

Význam špecifikácie aloprotilátky anti-G pre RhD imunoprofylaxiu RhD negatívnych žien

Marta Kučeráková, Anna Macháčová, Mária Laurincová
Národná transfúzna služba, pracovisko Žilina

Tento krátky príspevok je snahou o odpoveď na opakované otázky o antierytrocytovej aloprotilátke anti-G a významu jej špecifikácie pri sérologickom náleze anti-C+D u tehotných žien z hľadiska indikácie RhD profylaxie.

Antigén G (RH12) patrí medzi päť desiatok antigénov najpolymorfnejšieho erytrocytového skupinového systému Rh, ktoré sú lokalizované na proteínoch RhD a RhCcEe s vysokým stupňom vzájomnej homológie. Kľúčovou aminokyselinou determinujúcou G reaktivitu je serín v pozícii 103, ktorý je obvyčajne kódovaný *RHD* alebo *RHCE* génom, konkrétne alelou C (Obr.č.1., Tab.č.2. a 3.). Aminokyselina serín v pozícii 103 (+Cys16, Ile60 a Ser8) je súčasne "kľúčová" pre definovanie antigénu C, antigén G sa bude teda nachádzať na erytrocytoch s antigénom C a/alebo antigénom D (existujú výnimky- vid' nižšie).

Anti-G aloprotilátka, vzniknutá imunizáciou práve na túto „oblasť“ Rh proteínov, reaguje s diagnostickými erytrocytami, ktoré nesú antigén C alebo D, alebo C a D.

Existencia erytrocytového antigénu G a korešpondujúcej protilátky anti-G vysvetľuje:

- prečo niektoré RhD negatívne ženy s fenotypom dce/dce imunizované počas tehotenstva so sérologickým nálezom anti-C+D majú deti s fenotypom Cde/cde.(podmienené protilátkou anti-G alebo anti-G+C)
- prečo deti, narodené ženám s fenotypom cde/cde a sérologickým nálezom anti-C+D pri RhD pozitívite otca dieťaťa, môžu mať fenotyp C-.(spôsobené anti-D+G alebo anti-G)
- sérologický nález anti-C+D u 30 % RhD negatívnych osôb imunizovaných ccDee erytrocytami. (v skutočnosti ide o anti-D+G alebo anti-G)
- sérologický nález aloprotilátok anti-C+D po podaní RhD negatívnych TU s fenotypom erytrocytov Cde/cde RhD negatívnym pacientom [8]. (spôsobené aloprotilátkou anti-G alebo anti-C+G)

Početnosť zastúpenia G antigénu na erytrocytoch varíuje v závislosti od **Rh fenotypu**: CDe/CDe: 9900 - 12 200; **Cde/Cde: 8200 – 9700**; **cDE/cDE: 3600 – 5800**, CDE/CDE 5400, cDe/cDe 4500-5300, cDE/cde 4200. (dôležité pre hodnotenie titra protilátky anti-G, ktorý bude vyšší pri použití erytrocytov r'r a R₁R₁ ako pri R₂R₂).

Klinický význam protilátky anti-G:

- **Transfúzna liečba:** odlišenie anti-G u pacienta so sérologickým nálezom aloprotilátok anti-C + D v rámci predtransfúzneho vyšetrenia nie je z praktického hľadiska potrebné. V NTS Žilina v priebehu roku 2009 sme retrospektívne prehodnocovali nález anti-C+D u 2 pacientov na základe hlásenia krvnej banky FNŠP Žilina o uvedenej imunizácii po podaní nami deklarovovaných RhD negatívnych TU. Obidvom pacientom v rámci hemoterapie boli podané TU s Rh fenotypom r'r (Cde/cde) a u obidvoch sme dokázali samotnú anti-G aloprotilátku. Súčasne sme u darcov krvi potvrdili správnosť vyšetrenia D antigénu erytrocytov s použitím ID Partial RhD-Typing kitu, aby sme predišli eventuálnej imunizácii TU pripravenými z ich krvi v budúcnosti.
- **Prenatálny skrining u tehotných žien:** ak u RhD negatívnej tehotnej ženy vyšetříme pri bežnom skriningu protilátok a následnej špecifikácii kombináciu antierytrocytových aloprotilátok anti-C+D, v skutočnosti mohla nastať imunizácia len na G antigén RhCcEe proteínu. Z uvedeného vyplýva, že pri náleze anti-C+D sa môže jednať

o protilátku/kombináciu protilátok: anti-C+D, anti-C+D+G, anti-D+G, anti-C+G alebo anti-G. Pri podrobnejšom imunohematologickom vyšetrení je potrebné odlíšenie kombinácii protilátok anti-C+G a anti-G, resp. potvrdenie neprítomnosti anti-D. Zjednodušene sa dá povedať, že pacient si vytvára protilátku proti malej časti antigénu C, ktorá je identická s antigénom D, a preto teda in vitro pri skríningu a špecifikácii protilátok bude jeho sérum reagovať s diagnostickými erytrocytami nesúcimi C a/alebo D antigén. **Pri dôkaze anti-G aloprotilátky alebo anti-G+C bez anti-D je RhD negatívna žena adeptkou na RhD profylaxiu, ktorá ju chráni pred imunizáciou na antigén D!!!** [5, 7, 13, 15].

- **HChN**- zapríčinená anti-G aloprotilátkou je zriedkavá a obvykle s miernym priebehom. V literatúre sú však opísané kazuistiky stredne závažných i ťažkých foriem HChN s nutnosťou prenatálnej (IVG, plazmaferéza, IUT intrauterinné transfúzie) i postnatálnej intervencie [3, 12, 13]. Častejšie sa nachádza v kombinácii s anti-C a/alebo anti-D. Palfi a Gunarson pri dôkladnejšej analýze 27 tehotných žien s bežným sérologickým nálezom kombinácie aloprotilátok anti-C+D potvrdili u 3 z nich aloprotilátku anti-D+C, u 13 anti-D+C+G, u 7 anti-D+G a u 4 anti-C+G.[9] Maley a kol. v skupine 96 vzoriek so sérologickým nálezom anti-C+D (z toho u 22 tehotných žien a 74 pacientov) zistili, že 52 vzoriek dávalo o viac ako 50 % silnejšie reakcie s R₁R₁ erytrocytami v porovnaní s R₂R₂ erytrocytami (11/22 tehotné ženy, 41/74 pacienti). Anti-D sa nepodarilo detegovať u 16 zo 73 testovaných vzoriek (10 z 22 tehotných žien a 6 z 51 pacientov)[7]. Výška kritického titra pre anti-G nie je jednoznačne stanovená.

Laboratórny dôkaz aloprotilátky anti-G:

- **U tehotných žien je podozrenie na možný nález anti-G aloprotilátky ak:**
 1. pri skríningu a špecifikácii protilátok metódou NAT je sérologický nález kombinácie aloprotilátok anti-C+D.
 2. titer protilátok vyšetrený s použitím erytrocytov r'r (Cde/cde) je vyšší ako titer vyšetrený s erytrocytami R₂R₂ (cDE/cDE).

Samotný laboratórny dôkaz anti-G aloprotilátky sa zakladá na adsorbčných postupoch, diferencovanej adsorbcií a elúcii. Existujú viaceré postupy:

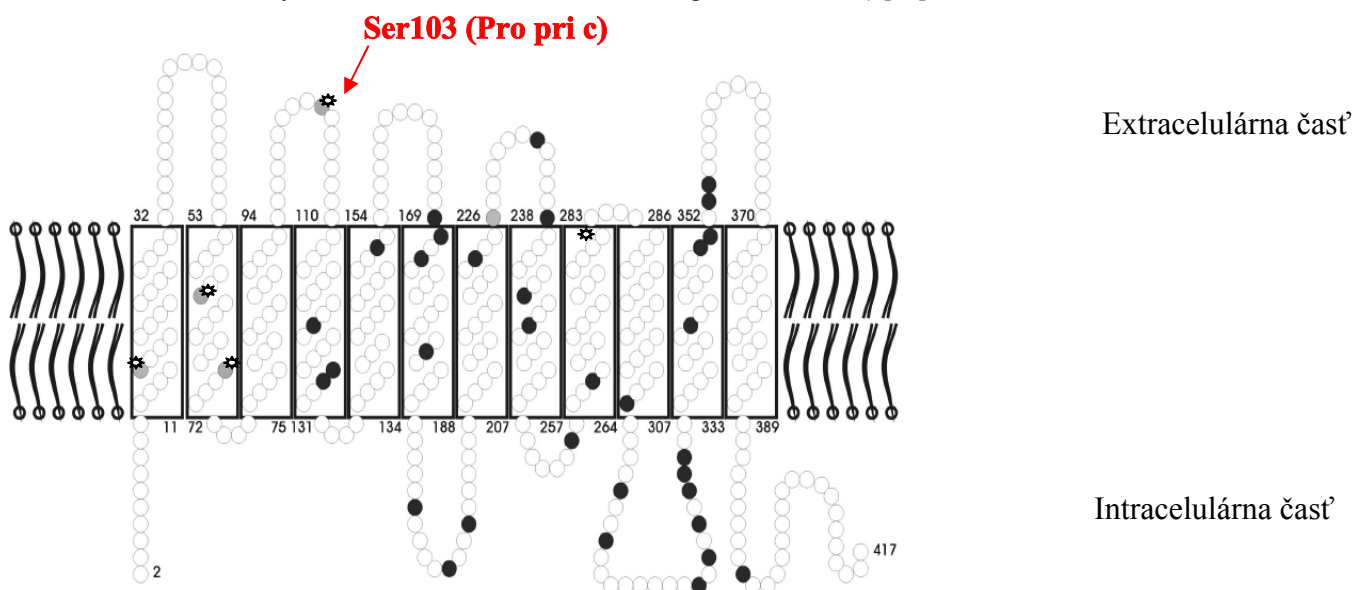
1. z anti-C+D sa adsorbciou na Cde/cde erytrocyty izoluje anti-C a anti-G. Eluát pripravený z týchto erytrocytov, ktorý neobsahuje anti-D sa následne adsorbuje na erytrocyty s fenotypom Dce/dce, z ktorých sa elúciou izoluje anti-G [1].
 2. na našom pracovisku preferujeme postup, ktorého cieľom je pri sérologickom náleze anti-C+D vylúčiť prítomnosť anti-D, a to opakovaním adsorbcií s erytrocytami s fenotypom r'r (Cde/cde) alebo r'r' (Cde/Cde). Sérum po 3-4 adsorbciách sa testuje s erytrocytami r'r (r'r') za účelom potvrdenia kompletného vyviazania protilátky anti-G (+ /- anti-C). Ak je výsledok negatívny, adsorbované sérum sa vyšetruje s erytrocytami C-D+ (napr. R₂R₂). Pri prítomnosti anti-D aloprotilátky, budú R₂R₂ (cDE/cDE) erytrocyty reagovať s adsorbovaným sérom, pri absencii je reakcia negatívna[5]. Súčasne kontrolne pripravujeme eluát z adsorbovaných erytrocytov r'r, ktorý je reaktívny s R₂R₂ erytrocytami.
1. v niektorých referenčných laboratóriách sa používajú na potvrdenie anti-G aloprotilátky erytrocyty s veľmi zriedkavým fenotypom DIIB (G-D+), ktoré s protilátkou anti-G nereagujú a r^Gr (G+C-D-), ktoré s ňou reagujú. Bližšie sú tieto fenotypy opísané nižšie. V našich podmienkach sú nedostupné.
 2. sú aj ďalšie postupy uvádzané v literatúre - viď Tab.č.1. [4].

Tab.1 Dôkaz anti-G

Vzorka	Diagnostické erytrocyty	Výsledky	Záver
Sérum pacienta	R ₁ R ₁	Silná reakcia	Anti-C a/alebo anti-D a/alebo anti-G
Sérum pacienta	r ^G r (G+C-D-)	Silná reakcia	Anti-G (+/- anti-C a/alebo D)
Adsorbované sérum adsorbciou na ficín-opracované erytrocyty r'r (dCe/dce) alebo r'r' (dCe/dCe) za účelom adsorbovania anti-C a/alebo anti-G	R ₀ r (cDe/cde) alebo R ₂ R ₂	Negatívny	Vylúčené anti-D
		Pozitívny	Prítomné Anti-D
Eluát z r'r (dCe/dce) alebo r'r' (dCe/dCe) po adsorbcií pacientovho séra sa adsorbujú na erytrocyty R ₂ R ₂ (R ₀ r) s cieľom adsorbovania anti-G	r'r (Cde/cde) alebo r'r' (Cde/Cde)	Negatívny	Vylúčenie anti-C
		Pozitívny	Prítomné anti-C

V súvislosti s výberom a použitím erytrocytov r'r na adsorbčné postupy treba zdôrazniť nutnosť správneho stanovenia ich RhD, pretože weak/variantné RhD sú najčastejšie asociované s fenotypom R₁r (zo 137 u nás registrovaných darcov krvi s weak/variantnou formou antigénu D so súčasne vyšetreným „kompletným“ Rh fenotypom- za predpokladu heterozygotného genotypu RHD- má 81 % Rh fenotyp R₁r).

Obr. č.1 Rh proteíny (RhD a RhCcEe) môžeme schematicky rozčleniť na 12 transmembránových segmentov so 6 extracelulárnymi a 5 intracelulárnymi slučkami s N a C-terminálnym koncom lokalizovaným intracelulárne. G antigén sa nachádza v 2. extracelulárnej slučke (Ser103). Čierna farba označuje aminokyselinové zvyšky, ktorými sa paušálne odlišujú RhD a RhCcEe proteíny, šedá aminokyselinové zvyšky, ktorými sa niekedy vzájomne odlišujú. Najviac rozdielov je situovaných do transmembránových a intracelulárnych častí. (upravené Wagner, F.F., Flegel, W.A., 2004) [14]



Tab.č.2

RH- exóny	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kódované aminokyseliny	1-49	50 - 112	113 – 162	163 - 211	212 - 267	268 - 313	314 – 358	359- 379	385- 409	410- 417

Tab.č.3

Protein Rh	Aminokyselinové zvyšky *				
	16	60	68	103	226
ce	Trp	Leu	Asn	Pro	Ala
Ce	Cys	Ile	Ser	Ser	Ala
cE	Trp	Leu	Asn	Pro	Pro
CE	Cys	Ile	Ser	Ser	Pro
D	Trp	Ile	Ser	Ser	Ala

Všetko v prírode má výnimku z pravidiel a platí to jednoznačne aj pre Rh skupinový systém

Antigén G sa zriedkavo nachádza na erythrocytoch pri absencii antigénov D a C:

- r^G gén reprezentuje *RHCE* kódujúci Trp16 (charakteristický pre antigén c a D) exónom 1 a Ile60, Ser68 a Ser103 (charakteristické pre C a RhD) exónom 2. Gén by teda mohol reprezentovať *ce* alelu *RHCE*, v ktorej je exón 2 substituovaný exónom 2 *RHD* alebo *C* alely *RHCE*. S haplotypom r^G sa asociuje antigén s nízkou frekvenciou výskytu RH53 JAHK [2, 6].
- r^{mG} - "produktom" tohto haplotypu sú antigény G, E a pravdepodobne slabý antigén C, nie D a c. r^{mG} predstavuje *RHD - CE - D*, v ktorom exóny 4-8 pochádzajú z alely *E RHCE*. (Gén kóduje Trp16 a Ser103) [1].

Antigén G sa nenachádza na erythrocytoch s antigénom D:

- DIIIb fenotyp erythrocytov je charakteristický prezenciou väčšiny D epitopov a stratou G antigénu. Vzniká tak, že exón 2 *RHD* je nahradený exónom 2 *c* alely *RHCE* génu, výsledkom ktorých sú tri Dc typické aminokyselinové substitúcie (Leu60, Asn68, Pro103) [10].

Použitá literatúra:

1. Daniels, G.: Human Blood Groups 2nd. UK, 2002, 560 s.
2. Green, C., Coghlan, G., Bizot, M., Kasulke, D., Bombail-Girard, M., Wallace, M., Lomas-Francis, C., Daniels, G.: JAHK: a low frequency antigen associated with the rG complex of the Rh blood group system. *Transfusion Med.* 2002; 12:55-61.
3. Hadley AG, Poole GD, Poole J, Anderson NA, Robson M.: Haemolytic disease of the newborn due to anti-G. *Vox. Sang.* 1996; 71:108-12.
4. Huber, A., Leonard, G.T., Driggers, R.W., Learn, S.B., Gilstad, C.W.: Case report: moderate hemolytic disease of the newborn due to anti-G. *Immunohematology* 2006; 22:166 – 170.
5. Judd, W.J.: Practice guidelines and perinatal immunohematology, revised. *Transfusion* 2001; 41:1445 - 1452.
6. Kosanke, J., Storry, JR., Reid, ME.: Confirmation that the JAHK antigen is associated with the rG haplotype. *Immunohematology* 2002; 18:46-7.
7. Maley, M.; Babb, R.; Chapman, C. E.; Fitzgerald, J.; Cavanagh, G.: Identification and quantification of anti-D, -C and -G in alloimmunized pregnant women. *Transfusion Medicine* 2001; 11: 443-446.
8. Mollison, P.L.: Blood Transfusion in Clinical Medicine. Blackwell Scientific Publications, 1983, 988 s.
9. Palfi, M., Gunnarsson, C.: The frequency of anti-C + anti-G in the absence of anti-D in alloimmunized pregnancies. *Transfusion Medicine*, 2001; 11:207-210.
10. Rouillac, C., Kim, L.v., Blancher, A et.al.: Lack of G blood group antigen in D^{IIIb} erythrocytes is associated with segmental DNA exchange RH genes. *British Journal of Haematology* 1995; 89:424 – 426. [abstrakt]
11. Skov, F.: Observations of number of available G antigen sites on red cells. *Vox Sang.* 1976; 31:124 – 130. [abstrakt]
12. Trevett TN Jr, Moise KJ Jr.: Twin pregnancy complicated by severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-G and anti-C. *Obstet Gynecol.* 2005; 106:1178–80.[abstrakt]
13. Yesus, YW., Akhter, JE.: Hemolytic disease of the newborn due to anti-C anti anti-G masquerading as anti-D. *Am. J. Clin. Pathol.* 1985; 85:769 – 72. [abstrakt]
14. Wagner, F.F., Flegel, W.A.: Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology* 2004; 20:23-33.
15. www.beshguidelines.com