

Serologische detectie van RhD varianten

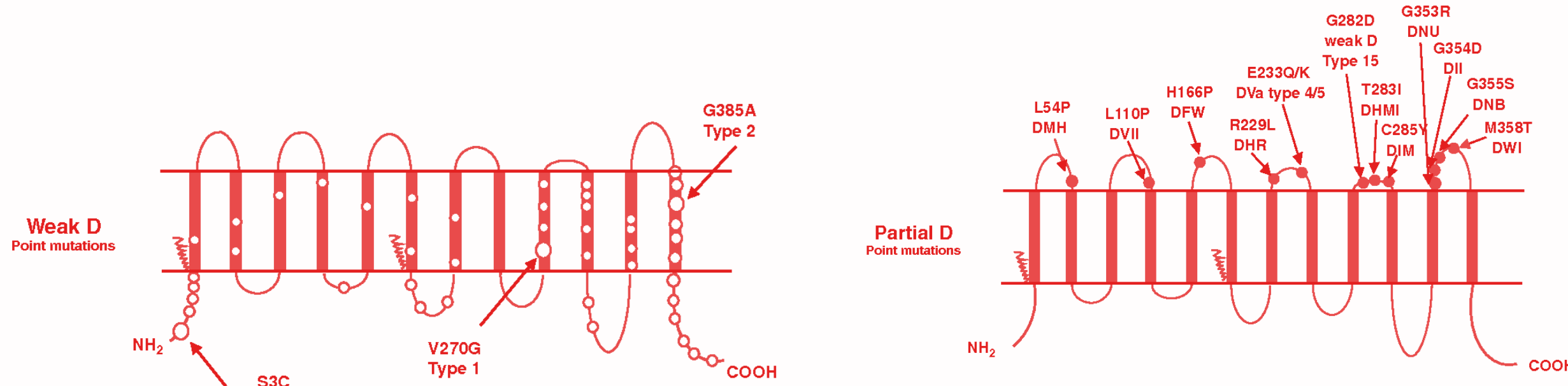
Mayra Janssens - Bloedbanklabo Leuven

Introductie

Het RhD antigeen is naast ABO één van de belangrijkste bloedgroepantigenen. De aan- of afwezigheid van het RHD gen bepaalt of het D antigeen al dan niet tot expressie komt op het celoppervlak van de RBC. Het antigeen bestaat uit 416 aminozuren, meer dan 30 verschillende epitopen en 6 extracellulaire loops. Op chromosoom 1 is zowel het RHD gen als het RHCE gen gelegen. In de Kaukasische populatie is 15% RhD negatief [1].

Mutaties

Mutaties in het RHD gen leiden tot verschillende D varianten, waaronder zwakke en partiële D. Zwakke D type 1, 2 en 3 worden als RhD positief beschouwd, andere D varianten als RhD negatief.



Gevolgen

Het herkennen van D varianten is van groot belang bij vruchtbare vrouwen en bij patiënten die regelmatig een transfusie nodig hebben. Bij vruchtbare vrouwen kunnen anti-D antistoffen leiden tot hemolytische ziekte van de foetus of pasgeborene. Voor patiënten die regelmatig transfusie nodig hebben, is het belangrijk te voorkomen dat anti-D antistoffen gevormd worden, dit kan leiden tot transfusiereacties.

Materialen en methoden

Stalen

Periode van 15/12/2022 – 14/12/2023.

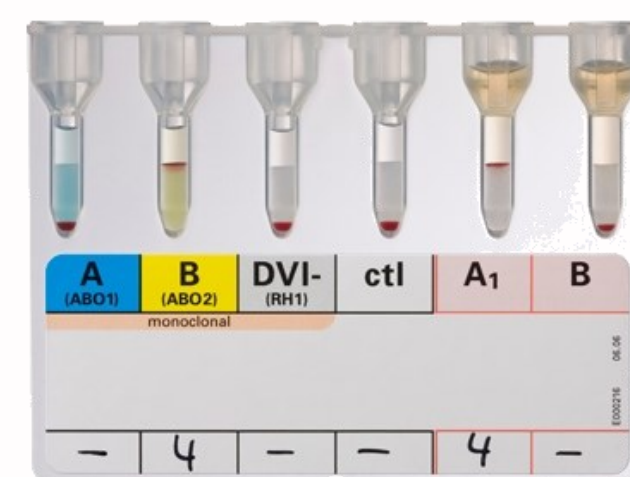
Eenzijds interne stalen van UZ Leuven, anderzijds externe stalen van Vlaamse ziekenhuizen of private laboratoria, die doorgestuurd worden omwille van zwakke of discrepante RhD serologie.

Ortho Vision

De serologische ABO/D bepaling wordt in routine uitgevoerd op de automaat Ortho Vision met de kolomagglutinatie techniek. Bij niet interpreteerbare resultaten wordt een manuele ABO/D bepaling uitgevoerd met Bio-Rad Reagentia.

Bio-Rad

- Voorproef: 5% celsuspensie van de patiënt
- Tegenproef: A1 en B testcellen + plasma patiënt



Moleculaire typering

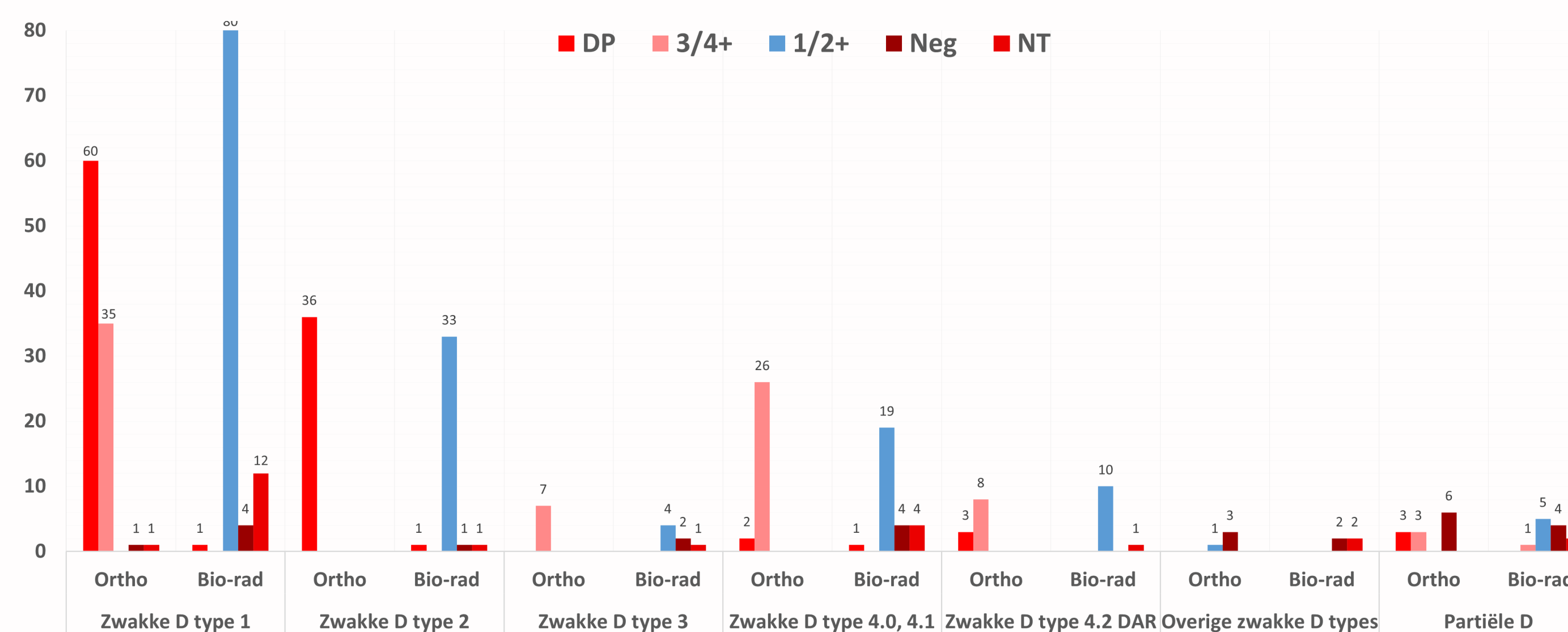
Hierbij wordt een EDTA staal gebruikt waarbij het DNA geëxtraheerd wordt uit de WBC. Met behulp van SNP (single nucleotide polymorphism) techniek wordt een mogelijke D variant opgespoord. Er worden drie kits gebruikt, een zwakke D kit, een partiële D kit en een RhD type kit (BAG Diagnostics). RHD genotypering wordt uitgevoerd voor alle externe stalen, voor interne stalen bij een zwakke RhD serologie <math><3+</math>.

Resultaten en discussie



Van de 207 stalen waren er 12 stalen afkomstig van UZ Leuven en 195 externe stalen.

- A. Op basis van de moleculaire RHD genotypering werden deze resultaten bekomen: 3% RhD negatief, 3% RhD positief en 94% RhD varianten. Bij de 6% die geen RhD variant is zijn alle RhD epitopen gedetecteerd door de kit allemaal aan- of afwezig.
- B. Van de RhD varianten is 94% een zwakke D en 6% een partiële D.
- C. 77% van de zwakke D zijn RhD type 1, 2 of 3. Dit komt overeen met het percentage 80% weergegeven in de literatuur. 23% van de zwakke D stalen zijn een type 4.0 of hoger.



In routine worden voor zwakke D type 4.0, 4.1 en zwakke D type 4.2 DAR een positieve RhD serologie gevonden (3+/4+ op Ortho Vision). Deze varianten kunnen dus gemist worden in ons huidig algoritme, wat een probleem kan opleveren aangezien het transfusieadvies negatief is. Een zwakke D type 4.2 DAR zou anti-D antistoffen kunnen aanmaken bij contact met RhD positief bloed. Het klinisch belang van type 4.0, 4.1 is minder duidelijk.

Beide varianten zijn geassocieerd met het haplotype cDe, hetgeen vaak voorkomt in de Afro-Amerikaanse populatie. Sikkelmanemie komt in deze bevolkingsgroep frequent voor. Aangezien deze patiënten regelmatig een bloedtransfusie nodig hebben, is het ook hierbij belangrijk om de D varianten op te sporen.

Een van de opties voor betere opsporing is de bloedgroep van RhD positieve patiënten met ondergroepen ccee op een baby-kaartje van Bio-Rad te herhalen. Hierin zijn 2 antisera aanwezig om RhD op te sporen. Bij de 6 stalen die hierop getest werden werd nog altijd een 3+ reactie gevonden. Toch zien we in de resultaat analyse dat met Bio-Rad zwakkere reacties bekomen worden. Onderzoek van meer stalen is nodig.

Andere mogelijkheden zijn het gebruik van manuele buismethode of een microtiterplaat methode. Hierin zou een RhD variant zwakker reageren. Nadelen van de buismethode zijn echter een subjectieve interpretatie en het is arbeidsintensief. De microtiterplaat is bedoeld voor batch analyses, hier gaat het eerder over individuele analyses.

Conclusie

Het is belangrijk om de zwakke RhD serologie verder uit te werken enerzijds zodat onnodig toedienen van RhD negatief bloed of rhesusprofylaxe vermeden kan worden, anderzijds zodat er geen anti-D allo-immunisatie kan optreden bij patiënten met een D variant. Verder onderzoek is vereist voor optimalisatie van het test algoritme.

Dankwoord

Graag wil ik alle laboranten en de klinisch biologen bedanken voor alle hulp en begeleiding, in het bijzonder Betty Thielens, Linda Joosten en Els Verhoeven.

Referentie

- Rode kruis. De bloedgroepen [internet]. [Geraadpleegd op 19 december 2023]. Beschikbaar op <https://www.donneurdesang.be/nl/meer-weten-over-bloed/de-bloedgroepen>
- Keller, M. (2022). RH genetic variation and the impact for typing and personalized transfusion strategies: a narrative review. *Annals Of Blood*, 8. Doi: 10.21037 <https://aob.amegroups.org/article/view/7265/html>
- Sandler, S. G., Flegel, W. A., Westhoff, C. M., Denomme, G. A., Delaney, M., Keller, M., Johnson, S. T., Katz, L. M., Queenan, J. T., Vassallo, R. R., & Simon, C. D. (2014). It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion*, 55(3), 680-689. <https://doi.org/10.1111/trf.12941>
- Sandler, S. G., Chen, L. N., & Flegel, W. A. (2017). Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *British journal of haematology*, 179(1), 10-19. <https://doi.org/10.1111/bjh.14757>
- Baruah, D., Devi, G., Musfique, J., Bharali, A., & Dutta, U. C. (2022). Distribution and frequency of principal Rh blood group antigens (D, C, c, E, and e) and their phenotypes in the blood donors attending blood bank in a tertiary care hospital in Barpeta district of Assam. *Asian journal of transfusion science*, 16(2), 167-174. <https://doi.org/10.4103/ajts.ajts.64.20>
- Westhoff, C.M., & Siegel, D.L. (2016). CHAPTER 14 Rh and LW blood group antigens. [Illustratie 1] Beschikbaar op <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:10454366>
- Bio-Rad. DiaClon ABO/D + Reverse Grouping. [Internet] [Illustratie 2] Beschikbaar op <https://www.bio-rad.com/en-be/product/diaclon-abo-d-reverse-grouping?ID=QMUNDG70KWE7>