

RhD variant DVII

Marta Kučeráková¹, Jolana Wieslerová¹, Mária Laurincová², Jana Holienková²
1HTO FNŠP Žilina, 2NTS SR pracovisko Žilina

Úvod

Vyšetrenie RhD fenotypu je komplikované možným nálezom RhD proteínu s atypickou expresiou, ktorú očakávame cca u 1–2 % všetkých D+. Rozoznávame kvantitatívne zmeny- weak formy so zníženým počtom molekúl normálneho RhD proteínu a variantné formy s kvalitatívne odlišným RhD proteínom. Podkladom prvej skupiny zmien sú mutácie *RHD* génu s následnými alteráciami RhD proteínu, ktoré nemenia jeho extramebranóznú časť. Mutácie *RHD* génov v prípadoch RhD variantov /bodové mutácie, vznik hybridných aliel rekombináciou *RHD* a *RHCE*/ naopak spôsobujú zmeny usporiadania, teda zloženia a tvaru RhD na vonkajšej strane membrány. Antigén D zjednodušene chápeme ako súbor D epitopov a RhD varianty sú charakterizované chýbaním 1 alebo viacerých epitopov. U nositeľov takto zmeneného RhD je riziko aloimunitizácie po kontakte s normálnym RhD proteínom (6, 9).

Metodika

Pri vyšetrení RhD pacienta používame štandardne 2 rôzne anti-D diagnostiká. V teste sa dokazuje prítomnosť alebo neprítomnosť antigénu RhD na erythrocytoch. Rozlišujeme 3 kategórie hodnotenia výsledku reakcie:

RhD POZ = jednoznačne pozitívna reakcia ($\geq 3+$) s použitými dg sérami anti-D

RhD NEG = jednoznačne negatívna reakcia s použitými dg sérami anti-D

D^{w/v} (slabý antigen D/variant antigénu D) = ak je rozdielna sila reakcie s použitými dg sérami anti-D (0 2+) ; ak reakcia s niektorým dg sérom anti-D je $\leq 2+$; pri náleze anti-D aloprotilátky pri výsledku vyšetrenia RhD POZ; ak sú diskrepancie súčasných vyšetrení u pacienta s predchádzajúcimi výsledkami vyšetrení.

Kazuistiky

V Krvnej banke FNŠP Žilina sme v priebehu 1 týždňa riešili v rámci predtransfúzných vyšetrení diskrepantný nález fenotypu RhD u 2 pacientok. U jednej bola v minulosti vyšetrená krvná skupina A RhD NEG, u druhej bol v dokumentácii záznam rozdielných výsledkov vyšetrenia krvnej skupiny z 2 pracovísk: A RhD NEG a A RhD POZ. U oboch sme pri použití diagnostík anti-D IgM BS232 a BS226 skúmkavovou metódou (sila aglutinácie 1+) stanovili RhD^{w/v} a plánovali podanie RhD NEG erythrocytových transfúzných prípravkov.

Vzorky pacientok sme vzhľadom k diskrepanciám vyšetřili v spolupráci s NTS SR so všetkými dostupnými monoklonovými anti-D diagnostikami. Pri použití napr. kombinácie IgM anti-D D175-2 a RUM-1 bol v oboch prípadoch jednoznačný nález RhD POZ (tab.1).

Následne sme testovali erythrocyty s panelom 6 anti-D diagnostík určených na odlíšenie niektorých častejších RhD variantov (Partial RhD-Typing Set). Červenou farbou v tab.2 je zvýraznená reaktivita variantu DVII, ktorý sme suponovali v oboch prípadoch. Jednoznačný záver je možný len po vyšetrení genotypu, napriek tomu je sérologický nález vysoko suspektný. Doplňili sme vyšetrenie Rh fenotypu. U oboch vzoriek sme potvrdili R1r, s ktorým sa DVII asociuje.

Tab.1 Reaktivita jednotlivých klonov anti-D s erythrocytami pacienta

Klon anti-D diagnostika	Ery pacientok- sérologická reakcia	Metóda vyšetrenia
IgM BS232 Merck	1+	skúmkavovo
IgM BS226 Merck	1+	skúmkavovo
IgM Immucclone anti-D fast klon D175-2 IgM DiaClon anti-D Complete klon D175-2	4+	skúmkavovo
IgM Immucclone anti-D rapid klon RUM-1	4+	skúmkavovo
Immucclone anti-D duo, IgM a IgG TH28 IgM a MS26 IgG	4+	skúmkavovo
MS-201/MS-26(IgM/IgG)	1+	mikrotitračná platnička

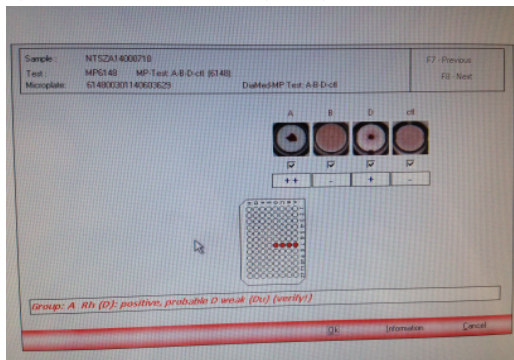
Obr.1 Reaktivita vzorky pacientky s anti-D ID Partial RhD Typing Set



Obr.2 Vyšetrenie Rh fenotypu pacientky



Obr.3 Reakcia vzorky pacientky s anti-D IgM MS-201/MS-26(IgM/IgG)

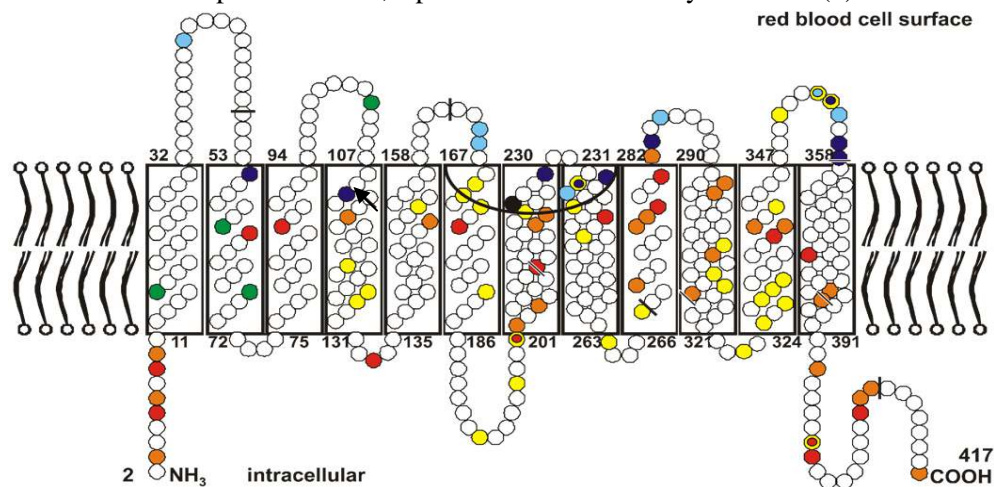


Tab.2 ID Partial RhD Typing Set- červeno zvýraznená reaktivita DVII

č.	Anti-D IgG	DII	DIII	DIVa	DIVb	DV	DVI	DVII	DFR	DBT	DHAR
1	LHM 76/55	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
2	LHM 77/64	.	+	-	-	+	+	+	+	-	-
3	LHM 70/45	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
4	LHM 59/19	+	+	+	+	+	-	+/-sl	-	+	-
5	LHM 169/80	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
6	LDM1	+	+	+	+	+/-	-	+	-	+	+/-

Obr.4 Proteíny RhD a RhCcEe

Žltou farbou sú vyznačené aminokyseliny, ktorými sa odlišujú RhD a RhCcEe, zelenou C a c, čiernou E a e. Modrou sú znázornené substituované aminokyseliny pri RhD variantoch, červenou a oranžovou pri RhD weak, šipkou označená aminokyselina 110 (2).



Diskusia

V súčasnosti je známych viac ako 50 variantných antigénov D, ktoré vznikajú zámennou aminokyselín spôsobených bodovými mutáciami *RHD* aliel alebo vznikom Rh proteínov kódovaných hybridnými alelami *RHD-CE-D*. Dôsledkom týchto zmien je strata 1 alebo viacerých epitopov D.

Variant DVII je výsledkom bodovej missence mutácie génu *RHD* v exóne 2 T329C, ktorá kóduje zámennu aminokyselín Leu110Pro v 2 extracelulárnej slučke molekuly RhD proteínu. Frekvencia výskytu DVII u britských darcov krvi bola stanovená na 1:1585 D+, v Nemecku 1:882, v Tunisku 1:900 (1, 8). Niektoré práce uvádzajú frekvenciu jednotlivých variant DVII, DVI, DIV, DV, DII a DFR u bielej rasy ako 1:900, 1:6 800, 1:10 000, 1:30 000, 1:30 000 a 1:60 000 (4).

Pri DVII variante je súčasne redukovaná expresia antigénu D na povrchu erytrocytu na 2400-7500 atg/ery (3).

V roku 1986 sa podarilo identifikovať antigén s nízkou frekvenciou Tar (Rh40), ktorý sa objavuje v súvislosti so zmenou usporiadania RhD pri vzniku antigénu DVII a stal sa preň určujúcim.

U malej podskupiny nositeľov DVII bol súčasne s Leu110Pro potvrdený tiež nález Pro103Ser (charakterizujúci „c“ v RHCE). Tento fenotyp DVII-2 determinuje alela *RHD*07.02*, ktorej produktom je súčasne antigén Tar a parciálne „c“ (7).

V tab. 3 a 4 je uvedená epitopová charakteristika DVII.

Tab.3 Epitopový profil DVII variantu (9 epitopový model) (7)

DVII	Reakcia s monoklonálnym anti-D								
	ep1	ep2	ep3	ep4	ep5	ep6	ep7	ep8	ep9
	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Tab.4 Epitopový profil DVII variantu (30 epitopový model) (7)

DVII	Reakcia s monoklonálnym anti-D									
	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	4.1	5.1	5.2	5.3	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5.4	5.5	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5	6.6	6.7	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6.8	8.1	8.2	8.3	9.1	10.1	11.1	12.1	13.1	
	+	0	0	0	+	0	0	+	+	
	14.1	15.1	16.1							
	+	+	+							

Záver

Literatúra uvádza ako najvýznamnejší a klinicky „najdôležitejší“ variant DVI, v našich slovenských podmienkach však treba minimálne „počítat“ aj s inými variantnými formami antigénu D. Podľa niektorých zdrojov sa môže v prípade DVII jednať dokonca o najčastejšiu formu alterovaného RhD fenotypu. Vyššie uvedený text by mohol byť dôvodom na zamyslenie sa nad výberom anti-D diagnostík v kontexte so zameraním laboratória na vyšetrenia pacientov alebo darcov krvi (6). Jeden z našich pacientov bola žena vo fertilnom veku a v prípade podania RhD POZ transfúzneho erytrocytového prípravku by sme ju vystavili riziku anti-D aloimunizácie, ktorá by mohla mať významné klinické dôsledky v prípade tehotenstva.

Použitá literatúra

1. Daniels G. Human Blood Groups 3rd ed. Blackwell Publishing 2013.
2. Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apher Sci* 2011; 44: 81–91
3. Gorick B, McDougall DCJ, Overbeeke MAM, Tippett P, Hughes-Jones NC, Rhenen DJ: Sites on Selected 'Weak D' and 'Partial D' Red Cells. *Vox Sanguinis* 1993; 65:136.
4. Ouchari M, Polin H, Romdhane H, Abdelkefi S, Houissa B, Chakroun T, Gabriel C, Hmida S, Jemni Yacoub S. RHD*weak partial 4.0 is associated with an altered RHCE*ce(48C, 105T, 733G, 744C, 1025T) allele in the Tunisian population. *Transfus Med* 2013;23:245-9
5. Písačka M. Rh komplex R0Har a Rh proteín D HAR – variantní RhD antigen s „nejabnormálnějším“ molekulárním podkladem i fenotypovou expresí. *Transfúze a Hematologie. dnes* 2004; 1:8-12.
6. Písačka M. Praktické aspekty určování antigenů Rh systému. *Transfúze a Hematologie dnes* 2000;4:128-133.
7. Reid ME, Lomas-Francis Ch, Olsson ML The Blood Group Antigen FactsBook 3rd ed. Elsevier Science 2012.
8. Rouillac Ch, Le Van Kim C, Beolet M, Cartron J, Colin Y. Leu110Pro substitution in the RhD polypeptide is responsible for the D-VII category blood group phenotype. *American Journal Of Hematology* 1995;49:87-88.
9. Wagner FF, Flegel WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology* 2004;20:23-36.