

Praktični aspekti serološkog testiranja D weak fenotipa

Andrijana D. Kulić, Vesna I. Libek, Ana M. Strugar

Služba za transfuziju krvi KBC Zemun, Beograd

Apstrakt

Cilj našeg istraživanja je bio da utvrdimo u kom procentu je D weak antigen prisutan kod primaoca i trudnica u našoj ustanovi, kao i koji Rh fenotip dominira kod tako tipiziranih eritrocita. Za određivanje RhD antigena koristili smo dve različite serije monoklonskih anti-D test reagenasa. Uzorci koji su u Indirektnom antiglobulinskom testu bili pozitivni označeni su fenotipom D weak. Dalje ispitivanje fenotipa D weak je sprovedeno sa dva monoklonska IgM anti-D test reagensa različitih proizvoda. Ispitivanim eritrocitima označenim kao D weak određen je i Rh fenotip korišćenjem monoklonskih test seruma anti-C, anti-c, anti-E i anti-e. U toku 2009. godine 11779 uzoraka bolesnika i trudnica je rutinski tipizirano na prisutnost RhD antiga. Nakon izvođenja Indirektnog antiglobulinskog testa 42 uzorka su određena kao D weak fenotip (0,35%). Dominantni Rh fenotipi kod D weak pozitivnih eritrocita su bili CcD^w ee (78,5%) i CCD^w ee (16,6%). Aglutinacije sa dva IgM anti-D test reagensa u pokazivale različit intenzitet i stepen aglutinacije. Eritrociti 14 uzoraka (33,3%) su pokazali odsustvo aglutinacije (negativan rezultat) sa oba reagensa. Samo eritrociti 6 uzoraka (14,2%) su imale skor aglutinacije od +3 do +4. Našim ispitivanjem smo ustanovili da je procenat pojavljivanja fenotipa D weak u sa- glasnosti sa podacima objavljenim u literaturi. Pravilnim odabirom anti-D test seruma, kao i poštovanjem savremenih preporuka za testiranje RhD antiga moguće je serološkim testiranjem odrediti slabiju varijantu D antiga. Jedini pozudani testovi koji omogućavaju razrešavanje antigen D diskrepance su molekularni testovi, koji na žalost u našoj zemlji još uvek nisu implementirani.

Ključne reči: D weak antigen, Rh fenotip, anti-D test serumi, aglutinacijski skor

Uvod

Klinički značaj RhD antiga proizilazi iz njegove izuzetne imunogenosti, odnosno sposobnosti da dovede do aloimunizacije i posledično tome skraćenje životnog veka eritrocita. Poseban oblik RhD antiga u transfuzijskoj medicini se naziva D weak antigen. D weak antigen se generalno smatra kompletnim D antigenom sa svim prisutnim epitopima koji su slabije izraženi. Učestalost D weak fenotipa varira i smatra se da

Practical aspect of D weak testing in CHC Zemun

Andrijana Dj. Kulic, Vesna I. Libek, Ana M. Strugar

Blood Bank Department CHC Zemun, Belgrade, Serbia

Abstract

The aim of investigation was to summarise the percentage of D weak phenotype at recipients and pregnant women in our hospital. We also wanted to see what Rh phenotype is dominant in that typed RBCs. The routine D typing was performed using tube technique with two different series of anti-D reagents. Samples marked as phenotype D weak were further investigated with two IgM anti-D reagents from different manufacturers. RBCs were also tested for RH phenotype with monoclonal test reagents anti-C, anti-E, anti-c and anti-e. During 2009, 11779 patient and pregnant woman samples were routinely D typed. After we performed the indirect antiglobulin test D weak expression was exhibited for 42 samples (0,35%). Among the 42 D weak positive samples dominant RH phenotypes were CcD^w ee (78,5%) and CCD^w ee (16,6%). Agglutinations with the two IgM reagents showed different intensity of the reactions. RBC of 14 samples (33,3%) did not react with both reagents and six samples had score of agglutination between +3 to +4 (14,2%). The percentage of D weak phenotype in this study is correspondent to those described in the literature. Respecting the current recommendation for D antigen typing and also with adequate selection of anti-D test serums we can distinguish weak D phenotype by serological typing. Molecular testing is the best solution to resolve of an accurate D antigen status, but in our country it is still not implemented.

Key words: D weak antigen, Rh phenotype, anti-D test serums, score of agglutination

je u proseku 0,2 do 1% ispitanika određeno kao fenotip D weak^{1,2}. Genetska pozadina slabije ekspresije D antiga leži u mutacijama u RHD genu, odnosno u substituciji aminokiselina u transmembranskom i intracellularnom domenu proteina, dok su ekstraceluluarni segmenti normalne strukture^{2,3,4}. Takve promene utiču na drugačije ugradivanje D proteina u eritrocitnu membranu, što za posledicu ima redukovani broj antigen-skih mesta na eritrocitu. U rutinskom testiranju D weak antigen može reagovati slabo sa monoklonskim anti-D test serumima ili može da reaguje samo u indirektnom antiglobulinskom testu^{1,5}.

Posmatrano sa aspekta različitih varijanti D antiga serološko razdvajanje RhD pozitivnih i RhD negativnih eritrocita nije uvek jednostavno. Greške u određivanju D antiga mogu rezultovati aloimunizacijom i stvaranjem anti-D antitela, što može dovesti do problema prilikom izbora krvnih komponenti za primaoca i imunoprofilakse kod trudnica i porodilja. Rešenje diskrepance u serološkom testiranju moguća je jedino analizom na molekularnom nivou^{5,6}.

Cilj našeg istraživanja je bio da utvrdimo u kom procentu je D weak prisutan kod primaoca i trudnica u našoj ustanovi, kao i koji Rh fenotip dominira kod tako tipiziranih eritrocita. Istovremeno smo želeli da utvrdimo da li primenom različitih monoklonskih IgM anti-D test serumata postoji razlika u stepenu aglutinacije kod ovog oblika D antiga.

Materijal i metode

U istraživanju smo koristili epidemiološku studiju preseka. Studijom smo obuhvatili 11779 uzoraka krvi trudnica i bolesnika koji su u našu Službu primljeni radi određivanja ABO I RhD krvne grupne pripadnosti u periodu od 01.01. do 31.12. 2009. godine. Za određivanje RhD antiga koristili smo dve različite serije monoklonskih anti-D test reagenasa (Seraclone® anti-D Blend Clone BS232 IgM/ BS221/H41 11B7 IgG). Eritrociti koji su u preliminarnom testiranju označeni kao RhD negativni dalje su testirani indirektnim antiglobulinskim testom (IAT)⁷. Uzorci koji su u IAT bili pozitivni označeni su fenotipom D weak. Dalje ispitivanje fenotipa D weak je sprovedeno sa dva monoklonska IgM anti-D test reagensa različitih proizvođača (Biotest® Clone BS 232 IgM and Sanquin Clone MS201). Ispitivanim eritrocitima označenim kao D weak određen je i Rh fenotip korišćenjem monoklonskih test serumata anti-C (Seraclone® Clone MS24), anti-c (Seraclone® Clone MS33), anti-E (Seraclone® Clone MS258/906) i anti-e (Seraclone® MS16/MS21/MS63). Da bi izbegli mogućnost lažno pozitivnih rezultata svim ispitivanim uzorcima krvi je urađen Direktan Coombsov test⁷. Sva testiranja su izvedena metodom u epruveti, a stepen aglutinacije je gradiran i skorovan metodom po Marshu⁸. Rezultati su prikazani tabelarno, grafički i izraženi u procentima.

Rezultati

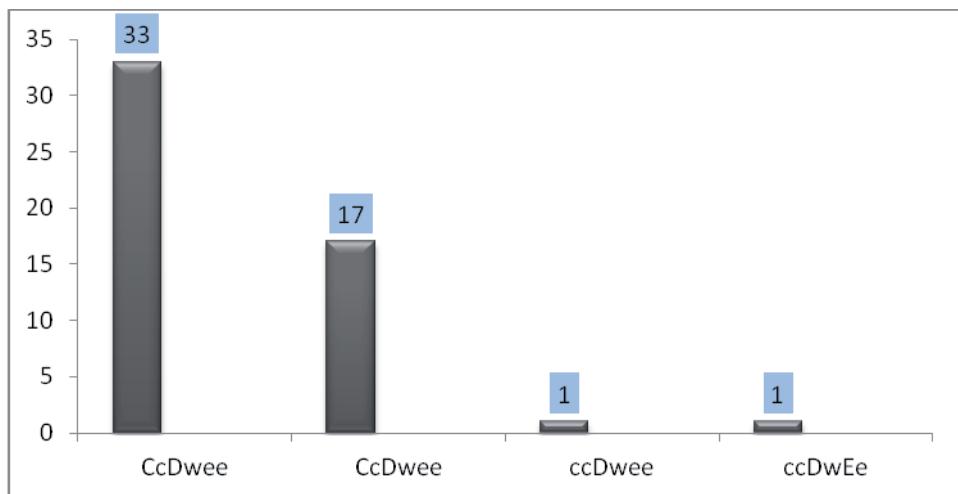
U toku 2009. godine 11779 uzoraka bolesnika i trudnica je rutinski tipizirano na prisutnost RhD antiga. Od ukupnog broja ispitivanih uzoraka 7767 (65,93%) su bili uzorci bolesnika iz naše ustanove, dok je 4012 (34,07%) uzoraka pripadalo trudnicama kojima je ambulantno određivana krvna grupa. Posle inicijalnog testiranja 1684 uzorka (14,29%) je izdvojeno i preliminarno označeno kao RhD negativno. U dalje testiranje je uključeno i 20 uzoraka krvi kod kojih je u prvom čitanju stepen aglutinacije bio +1 ili +/-.

Posle inkubacije na 37°C u trajanju od 15 minuta i izvođenja Indirektnog antiglobulinskog testa 42 uzorka su određena kao D weak fenotip (0,35%). Prevalenca D weak antiga kod ispitanika je prikazana u Tabeli 1.

	RhD pozitivni	RhD negativni	D weak	Ukupno
Bolesnici	6610	1138	19	7767
Trudnice	3413	576	23	4012
Σ	10023	1714	42	11779

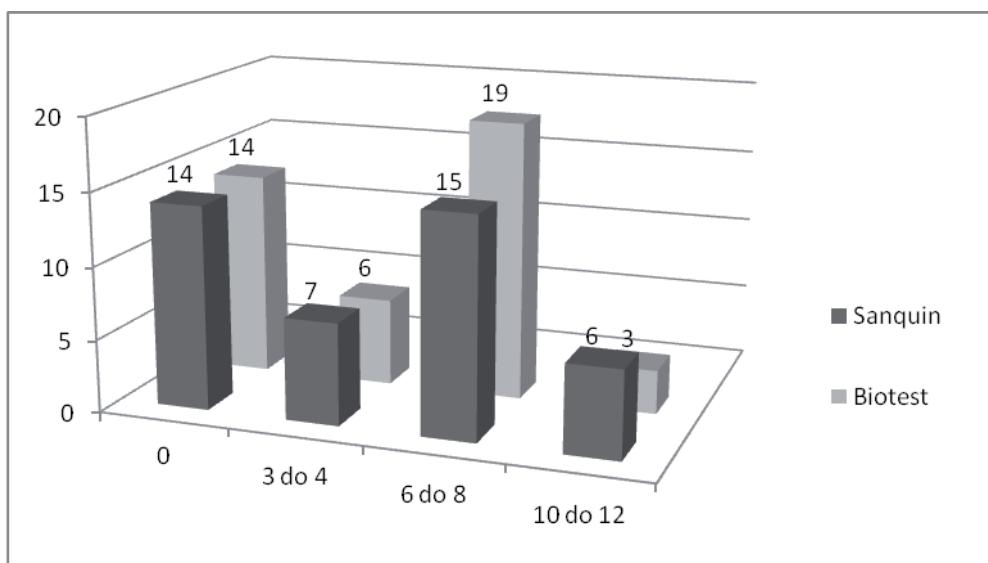
Tabela 1. Prevalenca D weak antiga kod ispitivanih uzoraka

Dominantni Rh fenotipi kod D weak pozitivnih eritrocita su bili CcD^w ee (78,5%) i CCD^w ee (16,6%). (Grafikon 1.)



Grafikon 1. Učestalost Rh fenotipa kod D weak pozitivnih eritrocita

Aglutinacije sa dva IgM anti-D test reagensa u pokazivale različit intezitet i stepen aglutinacije. Eritrociti 14 uzoraka (33,3%) su pokazali odsustvo aglutinacije (negativan rezultat) sa oba reagensa. Samo eritrociti 6 uzoraka (14,2%) su imale skor aglutinacije od +3 do +4. (Grafikon 2.)



Grafikon 2. Stepen aglutinacije kod D weak antigena sa IgM anti-D test serumima različitih proizvođača

Diskusija

U našem ispitivanju prevalenca D weak antigena odgovara rezultatima opisanim u literaturi, dok je distribucija Rh fenotipa ista kao i kod evropske populacije ^{1,3}. Označavanje eritrocita kao D weak sa sobom donosi niz dilema i problema vezanih sa savremenu transfuziološku praksu. Posmatrano iz ugla transfuziologa

to podrazumeva adekvatan odabir metoda ispitivanja, test seruma i na kraju pravilnog odabira krvne komponente za primaoca i imunoprofilakse kod trudnica i porodilja.

Smatra se da je najveći stepen subjektivnosti u testiranju fenotipa D weak prisutan kod metode u epruveći. Tome svakako doprinose i drugi tehnički faktori kao što su temperatura testiranja, brzina centrifugiranja, koncentracija proteina što može dovesti do varijabilnih rezultata, čak i kod ponavljanih testiranja istog uzorka⁹. Mi smo kao metod ispitivanja odabrali metod u epruveti, ali poštujući savremene preporuke za tipiziranje D antigena mogli smo serološkim testiranjem dokazati D weak antigen.

U poslednje vreme sve je više izveštaja koji prezentuju rezultate o anti D monoklonskim test serumima (MoAbs) naglašavajući razlike u reaktivnosti sa D weak fenotipom¹⁰. Bez obzira na to što su formulisani sa visokim aviditetom i afinitetom, varijacije u koncentraciji i dodatim potencijatorima mogu dovesti do različitog aglutinacijskog kapaciteta, što za posledicu može imati greške u tipiziranju D antigena^{11, 12, 13}. Varijabilnost u reaktivnosti sa eritrocitima označenim kao D weak je pokazana i u našem istraživanju. Više od trećine uzoraka koje smo na osnovu indirektnog antiglobulinskog testa proglašili fenotipom D weak, sa monoklonskim IgM anti-D test serumom su dali negativan rezultat. Preporuke Vodiča za Službe za transfuziju krvi Velike Britanije sugerisu da se takvi uzorci označavaju kao RhD negativni. Za određivanje D antigena, prema njihovoj preporuci, upotrebljavaju se monoklonski IgM anti-D test serumi koji ne dokazuju D parcijal VI kategorije^{13, 14, 15}. U našim uslovima primena indirektnog antiglobulinskog testa za dokazivanje D weak antigena kod bolesnika omogućava bolji uvid u incidencu ovog fenotipa u našoj populaciji, što daje prostora za dalja molekularna ispitivanja.

Treća dilema vezana za praktične aspekte serološkog testiranja D weak fenotipa je obezbeđivanje bezbedne strategije u primeni labilnih krvnih komponenti bolesnicima i prenatalnoj zaštiti trudnica. To se pre svega odnosi na pitanje da li bolesnici i trudnice seološki određeni kao D weak fenotip treba tretirati kao RhD negativne. Pojedini autori smatraju da odluka o transfundovanju D weak bolesnika zavisi od godišta i pola. Tako su muškarci i žene starije od 50 godina života tipizirane kao D weak kandidati za transfuziju D pozitivne krvi^{15, 16}. U nedostatku komercijalnih setova za serološko ispitivanje različitih varijanti D antigena trudnice i porodilje sa ovim fenotipom se tretiraju kao RhD negativne i kandidati su kako za primenu hiperimunog anti-D imunoglobulina, tako i eventualnu primenu D negativnih krvnih komponenti.

Naše ispitivanje je imalo i određena ograničenja. Ona se pre svega odnose na nemogućnost preciznog određivanja tipa D weak antigena. Molekularnim ispitivanjima do sada je otkriveno preko 40 različitih tipova D weak antigena¹⁷. Imunogenetska ispitivanja u transfuzijskoj medicini kod nas još uvek nisu dostupna, pa nismo mogli sprovesti detaljnija istraživanje na tom nivou.

Zaključak:

Našom studijom smo ustanovili da je procenat pojavljivanja fenotipa D weak u saglasnosti sa podacima objavljenim u literaturi. Pravilnim odabirom anti-D test seruma, kao i poštovanjem savremenih preporuka za testiranje RhD antigena moguće je serološkim testiranjem odrediti slabiju varijantu D antigena. Implementacijom molekularnih testova u savremenu transfuziološku praksu razrešile bi se brojne nedoumice i sumnje u testiranju posebnih oblika D antigena.

Literatura

1. Geoff Daniels. Human Blood Groups. 2002; second edition: p. 218.
2. Jovanović S, Srzentić D, Veljković M. Imunobiološki i klinički značaj krvnih grupa. Inra. Net Communication Beograd; 2009.:151.
3. Wagner FF, Gassner C, Muller TH. Molecular basis of weak D phenotypes. Blood 1999; 93: 385–393.
4. Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Le Pennec PY, Roussel M, Patereau C, Noizat-Pirenne F. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. Transfusion 2004;44:1282-6.

5. G. Garratty. Do we need to be more concerned about weak D antigens? *Transfusion* 2005;45:1547-1551.
6. Denomme GA, Wagner FF, Fernandes BJ, Li W, Flegel WA. Partial D, weak D types, and novel *RHD* alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion* 2005;45:1154-1160.
7. Technical Manual – 15 th ed, Bethesda, MD: AABB; 2005. p 271-87.
8. Marsh WL. Scoring of hemagglutination reactions. *Transfusion* 1972;12:352.
9. Denomme GA, Dake LR, Vilensky DI, Ramyar L, Judd WJ. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion* 2008;48:473-478.
10. Lai M, Grasso C, Boschi I, D'Onofrio G, Pascali V, Leone g. Characterization of anti-D monoclonal antibody reagents based on their reactivity with the weak D phenotype. *Transfusion* 2009;49:937-942.
11. Jones J, Filbey D. Selection of monoclonal antibodies for the identification of D variants: ability to detect weak D and to split epD2, epD5 and epD6/7. *Vox Sang* 1996;70: 173-9.
12. Williams M. Monoclonal reagents for rhesus-D typing of Irish patients and donors: a review. *Br J Biomed Sci* 2000; 57:142-93.
13. Working party of the British Committee for Standards in Haematology, Blood transfusion task Force. Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Transf.Med.* 2004; 14: 59-73.
14. Flegel WA. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. *Curr Opin Hematol* 2006; 13:476-83.
15. Kumpel B. Are weak D RBCs really immunogenic? *Transfusion* 2006;46:1061-2; discussion 1062-6.
16. Noizat-Pirenne F, Verdier MA, Mercadier A, Bonin P, Peltier-Pujol F, Fialaire-Legendre A, et al. D phenotypes and transfusion safety: where do we stand in daily practice? *Transfusion* 2007;47:1616-1620.
17. S. Jovanović-Srzentić. Aktuelni pristup rešavanju problema u imunohematoškoj praksi. *Bilten za transfuziologiju* 2006, br.2-3:52-5.

Autor za korespondenciju:

Andrijana Kulic

Služba za transfuziju krvi KBC Zemun, Beograd

Vukova 9

Telefon:2614442

Email:

andrijana_kulic@ptt.rs