抗原基因分型,并评估供者/受者的相容性,可以为供者的选择和输血支持提供前瞻性信息。如果几个 HLA 相同的供体符合条件(如亲属移植中的兄弟姐妹),红细胞基因分型可以指导供体的选择。移植前供者/受者评估对于接受移植的具有高度的红细胞同种异体免疫的 SCD 患者尤其有意义,这是一种越来越常见的情况。移植后,可以对受者外周血样本和颊细胞进行基因分型,以确定新抗体的来源(即来自于供者或受者),从而为输血单位的选择提供信息,以提供最好的输血支持。

5 产前检测(胎儿和新生儿同种免疫性血小板减少(FNAIT)、HDFN 和 RHD 分型)

当母亲有针对红细胞或血小板抗原的抗体时,通过基于 DNA 的基因分型来确定红细胞或血小板抗原的能力可以推进对胎儿和新生儿溶血性疾病(HDFN)以及胎儿和新生儿同种免疫性血小板减少(FNAIT)的诊断和评估。HDFN 最常见的原因是对 RhD 或 K 抗原的免疫。已有 28 个 HPA 被表征出来,但 HPA-1 的不相容性占有 FNAIT 病例的约 80%。

5.1 父亲的检测

确定父方基因型是评估并发症风险的关键。如果父亲的抗原检测呈阳性,则确定父亲的基因拷贝数(杂合性)。如果父亲对该基因是纯合的,那么所有的孩子都将是抗原阳性,需要对怀孕进行监测。如果父亲是杂合的,胎儿有 50%的机会不受影响。

5.2 胎儿的检测

如果父亲只有一个编码抗原的基因拷贝(或者父子关系不确定或未知),可以检测通过羊膜穿刺术获得的细胞的胎儿 DNA,以确定胎儿的抗原状态。如果胎儿是抗原阴性,母亲不需要接受侵入性和昂贵的监测或接受免疫调节剂。如果胎儿是抗原阳性,妊娠管理包括监测和治疗,如果需要,可进行宫内输血。最近,孕妇血浆中游离胎儿 DNA 的无创检测被用于确定胎儿的抗原状态,以尽量减少羊膜穿刺术相关的不良事件。从胎盘滋养层提取的游离胎儿 DNA 在妊娠 5 周时出现,并在整个妊娠期间不断增加。在欧洲,大多数临床血型抗原(D, c, C, E, e, K, HPA-1a)都是通过无创检测对胎儿进行血型分型,在一些国家,侵入性胎儿血型分型已经过时。相比之下,在美国,无创检查在避免羊膜穿刺术相关不良事件方面的临床应用仍然存在问题,而且检查的可获得性也是有限的。

5.3 RHD 基因分型和 Rhlg

对于 RhD-母亲,Rhlg 的预防有效地降低了同种免疫和 anti-D 产生的风险。产后免疫预防是根据新生儿的 RhD 血型给予的,而产前剂量常规用于所有 RhD-妇女,因为胎儿血型尚不清楚。然而,在一些欧洲国家,采用孕妇血浆中胎儿游离 DNA 的无创检测来确定胎儿 RhD 的类型,避免对含有 RhD-胎儿(约 38% - 40%)的妇女给予不必要的产前 Rhlg 已成为常规做法。这些结果也用于指导产后预防,而且没有进行胎儿脐带血清学检查。荷兰、丹麦、瑞典、

英国和法国已经实施了这种方法，以避免不必要地使用 Rhlg，这是一种供应有限的人类血液制品。

确定候选 Rhlg 的妇女的挑战之一是母体红细胞的 RhD 分型。大约 1%到 6%的个体，取决于他们的种族背景，遗传了编码变异 RhD 的等位基因，红细胞类型通过基于抗体的方法定为 RhD+或 RhD-，或者比预期的弱得多，这取决于用于分型的方法和/或试剂。其中一些，但不是全部，缺乏 RhD 的主要表位(称为部分 D 表型)，因此有产生直接针对其红细胞缺失的 RhD 表位的抗 D 的风险。一般认为，具有部分 D 表现型的妇女如果怀有 RhD+胎儿，则可从 Rhlg 预防中获益，但不能通过基于抗体的分型识别哪些妇女有产生有临床意义抗 D 的风险。输血服务部门常常过于谨慎，将红细胞分型弱于预期(<2+反应性)的妇女，或者红细胞分型在某些试剂中为阳性而在其他试剂中为阴性的妇女，当做 RhD-对待。这导致不必要的使用 Rhlg 和 RhD -血液。RHD 基因分型可区分有临床意义抗 D 风险的部分 D 表型;2015 年，一个代表多个临床标准制定机构的工作组建议将 RHD 基因分型纳入孕妇管理。RHD 基因分型的经验如图 1 所示。大约 45%到 50%的 RhD 分型弱于预期的混合族群妇女没有产生 anti-D 的风险，也不需要 Rhlg。局限性仍然存在，一些可以从 Rhlg 中获益的妇女没有被发现(红细胞分型为强 RhD+)，一些未做间接抗球蛋白试验的妇女似乎是 RhD-，但仍然接受了不必要的 Rhlg。预计在未来，通过 RHD 基因分型确定所有孕妇的 RhD 类型将成为常规，从而准确指导输血和 Rhlg 预防。

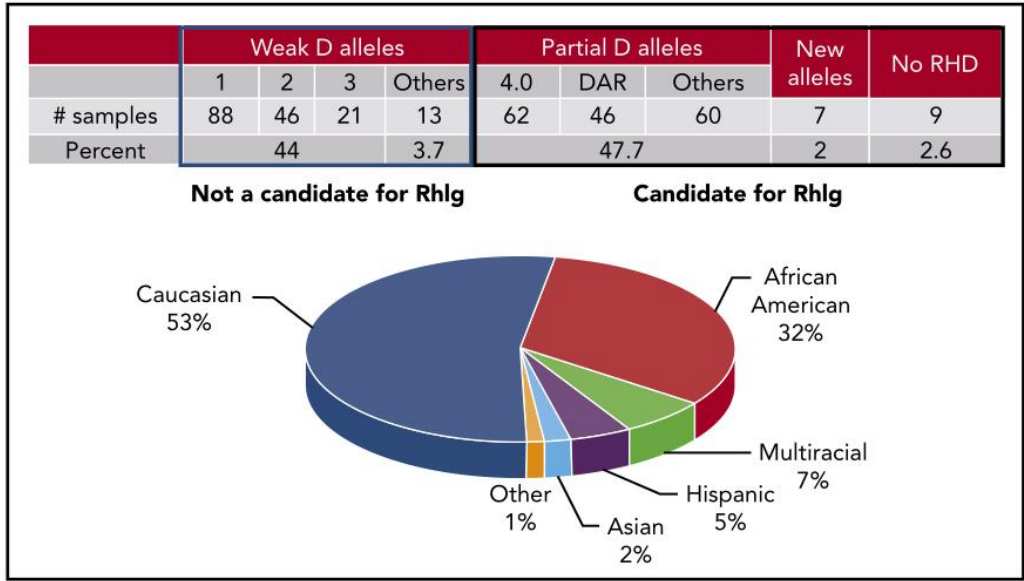


图 1 352 例不同族群背景的红细胞 RhD 分型不一致或弱于预期的孕妇的 RHD 基因分型结果。大约 48%的人没有临床意义同种免疫的风险，RhIg 是不必要的。

6 供血者的基因分型

6.1 确定供者 RhD 类型

供体中心必须对 RhD 的弱表达进行检测，以避免将血液制品标记为 RhD-，否则可能会对输入的红细胞产生抗-D。大约 0.1%的供体红细胞有非常弱的 RhD+表达，抗体试剂未检测到，在输血时标记为 RhD -。虽然临床意义尚未得到很好的证明，但供体 RhD 表达非常弱的红细胞已被证实与异源免疫有关。RHD 基因分型可以通过确认 RhD-分型来改善供体检测。

6.2 确定供者 ABO 类型以保留供者

健康的供体有时会出现 ABO 抗原弱表达(亚型)或天然 ABO 抗体滴度低的情况。由于红细胞和血浆 ABO 血型分型不一致,血液制品不能标记用于输血,经常被丢弃。ABO 基因分型可以确定供体的 ABO 遗传类型,尽管目前还没有批准进行标记检测,但 DNA 方法提供了成为“验证性检测”的潜力。这将避免丢弃安全和有效的供体血液制品,并保留抗体滴度降低的供体,他们的血液制品在必须使用 ABO 血型外血浆和血小板输注时实际上更好。

7 NGS

DNA 阵列只能检测有限数量的 SNP。目前还不可能在一次试验中对所有感兴趣的血型进行全面分析(即,45 个红细胞和 6 个血小板基因中的变异编码了 360 个确定的红细胞抗原和 33 个血小板抗原)。超过 2000 个等位基因已被鉴定与红细胞表型差异或抗体产生相关。通过全基因组或外泌体或靶向特定血型基因座的 NGS,可能确定所有感兴趣的红细胞和血小板抗原。6 年来许多研究表明,NGS 为稀有血型抗原分型和 SCD 中 RH 基因分型提供足够的基因覆盖范围。这种方法的优势在于能够检测所有多态性包括空等位基因、新突变和复杂的基因重组,还能够进行拷贝数分析。这种综合方法在解决复杂病例时具有优势,可以识别罕见和新的血型变异,否则将无法识别,特别是当抗体特异性不确定,或重要的是,在缺乏可检测抗体的情况下,输注红细胞存活率受到影响时。目前正在开发和验证一种算法,以直接解释来自 NGS 的数据,并生成包括扩展配置文件在内的报告。由于 NGS 的成本持续下降,病人基因组测序作为临床护理的一部分将变得更加普遍。对需要输血治疗的患者的 NGS 数据进行二次分析,将是这些信息的一种成本效益高、实际的使用方法,来选择血液制品和提高输血安全性。

8 改变的实践、成本和报销

在没有缓解策略的情况下,同种异体免疫是可以接受的输血风险。人们普遍认为,在 ABO/RhD 之外对患者和供体进行某种程度的抗原匹配,将改善结果并减少异源免疫,这在许多政府资助的卫生保健系统国家是可行的。如前所述,这些国家多年来的主要重点是预防对有生育潜力的妇女和需要慢性输血的病人的敏感化。在美国,提供某种程度的抗原匹配正越来越多地应用于 SCD 或地中海贫血患者,但在利用基因组学提供的信息进行精准医疗的时代,什么是必要的,以扩大方法?障碍包括缺乏预防报销、输血医学实践的规范环境以及血液中心提供抗原分型供体红细胞的成本结构。提供 ABO/RhD 之外的供体单位分型历来是通过劳动密集型的手工血清学方法来完成的,这反映在当前的成本结构中。有了基于 DNA 的基因分型,捐赠者的扩展抗原分型变得更实用、更经济和容易获得。在预防和精准输血方面的一项实践变革将要求产品在捐赠中心贴上标签,并在医院提供,在没有报销的情况下,显示其可减少医院劳动力、成本,并改善周转时间和病人护理。通过采用集中检测模式将样本转到供体中心,可降低患者检测的成本,检测只需进行 1 次,并将其作为患者输血记录的一部分。

成本效益分析往往是挑战性的,且报销影响改善输血医学和产前实践的努力。具体地说,当 RHD 基因分型的成本约为\$258 时,与将孕妇作为 RhD-使用 RhIg 相比,使用 RHD 基因分型对孕妇进行准确的 RhD 分型以指导输血血液的选择和 RhIg 候选的成本是中性的,或者节省了成本。在荷兰,已证明使用母体血浆无创性胎儿游离检测,将产前和产后 RhIg 局限于那些怀有 RhD +胎儿的 RhD-女性,是有最

佳利润的。在美国，使用这种方法一直受到高昂的成本、专利和许可相关的有限的检测可获得性的阻碍。然而，这种方法现在在许多国家保健系统中都很普遍，而且将来会更容易获得和接受。

9 总结

输血是临床医学中最常用的治疗方法之一。目前的输血前测试包括匹配病人和供者的 ABO 和 RhD，使用的方法已经很好地服务于这个行业，但 60 多年来没有实质性的改变。这是一个输血医学的激动人心的时代，因为不仅对于受体和供体相容性的确定，而且对于供体招募、供体健康、产品存储特性和输血代谢组成分的表征，该领域将受益于基因组学方法。一个输血医学阵列正在开发中，为研究供体和受体群体中输血相关变异，包括由国家心脏、肺、血液研究所受体流行病学供体评估研究 III 资助的结果。该阵列靶向 > 800 000 标记物，支持不同人群的全基因组分析，可研究输血医学特异性的变异，包括红细胞和血小板结构和功能、HLA、HPA、铁代谢、镰状细胞特性、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏等。总之，基因组方法有望从根本上改变输血供体招募、单位储存和产品选择的方式。