

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca poglądowa/Review

Masowe badania molekularne dla identyfikacji dawców ze słabą ekspresją antygenu D



Massive molecular screening for identifying RhD negative blood donors with D weak expression

Ewa Brojer*, Katarzyna Guz, Agnieszka Orzińska, Monika Pelc-Kłopotowska, Bogumiła Michalewska

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHIT, Kierownik: Prof. dr hab.n.med. Ewa Brojer, Warszawa, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 31.05.2013

Zaakceptowano: 04.07.2013

Dostępne online: 18.07.2013

Słowa kluczowe:

- słabe odmiany RhD
- gen RHD
- ograniczanie alloimmunizacji

Keywords:

- Weak D
- RHD gene
- Prevention of alloimmunisation

ABSTRACT

One of the basic rules of transfusion is to prevent alloimmunisation by highly immunogenic RhD antigen and not to transfuse RhD negative individuals with RhD positive blood. In some cases the expression of this antigen is so weak that it is undetectable in routine serological tests. The paper presents an algorithm for mass DNA testing with the purpose of identifying donors with low RhD expression. The screening is based on RHD gene detection (absent in RhD negative Caucasians) in DNA isolated from pools of 96 plasma samples from blood donors identified as RhD negative by the routine serological methods in Blood Transfusion Centers. Such procedure substantially reduces the costs. Plasma samples can be brought from the territory of the whole country, stored and accumulated for testing in one selected center. The cost would amount to approximately 25 PLN per donor. The test is performed once for each RhD negative individual. It is estimated that such persons will represent approximately 0.2% of RhD negative donors.

© 2013 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

Układ Rh jest najbardziej polimorficznym układem grupowym krwinek czerwonych, a jego antygeny, w tym przede wszystkim antygen D, mają bardzo wysoką immunogenność. Jedną z podstawowych zasad postępowania w transfuzjologii jest przetaczanie osobom RhD ujemnym krwi bez antygenu D. Jest to szczególnie istotne, gdy biorcą krwi jest kobieta w wieku rozrodczym. U około 0,2–1% osób występują słabe odmiany antygenu D, wśród których wyróżnia się D słaby, D częściowy i DEL [1]. Mogą one stymulować produkcję alloprzeciwciał

anty-D u RhD ujemnych pacjentów po przetoczeniu krwi lub w czasie ciąży. Wiele odmian antygenu D, a szczególnie DEL, ma tak słabą ekspresję, że w rutynowo stosowanych technikach serologicznych niemożliwe jest jego wykrycie. Można je natomiast wykryć i zidentyfikować za pomocą badań molekularnych na poziomie DNA, wykrywając gen RHD. U RhD ujemnych osób rasy kaukaskiej gen ten nie występuje [2]. Dotychczas zidentyfikowano ponad 280 alleli RHD powstałych na skutek różnego typu mutacji, w wyniku których antygen

* Adres do korespondencji: Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, ul. Chocimska 5, 00-791 Warszawa, Polska. Tel.: +48 (22) 34-96-600 w. 204, fax: +48 (22) 34-96-618.

Adres email: ebrojer@ihit.waw.pl (E. Brojer).

D na krwinkach ma określony fenotyp słabej odmiany. Informacje o wykrywanych allelach z ich genetyczną i fenotypową charakterystyką zamieszczane są w internetowej bazie danych [3, 4]. U osób ze słabą ekspresją antygeny D najczęściej występują różne mutacje punktowe w regionach przezblonowych lub wewnątrzkomórkowych białka RhD. Niektóre hybrydy RHD-CE-D również mają obniżoną ekspresję antygeny D. Na szczególną uwagę zasługują tzw. warianty DEL, w których antygen D ma wybitnie słabą ekspresję i serologicznie można go wykryć jedynie techniką adsorpcji/elucji. Warianty te mają różną charakterystykę molekularną [3].

Na immunogenność niektórych antygenów D o bardzo słabej ekspresji dla RhD ujemnych biorców krwi wskazuje szereg doniesień. Garatty uważa na przykład, że przeciwciała anti-D obserwowane u RhD ujemnych biorców, którzy zawsze dostawali krew RhD ujemną, są prawdopodobnie skutkiem alloimmunizacji przez przetoczone „bardzo słabe D”, a nie, jak dotychczas próbowano wyjaśniać, przez zanieczyszczenie koncentratów krwinek płytkowych (KKP) lub osocza krwinkami RhD dodatkami. Wiadomo, że do alloimmunizacji wystarcza 30 cząsteczek antygeny D, czyli możliwa jest alloimmunizacja nawet przez krwinki DEL [5].

Immunizacje antygenem D o słabej ekspresji opisywano między innymi w następujących publikacjach: D słabe typu 2 [6], chimera D+/- [7], D słabe typu 26 [8], warianty DEL o różnym podłożu [9-11].

Do oznaczeń statusu RhD u dawców stosuje się możliwie najczulsze metody badań za pomocą dwóch monoklonalnych odczynników anti-D różnych klonów, wykrywających większość słabych odmian antygeny D. Spośród stosowanych metod najmniej czuła jest technika szkiełkową i dlatego też nie jest ona zalecana do badań u dawców. Technika próbówkowa w teście bezpośredniej aglutynacji (w NaCl) ma z kolei czułość mniejszą niż technika próbówkowa z zastosowaniem pośredniego testu antyglobulinowego (PTA). Wysoką czułość mają techniki mikrokolumnowe, a także inne, jak technologia *capture* czy technologia magnetyzowanych krwinek. Dodatkowo u osób z ujemnymi wynikami tych testów można wykonywać badania z różnymi zestawami przeciwciał monoklonalnych, które swoiście identyfikują niektóre antygeny o słabej ekspresji. Żadna z tych technik nie pozwala jednak wykryć żadnego z wyżej wymienionych antygenów DEL, których immunogenność została udowodniona.

Podsumowując, przy użyciu metod serologicznych nie da się zidentyfikować wszystkich wariantów D o słabej ekspresji. Można je natomiast wykryć genetycznie, poszukując genu RHD u osób oznaczonych serologicznie jako RhD ujemne.

Uzupełnienie badań serologicznych u krwiodawców badaniami molekularnymi poszukiwania genu RHD stosowane jest obecnie w kilku krajach. W Niemczech, gdzie rutynowo oznacza się RhD u dawców testem antyglobulinowym z monoklonalnymi anti-D techniką w żelu (czyli techniką o wysokiej czułości), dawcy RhD- są badani w pulach po 20 techniką PCR z primerami do genu RHD. Częstość osób RHD+/RhD- wynosi 0,2%. Wśród tych dawców jest ok. 0,1% osób z antygenem DEL wykrywanym tylko techniką adsorpcji/elucji [7, 12].

W Austrii oznacza się RhD metodą automatyczną Olympus z dwoma klonami anti-D tylko w bezpośredniej

aglutynacji. Dawcy RhD- są badani w pulach po 20 techniką *real-time* PCR z primerami do RHD. Osób RhD ujemnych w badaniach serologicznych, a dodatkich w badaniach genetycznych, jest tam około 0,4%; trzy czwarte osób z tej grupy (czyli około 0,3% z całej populacji osób RhD-) miało allele typu słabe D lub DEL, które mogą powodować alloimmunizację u biorcy krwi. Najczęstszy to wariant słabe D typ 4.3 i RHD (IV3 + 1G > A) [13].

Badania genu RHD u RhD ujemnych dawców w Polsce wykonywano przez ostatnie trzy lata w ramach projektu badawczego Grant nr N N404 188036 we współpracy z Centrami Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku, Kaliszu, Kielcach, Krakowie, Radomiu, Raciborzu i w Warszawie. W Centrach tych stosuje się do oznaczania statusu RhD dawców metody wymienione w tabeli I z odczynnikami zawierającymi różne klony przeciwciał anti-D w tym jeden wykrywający DVI.

Badano próbki osocza od 31 200 kolejnych dawców, wytypowanych jako RhD ujemni w badaniach rutynowych. Dla obniżenia kosztów zastosowano technikę pulowania osocza od 96 dawców. DNA izolowane było z puli osocza od dawców RhD ujemnych za pomocą wysoko wydajnej metody automatycznej. Gen RHD wykrywano bardzo czułą techniką *real-time* PCR z primerami do trzech regionów genu RHD: intronu 4, eksonów 7 i 10. Zidentyfikowano 63 osoby RhD ujemne z genem RHD (0,18%). Osoby RHD+/RhD- miały fenotypy: dCcee, dCCee, dccEe, dCcEe, które występują tylko u 1,14% ludzi. Wśród osób RhD ujemnych fenotypy te występują w ok. 6,6% przypadków, bo absolutna większość osób RhD ujemnych ma fenotyp dcee.

U osób RhD ujemnych z wykrytym genem RHD prowadzono dalsze badania w celu wykazania, czy gen ten ulega ekspresji – czyli, czy na erytrocytach dawcy jest obecny potencjalnie immunogeny antygen RhD. Stosowano metody molekularne i metody serologiczne. Każda z metod zastosowanych do realizacji tego celu ma pewne zalety, ale też i ograniczenia. Zestaw metod przydatnych do badań jest wymieniony w tabeli II.

Charakterystyka molekularna genu RHD u osób RHD+/RhD-

Badania molekularne mają na celu scharakteryzowanie genu RHD i wykazanie, jaka mutacja doprowadziła do tego, że za pomocą rutynowych metod serologicznych antygen RhD nie jest wykrywany. Zestaw metod, którymi się do tego celu można posłużyć, obejmuje komercyjne testy oparte na technice PCR, w których identyfikuje się znane allele genu RHD. Stosuje się w nich najczęściej amplifikację za pomocą primierów swoistych dla alleli lub grup alleli (technika SSP PCR). Inne metody opierają się na hybrydyzacji produktu amplifikacji fragmentów genu RHD z sondami swoistymi dla alleli. Swoiste połączenie się sondy z badanym DNA świadczy o obecności analizowanej sekwencji/allelu u osoby badanej. Wynik badania oceniany jest za pomocą różnych technologii z zastosowaniem technik fluorescencji czy chemiluminometrii z laserowym odczytem (np. Blood Chip, Luminex). Do badań można też stosować technikę opartą na swoistej amplifikacji fragmentów genu poprzez zastosowanie sond

Tabela I – Metody i techniki stosowane w Polsce do oznaczania RhD u krwiodawców
Table I – Methods and techniques applied in Poland to determine RhD in blood donors

- Technika szkiełkowa z anty-D IgM i anty-D IgM+IgG, jeśli ujemna reakcja badanie techniką probówkową
- Technika probówkowa z anty-D IgM i anty-D IgM+IgG w teście NaCl
- Technika probówkowa: anty-D IgM w teście NaCl, anty-D IgM+IgG w PTA
- Technika mikrokolumnowa manualna z anty-D VI+ i z anty-DVI-
- Metody automatyczne z anty-D VI+ i z anty-DVI-, niektórzy dodatkowo z anty-D weak w pośrednim teście antyglobulinowym (PTA)

Tabela II – Metody molekularne i serologiczne przydatne do ustalania, których dawców z wykrytym genem RHD uznać za RhD dodatnich
Table II – Molecular and serological methods useful for determining which donor with RHD gene can be considered as RhD positive

Badania molekularne	Badania serologiczne
PCR SSP	techniki rutynowe czulsze niż zastosowane
Blood chips (microarray)	zestawy odczynników monoklonalnych
Luminex	techniki nanotechnologii
MLPA	technika adsorpcji/elucji
inne	
Sekwencjonowanie	

ulegających ligacji (MLPA; Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Zasadniczym ograniczeniem wszystkich wymienionych tu metod jest to, że pozwalają na analizę tylko znanych alleli. Alternatywą do tych technik jest tzw. bezpośrednie sekwencjonowanie genu RHD, dzięki któremu możliwe jest ustalenie sekwencji nukleotydów w eksonach, a także w intronach genu RHD. Technika ta daje więc możliwość wykrycia nowych, nieopisanych dotąd alleli. Brak białka RhD u osoby, u której wykrywa się gen RHD, może też wynikać z mutacji innych genów, kodujących białka, które są niezbędne do ekspresji. Możliwe jest też, że mutacja dotyczy genów regulatorowych genu RHD. W takich przypadkach

sekwencjonowanie samego genu RHD nie jest wystarczające. Zalety i wady poszczególnych metod molekularnych dla charakterystyki genu RHD przedstawia tabela III.

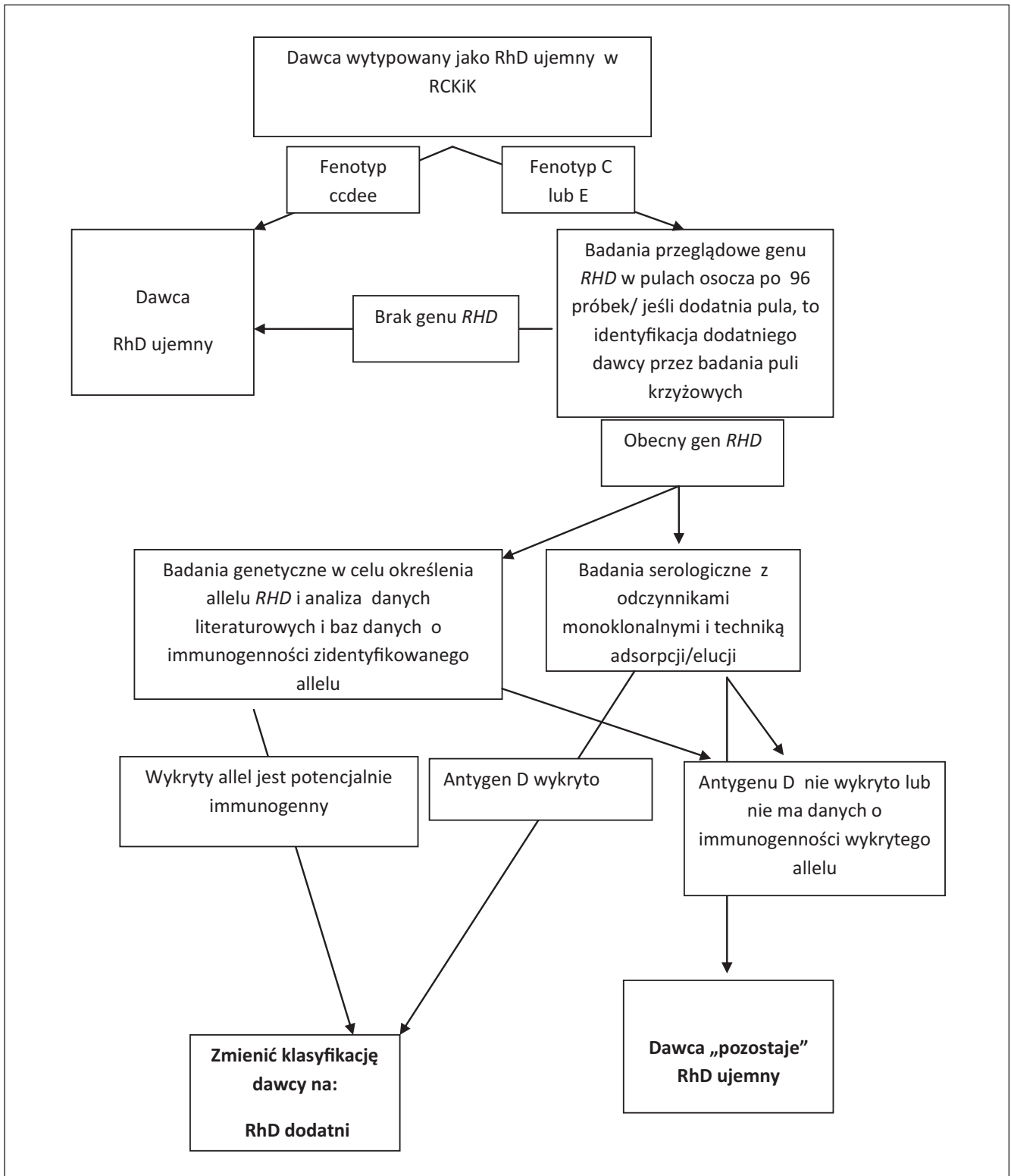
Ustalenie nazwy allelu oraz charakteru i miejsca wystąpienia w mutacji w genie RHD pozwala na wnioskowanie o tym, czy u danej osoby produkowane jest białko RhD lub jego fragment. By odpowiedzieć na pytanie o skutki wykrytej mutacji, a także ustalić, czy allel jest odpowiedzialny za produkcję potencjalnie immunogennego białka, należy dokonać analizy literatury [3].

Wiele mutacji (przede wszystkim insercje i delecje powodujące przesunięcie ramki odczytu) jednoznacznie wskazują, że białko nie jest produkowane lub produkowany jest tylko jego fragment, bo w sekwencji DNA pojawia się sygnał „stop”. Inna duża grupa mutacji w genach układu Rh ma charakter translokacji, w których pewne fragmenty genu RHD zostały zastąpione fragmentem genu RHCE. Wielkość tego fragmentu i region, który jest objęty tą zmianą, determinuje to, czy produkowane białko ma epitopy antygenów Rh [3].

W roku 2010 ISBT ustaliło obowiązujące zasady nazewnictwa alleli genu RHD, z którego można odczytać informację, czy dany allel koduje białko o potencjalnej istotności klinicznej, czy też jest allelem „cichym” [14]. Według nomenklatury ISBT, allel RHD, który koduje „typowe” białko RhD, jest nazwany allelem RH*01. Allele fenotypowo RhD ujemne mają oznaczenie N (od ang. null). I tak np. allel odpowiedzialny za fenotyp RhD minus u absolutnej większości osób RhD ujemnych, w którym nastąpiła całkowita delecja genu RHD, oznaczony jest jako RH*01N.01. Z kolei allel, który jest podstawą fenotypu RhD ujemnego w rasie czarnej (Tzw. RHD ψ wynikający z insercji 37 nukleotydów) jest oznaczony jako RHD*01N.02. Allele kodujące fenotypy tzw. D częściowego otrzymują, w miarę możliwości, numery alleli analogiczne do dotychczas używanych w serologii. Allel kodujący „częściowy” antygen DVI otrzymał więc nazwę RHD*06, a kolejno odkrywane jego formy alleliczne (różniące się na poziomie DNA, a nie różniące fenotypowo) otrzymują kolejne numery RHD*06.01, RHD*06.02. Allele wykazujące słabą ekspresję antygeny RhD są oznaczane literą W (od ang. weak) np. RHD*01W.01 (typ 1) lub numerami rozpoczynającymi się od 100. Allele o słabej ekspresji, wykrywane jedynie techniką adsorpcji/elucji, są też oznaczane literą W i kolejnymi numerami lub numerami zaczynającymi się od 200.

Tabela III – Badania molekularne dla identyfikacji alleli RHD – zalety/wady
Table III – Molecular studies for RHD allele identification – advantages/disadvantages

PCR SSP	Blood chips (microarray lub technika Luminex)	Sekwencjonowanie
Proste, wdrożone, relatywnie niedrogie Identyfikuje nie wszystkie allele	Drozsze niż PCR SSP Identyfikuje więcej alleli niż PCR SSP, ale nie wszystkie	Cena zbliżona do Blood chip Identyfikuje dotąd poznane oraz nowe allele RHD; bardzo rzadko nie udaje się identyfikacja alleli, gdy mutacje dotyczą innych genów (np. RHAG)
(testy firmy InnoTrain: D weak-SSP – 11 typów D słabego, CDE-SSP – 54 warianty, d-neg SSP – 8 wariantów)	(D słabe – 19 typów, D częściowe – 53 warianty, Del – 8 wariantów, D ujemne – 34 alleli typu null)	



Ryc. 1 – Algorytm klasyfikacji dawcy jako RhD- lub RhD+ po badaniach genu RHD.
 Fig. 1 – Classification algorithm donor as RhD negative or RhD positive after RHD gene studies

Podsumowanie wyników badań molekularnych genu RHD i serologicznych antygenów RhD u polskich dawców RhD-/RHD+

W grupie 31 200 kolejnych RhD ujemnych dawców krwi zidentyfikowano 63 osoby, u których obecny był gen RHD. Zidentyfikowano u nich następujące allele genu: RHD*01N.03 (n = 17), RHD*15 (n = 12), RHD*11 (n = 7), RHD*DEL8 (n = 3), RHD*01W.2 (n = 3), RHD-CE(10) (n = 3), RHD*01W.3, RHD*01W.9, RHD*01N.05, RHD*01N.07, RHD*01N.23, RHD*(IVS1-29G > C). Dodatkowo zidentyfikowano dwa allele nieopisane dotąd w literaturze: RHD*(767C > G) (n = 3), RHD*(1029C > A). Badania serologiczne za pomocą zestawów odczynników monoklonalnych i techniki adsorpcji/elucji były wykonane u 47 spośród tych osób. Antygen RhD wykryto u 27 z nich. Przeprowadzone badania wykazały, że za pomocą opracowanej strategii u 0,2% dawców RhD ujemnych można wykryć gen RHD, a u blisko 60% z tych osób gen ulega ekspresji, a jego produkt jest potencjalnie immunogeny. Żaden z dawców z wykrytym genem RHD nie miał fenotypu dccee, wszyscy dawcy z genem RHD byli RhC+ lub RhE+.

Podsumowanie i wnioski – propozycja algorytmu badań dla ograniczenia alloimmunizacji słabymi odmianami antygenów RhD

Prowadzone przez nas badania, a także badania prowadzone w innych krajach, wskazują, że za pomocą metod analizy DNA można zidentyfikować dawców z odmianami RhD o słabej ekspresji, które mogą immunizować biorców krwi. Badania te można wykonywać w próbkach zlewanych w pułce, co zasadniczo zmniejsza ich koszty. Osocze dawców RhD ujemnych RhC dodatnich lub/i RhE dodatnich przeznaczone do pulowania i wykonywania badań przeglądowych na obecność genu RHD może być gromadzone i przechowywane w zamrożeniu. Badanie wykonywane będzie jeden raz u poszczególnego dawcy. Koszt badań przeglądowych dla identyfikowania dawców RhD ujemnych z obecnym genem RHD w przeliczeniu na jednego dawcę wynosić będzie około 25 zł. Według przeprowadzonych szacunków, należy spodziewać się, że takie osoby będą stanowiły około 0,2% dawców RhD ujemnych. Proponowany algorytm badań przedstawia rycina 1.

Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Praca wykonana w ramach projektu badawczego N N404 188036 z Narodowego Centrum Nauki.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Wagner FF, Gassner Ch, Müller TH, et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93:385-393.
- [2] Daniels G. *Human Blood Group*, 3rd edn., Oxford: Wiley; 2013.
- [3] www.uni-ulm.de/~wfllegel/RH/
- [4] <http://www.ebi.ac.uk/ena/>
- [5] Garratty G. Do we need to be more concerned about weak D antigens? *Transfusion* 2005;45:1547-1551.
- [6] Flegel W, Khull S, Wagner F. Primary anti-D immunization by weak D type 2 RBCs. *Transfusion* 2000;40:428-434.
- [7] Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet* 2001; 2:10.
- [8] Gassner C, Doescher A, Drnovsek TD, et al. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion* 2005;45:527-538.
- [9] Wagner T, Kormoczi GF, Buchta C, et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 2005;45:520-526.
- [10] Kormoczi GF, Gassner C, Shao CP, et al. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion* 2005;45: 1561-1567.
- [11] Mota M, Fonseca N, Rodrigues A, et al. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Transfusion* 2008; 88:130-135.
- [12] Flegel WA. Homing in on D antigen. *Transfusion* 2005;45:466-468.
- [13] Polin H, Danzer M, Gaszner W, et al. Identification of RHD alleles with the potential of anti-D immunization among seemingly D- blood donors in Upper Austria. *Transfusion* 2009;49:676-681.
- [14] <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/blood-group-terminology/blood-group-allele-terminology/>