



AF BIOANALYTIKER RITA HANSEN,
KLINISK IMMUNOLOGISK AFDELING
ÅRHUS UNIVERSITETSHOSPITAL, SKEJBY

Rh blodtypesystemet

En status over de sidste 15 års udvikling

Rh blodtypesystemet er det blodtypesystem efter ABO, som er bedst beskrevet. Det skyldes primært dets store kliniske betydning i forbindelse med hæmolytiske transfusionskomplikationer (HTK) og hæmolytisk sygdom hos fostre og nyfødte (HDFN).

Rh blodtypesystemet er et af de mest polymorfe blodtypesystemer. Til dato er der beskrevet 49 forskellige uafhængige antigener.¹

Gennem de sidste 15 år er der sket en stor udvikling i vores viden om Rh blodtypesystemet. Dette skyldes isoleringen af cDNA og sekventering af generne, der koder for Rh proteinerne. Teknologien har givet mulighed for at beskrive det molekylærgenetiske grundlag associeret med nogle af de forskellige antigener og deres variationer.^{2,3}

Denne artikel vil beskrive hvilke nomenklaturer, der anvendes inden for Rh blodtypesystemet, hvilken viden der pt. er omkring molekylærbiologien, samt hvordan dette påvirker udtrykket af antigenerne og deres varianter. Derudover vil antistoffernes kliniske relevans kort blive beskrevet.

Historisk perspektiv

Rh blodtypesystemet blev først beskrevet i 1939, hvor Levine og Stetson beskrev et patientforløb hos en kvinde, der efter fødsel af et dødfødt barn med HDFN fik blodtransfusion med blod fra hendes ABO forligelige mand. Denne transfusion medførte en alvorlig HTK. Efterfølgende viste det sig, at kvindens serum agglutinerede mandens erythrocytter samt 80 % af testede erythrocytter fra ABO forligelige kaukasiske blod-

donorer (reviewed af Scott, samt Avent og Reid).^{2,3}

I 1940 fandt Landsteiner og Wiener et antistof i kaniner immuniseret med erythrocytter fra Rhesus aber. Antistofet agglutinerede abernes erythrocytter og 85 % af testede humane erythrocytter. De kaldte antistoffet anti-Rh.^{2,3}

Oprindeligt troede man, at det humane antistof og kanin antistoffet var identiske og identificerede en normal faktor, Rh, på overfladen af Rhesus- abers og humane erythrocytter. Det viste sig senere ikke at være tilfældet.

Allerede i 1942 demonstrerede Fisk og Foord en forskel mellem det humane anti-Rh og kanin anti-Rh. I 1963 viste Levine et. al., at det humane anti-Rh og kanin anti-Rh ikke reagerede med det samme antigen.²

På det tidspunkt var Rh alment anvendt som betegnelse for det humane blodtypesystem. Man valgte derfor at omdøbe antistoffet isoleret fra kaninerne til anti-LW i respekt for Landsteiner og Wiener.^{2,3}

Nomenklaturen

Der er udviklet tre forskellige nomenklaturer til beskrivelse af Rh blodtypesystemets antigener. To af modellerne er baseret på forskellige genetiske teorier.

Ficher og Race postulerede et system bestående af 3 sæt allele gener, der sidder tæt koblede. Generne koder for seks forskellige antigener; D, d, C, c, E og e.⁴

Wiener derimod postulerede et system bestående af et enkelt gen, der koder for en bestemt haplotype.⁴

Rosenfield, som den tredje, mente

ikke det var anvendeligt med en nomenklatur baseret på genetiske teorier. Samtidig var det, med de beskrevne nomenklaturer, ikke muligt at navngive alle antigenerne pga. Rh blodtypesystemets store polymorfi. Derfor udviklede Rosenfield et numerisk system, som let modificeret er adopteret af The International Society of Blood Transfusion (ISBT).

Med dette system beskrives alle antigener i Rh blodtypesystemet med et nummer, D antigenet er RH1 osv. Når haplotyperne skrives, vil "-" foran den numeriske værdi beskrive, at antigenet ikke findes i haplotypen.⁴

På trods af at hverken Ficher og Race eller Wieners genetiske teorier er gældende, anvendes nomenklaturerne stadigvæk. Nomenklaturen er vist i tabel 1 (side 14).

Molekylærbiologi

Rh blodtypesystemet består af to gener, *RHD* og *RHCE*, der findes på kromosom nr. 1's korte arm.^{4,5} *RHD* og *RHCE* menes at være opstået ved en genduplikation for 8 millioner år siden.⁵

Generne er tæt koblede og udviser stor homologi (93,8 % identiske).^{2,4} De er sammensat af 10 exons og 9 introns, bestående af i alt henholdsvis 57 295 basepar (bp) (*RHD*) og 57 831 bp (*RHCE*); generne er adskilt af *SMP1* (*small membrane protein 1*).⁴ De er placeret i en hale til hale konformation (5'*RHD*3' - 3'*RHCE*5') (se figur 1 side 14) med *RHD* tættest på centromer af kromosomet.^{1,4,5}

De 10 exons koder for et protein bestående af 417 aminosyrer, dvs. at der kun bruges 1251 bp til at danne Rh

● ● ARTIKEL SOM EKSAMENSPROJEKT

Bioanalytiker Rita Hansens artikel om Rh blodtypesystemet er den første af en række artikler fra studerende på valgmodulet Klinisk Immunologi ved den Sundhedsfaglige Diplomuuddannelse ved CVU Øresund. De studerende har som afslutning på modulet skullet udforme deres eksamensopgave som en statusartikel til dbio's fagblad, og de har fulgt fagbladets retningslinjer for faglige artikler. Opgaven er en diskussion af en problemstilling, der har afsæt i en konkret bioanalytikerfaglig praksis.

De studerende har haft ca. 2 uger til at skrive artiklen, og de har modtaget 1 times vejledning før aflevering. Efter aflevering har de ikke fået yderligere vejledning.

Modulet Klinisk Immunologi blev afviklet i efteråret 2006.

proteinerne.⁴ Proteinerne differentierer kun med 32–35 forskellige aminosyrer.^{2,6}

De dannede proteiner har 12 hydrofobiske transmembrane domæner og seks ekstracellulære loops. Proteinernes N-terminale og C-terminale del findes i erythrocyttens cytoplasma (se figur 2 side 15).^{2,3} På trods af den store homologi udtrykker de forskellige RhCE-proteiner ingen RhD-epitoper og omvendt.³

RHD er omgivet af to regioner, der er 98,6 % identiske. Regionerne kaldes *Rhesus bokse*. Der menes, at RhD negativ fænotypen i kauasiere er opstået ved en deletion af *RHD* genet under meiosen, hvilket har skabt en hybrid *Rhesus-boks* (se figur 1 side 14).^{1,4,5}

I andre befolkningsgrupper er der andre genetiske årsager til RhD negativ fænotypen. Således skyldes den RhD negative fænotype i afrikanere og asiater ofte et inaktivt eller stumt *RHD* gen.⁶

Rh proteinerne udtrykkes kun på erythrocytterne som antigener, hvis det Rh associerede glycoprotein (RhAG) også er til stede. RhAG proteinet kodes af et enkelt gen (*RHAG*) på kromosom nr. 6, som ikke udviser polymorfi. RhAG er ikke et blodtypeantigen.⁶

RhAG er nødvendig, for at RhD og RhCE proteinerne får deres rette konformation i cellemembranen.^{1,6}

RhAG proteinet udviser stor homologi med RhD og RhCE proteinerne (40 % identiske aminosyrer).^{3,6}

Det menes, at for hvert RhD eller RhCE protein, som findes på erythrocytten, er der tilkoblet to RhAG proteiner.³

Antigenerne

Generne koder for Rh proteinerne RhD og RhCE; hvor det første udtrykker RhD antigenet, og det andet RhCE antigenet i forskellige kombinationer (CE, Ce, cE, ce). Der findes ingen antigen allel, der modsvarer RhD antigenet.^{2,6} Man anvender dog ofte betegnelsen "d" til at beskrive den situation, hvor der ikke er noget RhD antigen.

De mest almindelige udgaver af *RHD* og *RHCE* koder for otte forskellige haplotyper: DCE, DCE, Dce, Dce, dCE, dCE og dCE.^{3,4} (se tabel 1 side 14)

Rh antigenerne er ikke påvist i sekreter eller på andre celler end erythrocytterne.¹

Rh antigenerne er påvist på fostererythrocytter seks uger efter undfangelsen og er fuldt udviklet ved fødslen.³

RhD antigenet og varianter af RhD:

RhD antigenet udviser stor polymorfi og er det mest immunogene af Rh antigenerne.

Derfor er RhD antigenet det klinisk mest vigtige af Rh antigenerne. 85 % af RhD negative recipienter, der modtager store volumener af RhD positivt blod (200 ml eller mere), vil efter to til fem måneder danne et alloanti-D (anti-D).¹ Indtil indførelsen af RhD immunprofylakse, var anti-D den hyppigste årsag til HDFN.⁴ Det er blandt andet derfor, man tager hensyn til RhD fænotypen ved transfusion af blod.

RhD proteinet differentierer fra RhCE proteinet med 32–35 forskellige aminosyrer. Ud af disse er det kun ni af de RhD specifikke aminosyrer, der findes i de ekstracellulære loops på overfladen af erythrocytten. (se figur 2, side 15).^{2,6}

Selve RhD antigenet er en samling af konformationsafhængige epitoper langs hele RhD proteinet.³ Der er til dato beskrevet 30 epitoper i RhD antigenet.^{2,4}

Antallet af RhD antigener på erythrocytten varierer kvantitativt afhængigt af fænotypen. Det største antal af RhD antigener findes på erythrocytter med D – /D – – fænotypen (110 000–202 000 antigener pr. erythrocyt), altså der, hvor der ikke er udtrykt nogen RhCcEe antigener. Det mindste antal RhD antigener ses på DEL fænotypen (5200 antigener pr. erythrocyt) en svag RhD variant, der hovedsageligt findes i den asiatiske befolkning.^{1,4}

Også blandt de almindelige fænotyper ses en kvantitativ variation af RhD antigenerne. Det største antal ses ved

DcE/DcE fænotypen, som har mellem 23 000–31 000 RhD antigener pr. erythrocyt. Det mindste antal ses ved DCE/dce fænotypen, som har mellem 9990–14 600 RhD antigener pr. erythrocyt.^{1,4}

Varianter af RhD:

Historisk set er RhD varianterne blevet opdelt i tre grupper; svag RhD, partiel RhD og RhC i trans til RhD.

Svag RhD dækker primært over kvantitative variationer af RhD antigenet, og viser sig serologisk som et svagere udtrykt RhD antigen. Samtlige epitoper er udtrykt.

Partiel RhD dækker over en kvalitativ variation af RhD antigenet, hvor nogle af RhD antigenets epitoper ikke kommer til udtryk.

RhC i trans til RhD beskriver en svag RhD, hvor haplotypen, der koder for RhD, sidder i trans til haplotypen der koder for RhC (*dCe* eller sjældent *dCE*). Denne svage RhD er ikke arvelig på regulær vis.⁴

Alle tre grupperinger kan immunisere en RhD negativ person til dannelse af anti-D.

Oprindeligt har man differentieret mellem svag RhD (herunder RhC i trans til RhD) og partiel RhD på følgende måde: Svag RhD vil ikke danne et anti-D, hvis de udsættes for RhD antigenet ved transfusion eller graviditet. Partiel RhD kan danne et anti-D rettet mod de epitoper af RhD antigenet, der ikke er udtrykt, hvis de udsættes for RhD-antigenet ved transfusion eller graviditet.

Denne kategorisering har dog vist sig ikke at være absolut, da der ved nogle svage RhD-typer er påvist et anti-D.⁶

Svag RhD:

Svag RhD udtrykker alle RhD epitoper, bare svagere end normale RhD.^{5,6} Cirka 0,2–1 % af den kaukasiske befolkning har reduceret mængde af RhD antigener.^{6,7} Der er indtil videre beskrevet 57 forskellige svag RhD typer.⁸

TABEL 1:

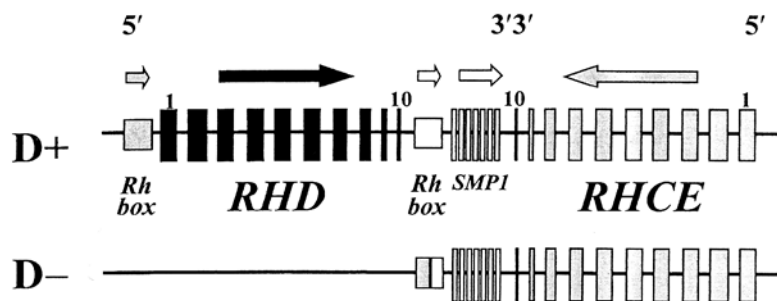
Haplotyperne beskrives med de forskellige nomenklaturer og frekvensen i den engelske befolkning. Fra Daniels, Geoff.⁴

HAPLOTYPER

Weiner	Ficher & Race	Numerisk	Frekvens
R ₀	Dce	RH 1,-2,-3,4,5	2,57 %
R ₁	DCe	RH 1,2,-3,-4,5	42,05 %
R ₂	DcE	RH 1,-2,3,4,-5	14,11 %
R _z	DCE	RH 1,2,3,-4,-5	0,24 %
r	dce	RH -1,-2,-3,4,5	38,86 %
r'	dCe	RH -1,2,-3,-4,5	0,98 %
r''	dcE	RH -1,-2,3,4,-5	1,19 %
r ^y	dCE	RH -1,2,3,-4,-5	0 %

FIGUR 1:

Genomisk organisation af *RH* generne i en typisk RhD positiv (øverst) og RhD negativ (nederst) haplotype. Ved den RhD negative haplotype ses en deletion af hver af Rhesus boksene samt *RHD*, der skaber den hybride Rhesus boks. Figuren viser også hvorledes *RHD* og *RHCE* ligger i en hale til hale konformation adskilt af *SMP1*.⁴



Serologisk påvises de svage RhD ved den indirekte antiglobulin test.^{2,4}

Den genomiske baggrund for svage RhD skyldes primært punktmutationer, som bevirker en udskiftning af en aminosyre, i den transmembrane eller intracellulære region af RhD proteinet. Disse mutationer påvirker effektiviteten af indsættelsen og dermed kvantiteten af RhD proteinet i cellemembranen.^{5,7}

Partiel RhD:

Partiel RhD mangler nogle RhD epitoper. De resterende epitoper udtrykkes normalt.⁴ Der er indtil videre beskrevet 76 forskellige partielle RhD typer.⁸ Den hyppigste udgave i den kaukasiske befolkning er den partielle type RhDVI.^{5,6}

Serologisk påvises de partielle RhD ved at anvende flere forskellige monoklonale antistoffer, der reagerer med et specifikt mønster afhængigt af, hvilke epitoper den partielle RhD udtrykker.⁶ Den genomiske baggrund for partiel RhD skyldes to forskellige årsager. Den kan, som for svag RhD, være opstået pga. punktmutationer, men her er der udskiftet en aminosyre i de ekstracellulære loops af RhD proteinet.^{5,6}

De fleste partielle RhD skyldes dog, at der arves et hybridt *RHD-RHCE*-gen, hvor dele af *RHD* er erstattet af korresponderende dele af *RHCE*.^{5,6} Denne konformation menes at være opstået ved udveksling af kodende områder

under meiosen, når *RHD* og *RHCE* ligger i cis.^{4,5,6}

RhCE antigenet:

RHCE koder for både RhC/Rhc og RhE/Rhe på et enkelt protein.⁶ Rhc antigenet er efter RhD det mest immunogene antigen i Rh blodtypesystemet.^{1,4} RhCE antigenet udviser ikke samme store polymorfi som RhD antigenet, der ses dog varianter. For RhC ses der f.eks. RhC^X og RhC^W antigenerne, der skyldes punktmutationer i *RHCE*.⁵ Derudover er der også beskrevet varianter (partielle og svage) RhE, Rhc og Rhe typer.^{3,4,5,6}

RhC antigenet adskilles kun af fire aminosyrer fra Rhc antigenet. Deraf findes kun den ene uden for cellemembranen i det andet ekstracellulære loop. Det er kun en enkelt aminosyre, der adskiller RhE antigenet fra Rhe antigenet. Denne findes i fjerde ekstracellulære loop.^{3,4,5,6}

Som for RhD er der også inden for RhCE varierende antal antigener på erythrocytten afhængigt af fænotypen. Det største antal af antigener på erythrocytten ses generelt, når antigenet udtrykkes homozygot.⁴

Antistofferne

Rh antistofferne har stor klinisk betydning, da de kan forårsage HDFN samt akutte og forsinkede HTK.^{1,4,9}

Rh antistoffer er sædvanligvis pro-

duceret efter et cellulært immunrespons efter enten blodtransfusion eller graviditet, men der er også beskrevet naturligt forekommende Rh antistoffer.^{1,4} De er sædvanligvis af IgG karakter (IgG1 og IgG3) og reagerer optimalt ved 37 °C. De aktiverer som regel ikke komplementsystemet.^{4,9}

Rh antistoffer er til stede i cirkulationen mange år efter dannelsen. Derfor er det vigtigt at transfundere antigen negative erythrocytter, selvom antistoffet ikke længere kan påvises serologisk.^{1,4,9}

Perspektivering

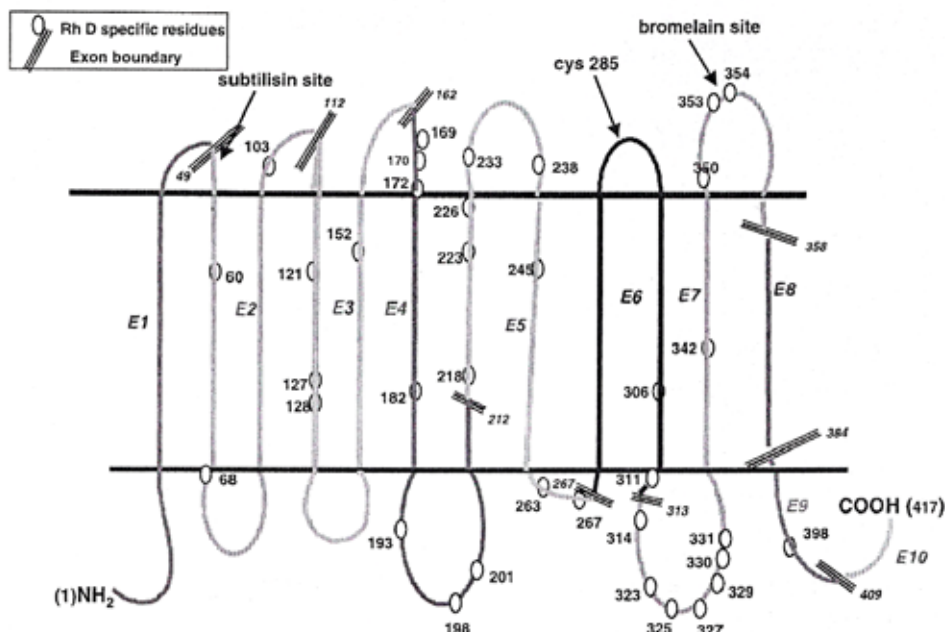
Rh blodtypesystemets store polymorfi gør det til et af de mere udfordrende blodtypesystemer at arbejde med inden for det kliniske immunologiske område.

Det genetiske grundlag for Rh blodtypesystemet er grundigt udforsket gennem de sidste 15 år. Dette har givet mulighed for at beskrive Rh blodtypesystemets store polymorfi på gen niveau samt serologisk niveau. Der er f.eks. til dato beskrevet 133 RhD varianter, og der beskrives jævnligt nye varianter.

Polymorfien kan være årsag til forskellige immunologiske udfordringer, og dét, at det genetiske grundlag for Rh blodtypesystemet er blevet beskrevet, har givet os en større indsigt i kompleksiteten og dermed nogle nye mulighe-

FIGUR 2:

En illustration af Rh proteinet, der er transmembrant og har seks ekstracellulære loops, der er de antigen-determinanter. Figuren viser E1 til E10, som er de 10 kodende exons fra RHD, samt positionerne for de aminosyrer, som er specifikke for RhD proteinet.²



der og redskaber til at løse problemerne med.

Et af de redskaber, der er kommet til, er prænatal diagnostik af RhD typen på fostre, hvor moderen har et anti-D. Her bestemmes fosterets RhD type på føtalt DNA udvundet fra maternelt plasma.

Et andet redskab er zygoti bestemmelse på vir, hvor moderen kendes med et anti-D. Her bestemmes, om vir er homozygot eller hemizygot mhp. RHD. Dette bruges til at vurdere, om der skal udføres prænatal diagnostik på føtalt DNA. Findes vir homozygot, vides det med sikkerhed, at fosteret er hemizygot. Der er så ikke behov for at udføre RhD bestemmelse på føtalt DNA.

Jeg tror, man i fremtiden vil bruge prænatal diagnostik til administration af RhD immunprofylakse. Dette skyldes, at RhD antigenet, på trods af administrationen af RhD immunprofylakse, stadig er årsag til omkring 50 % af maternelle RhD immuniseringer.³

Ved at udføre prænatal diagnostik på fostre af RhD negative kvinder kan der sættes ind med RhD immunprofylakse under graviditeten til de kvinder, der bærer et RhD positivt foster. Med sådan et tiltag tror jeg, at man kan nedsætte risikoen for maternel RhD immunisering.

Jeg tror, at den viden, der er opnået omkring svage og partielle RhD typer,

på sigt vil ændre den hidtidige praksis af RhD typebestemmelsen af bloddonorer i Danmark. Således at man vil udføre genomisk RhD bestemmelse på de donorer, der serologisk bestemmes til at være RhD negative. Dette skal gøres for at undgå en utilsigtet immunisering af RhD negative patienter. Diskussionen om denne mulighed er allerede startet, og flere steder er man begyndt på projekter med genomisk RhD bestemmelse på bloddonorer.

ORDFORKLARING

Cis: På samme kromosom.

Hemizygot: Når der findes en allel på det ene gen, og ingen allel på det andet gen. I denne situation f.eks. DCE/dce.

Immunogene: Betegnelse for antigenets evne til at fremprovokere et immunsvare med dertilhørende antistofdannelse.

Punktmutationer: En udskiftning af et enkelt basepar på genet. Dette kan betyde, at der indsættes en anden aminosyre i det endelige protein.

Trans: På det homologe kromosom.

Zygoti bestemmelse: Bestemmelse af, om man er homozygot eller hemizygot på geniveau.

REFERENCELISTE:

1. Klein, Harvey G., Anstee, David J.; Mol-lison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 2005, 11. Edition, Oxford, Blackwell Publishing Ltd.
2. Scott, M. L.; The complexities of the Rh system. Vox Sanguinis 2004; 87: 58-62.
3. Avent, Neil D., Reid, Marion E.; The Rh blood group system: a review. Blood 2000; 95: 375-387.
4. Daniels, Geoff; Human Blood Groups. 2002, 2. Edition, Oxford, Blackwell Science.
5. Avent, Neil D. et. al.; Molecular biology of Rh proteins and relevance to molecular medicine. Expert reviews in molecular medicine 2006; 8: 1-20.
6. Westhoff, Connie M.; The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. Transfusion 2004; 44: 1663-1673.
7. Wagner, Franz F. et. al.; Molecular Basis of weak D phenotypes. Blood 1999; 93: 385-393.
8. <http://www.uni-ulm.de/%7Ef/wagner/RH/RB/>
9. Harmening, Denise M.; Modern Blood Banking & Transfusion practices. 2005, 5. Edition, Philadelphia, F. A. Davis Company.