



Viti i VI-të i Botimit, Nr.2,  
Dhjetor 2015

# IMPLEMENTIMI I NJË TEKNIKE MOLEKULARE PËR GJENOTIPIZIMIN E GRUPIT TË GJAKUT RHEZUS

Merita Xhetani\*, Irena Seferi\*\*

\* Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, Departamenti i Biologjisë.

\*\* Qendra Kombëtare e Transfuzionit të Gjakut, Tiranë.

Adresë kontakti: [merita.xhetani@fshn.edu.al](mailto:merita.xhetani@fshn.edu.al)

## Përmbledhje

Vlerësimi i saktë i statusit të Rh, në veçanti i antigenit të tij D, është me shumë rëndësi në mjekësinë e transfuzionit dhe në obstetrikë. Grupi i gjakut Rhesus (Rh), është i lidhur me shprehjen e dy gjeneve me homologji të lartë RHD dhe RHCE, të pozicionuar në kromozomin njerëzor 1, të cilët kodojnë për dy polipeptide respektivisht RhD dhe RhCE.

Antigeni D konsiderohet me imunogjenicitet të lartë dhe mund të indukojë prodhimin e alloantitropave, që çojnë në reaksione hemolitike postransfuzionale në pacientët e imunizuar dhe në shfaqjen e sëmundjes hemolitike të fetusit dhe të porsalindurit (HDFN), tek gratë shtatzëna Rhesus D-negative.

**Objektivat:** Ky studim ka për qëllim të vlerësojë rëndësinë e përfshirjes të një strategjie të përgjithshme për tipizimin molekular të gjenit RHD, e cila do të zëvendësojë teknikën rutinë serologjike të tipizimit të antigeneve Rhesus.

**Metodat:** Ne bazohemi në një studim të mëparshëm nga ana jonë (6), i cili siguroi të dhëna të rëndësishme në lidhje me bazën molekulare të grupit të gjakut Rh në popullatën shqiptare. Duke u nisur nga këto të dhëna, si edhe protokollet e stabilizuara të përshtatura për popullatën tonë, mendojmë se shërbimi i transfuzionit është gati për implementimin e një teknike të re në tipizimin e RHD, që është ajo molekulare e kombinuar me teknikën serologjike.

**Rezultatet:** Kjo metodë do të zëvendësojë procedurat operative standarde të tipizimit të grupit të gjakut Rhesus në dhuruesit e gjakut, pacientët e politransfuzuar dhe gratë shtatzëna D-negative. Në dhuruesit e gjakut, analiza molekulare do të skrinonjë të gjithë dhurimet për tre variantet të D të dobët (Du) më të përhapura në popullatën tonë. Identifikimi i tyre do të kontribuojë në menaxhimin e këtyre njësive si D-pozitive, duke racionalizuar stokun e njësive D-negative, aq të nevojshme në urgjencat mjekësore.

**Konkluzionet:** Stabilizimi i udhëzimeve të përshtatshme metodologjike, do të jetë i rëndësishëm si për signifikancën mjekësore, ashtu edhe për koston ekonomike, që lidhen me imunizimin nga Rhesusi.

**Fjalë çelës:** Grupi i gjakut Rhesus, gjenotip, fenotip, Rh.

## ***IMPLEMENTATION OF A NEW TECHNICAL MOLECULAR APPROACH FOR RHESUS GENOTYPING***

### **Abstract**

**Background:** Appropriate assignment of the Rh status, RhD most importantly, has a critical importance in transfusion and obstetrical medicine. The Rh blood group is associated to the expression of the highly homologous *RHD* and *RHCE* genes located on human chromosome 1, which respectively encode the RhD and the RhCE polypeptides. Owing to its high immunogenicity, D antigen can induce the production of alloantibody resulting in a hemolytic transfusion reaction in alloimmunized patients or a hemolytic disease of the fetus and the newborn in alloimmunized, D-negative pregnant women.

**Objectives:** This work aims to assess the value of a generalized molecular RHD typing strategy which could replace routine serological screening of Rhesus antigens.

**Methods:** Based in our recent studies which provided valuable data on molecular basis of Rhesus blood group (6), we are ready to implement a new technical molecular approach, which would replace the standard operating procedures in Rhesus typing of blood donations.

**Results and conclusions:** The molecular analysis that screen all donations for the three most common weak D variants in most variant *D* carriers may contribute to manage them as D-positive and thus rationalize the use of D-negative stock units.

**Key words:** *Rhesus blood group, genotype, phenotype, Rh.*

### **Një argumentim i shkurtër në mbështetje të projektit**

Nevoja për gjenotipizimin molekular në përcaktimin e grupeve të gjakut bazohet në një sërë argumentesh. Duke filluar nga viti 2000, përcaktimi i grupit të gjakut të pacientëve pas një transfuzioni, është përfshirë në listën e aplikimeve të metodave të biologjisë molekulare në imunohematologji, kjo për faktin se tashmë është konfirmuar risku i imunizimit me anti-D. Ky rrezik imunizimi varet nga ndryshimet cilësore që i ndodhin gjenit përgjegjës të antigenit D, të cilat reflektohen me ndryshime të densitetit të tij të detektueshme me antitropa poliklonalë anti-D. Një mesatare prej 1-2% e pacientëve të hospitalizuar në Evropë, në nevojë për transfuzion gjaku, mbartin një alloantitrop të parregullt. Imunizimi shpesh shkaktohet nga transfuzione të njëpasnjëshme ose nga shtatzënitë në rastin e grave. Shkalla e imunizimit dhe numri i antitropave specifike është në korrelacion me transfuzionet e mëparshme. Kështu që tek pacientët, të cilët janë të varur nga transfuzioni, shkalla e alloimunizimit është veçanërisht e lartë. Në pacientët e rritur, me anemi drepanocitare, shkalla e alloimunizimit është raportuar rreth 46% dhe në pacientët me talasemi majore vërehet një prevalencë rreth 30%. Për këta pacientë në veçanti dhe për të politransfuzuarit në përgjithësi, studiuesit rekomandojnë një parandalim të alloimunizimit të mëtejshëm, duke rritur saktësinë e tipizimit. Për të gjetur gjak të pajtueshëm për këtë kategori pacientësh është një sfidë më vete për qendrat e gjakut. Afërsisht 1 deri 3 pacientë me alloantitropa nuk mund të transfuzohen me eritocite të pajtueshme në kohën e duhur. Në mënyrë që të mundësojnë njësi gjaku të pajtueshme shpesh qendrat e gjakut përdorin një tipizim serologjik të dhuruesve për praninë e antigjeneve më signifikantë të ABO, RhD dhe Kell. Praktikisht ky tipizim “i zgjeruar” është i kufizuar nga disponibiliteti dhe kostoja e reagentëve serologjike të certifikuar –CE. Për të zgjidhur këtë pengesë në serologji, kanë përparuar teknika të reja të tipizimit dhe identifikimit të antigjeneve tek dhuruesit dhe marrësit e politransfuzuar. Çelësi i suksesit për këtë alternative është screening i një numri të madh njëherësh me kostoeficencë, si edhe pavarësia nga disponibiliteti i reagentëve serologjikë. Në parim, të gjithë antigenët që korrespondojnë me polimorfizëm të ADN-së janë të arritshëm nëpërmjet gjenotipizimit. Në kontrast me serologjinë nuk ka kufizime reagentësh në analizën

e ADN-së. Janë përpiluar një sërë programesh që mbështesin parandalimin e alloimunizimit nga rruazat e kuqe. Implementimi i metodave që sigurojnë pajtueshmërinë e antigeneve për transfuzionin e rruazave të kuqe të gjakut tashmë mbështet grupet e pacientëve të imunizuar dhe/ose ata që kërkojnë transfuzione të vazhdueshme (të politransfuzuar) (1). Këto bazohen kryesisht në teknikat klasike të serologjisë, të cilat identifikojnë alloantitruapat gjithashtu, megjithatë fenotipizimi i saktë i pacientëve të politransfuzuar shpesh ndërlikohet nga prania e rruazave të kuqe të dhuruesit në qarkullimin e gjakut të pacientit të transfuzuar, si edhe nga vlera pozitive e testit direkt me antiglobulinë, ose nga mungesa e aglutinimit të antitruapat të pranishëm. Metodatat e gjenotipizimit të grupeve të gjakut janë përfshirë në këto programe, si një alternativë e domosdoshme për problemet që hasen nga serologjia dhe po përdoren edhe në vlerësimin e rrezikut nga sëmundja hemolitike e fetusit dhe të porsalindurit HDFN (7; 8). Për të siguruar një transfuzion të sigurtë të rruazave të kuqe, analiza e ADN për tipizimin e një numri të kufizuar grupesh gjaku, luan një rol të rëndësishëm në mjekësinë e transfuzionit, veçanërisht për sigurimin e gjakut të pajtueshëm pacientëve që konsiderohen kronikë dhe transfuzohen rregullisht. Ky punim ka për qëllim të vlerësojë rëndësinë e një strategjie të gjeneralizuar për tipizimin molekular të RHD, e cila mund të zëvendësojë skrinimin me metodat serologjike të antigeneve rrezus dhe të theksojë kontributin e gjenotipizimit nëpërmjet ADN-së të antigeneve të rruazave të kuqe të gjakut, si një mjet për menaxhimin e pacientëve të politransfuzuar, në mënyrë që të tejkalojë kufizimet e metodave që bazohen në hemaglutinim.

## Kostoja

Është e vështirë të krahasosh koston e testimit për tipizimin serologjik të 20 antigeneve më signifikantë me atë të metodës së gjenotipizimit të 35 antigeneve që është stabilizuar tashmë në laboratorët e biologjisë molekulare në Evropë. Po marrim një shembull të publikuar në Vox Sanguinis 2011, ISBT: Për tipizimin serologjik të 20 antigeneve më signifikantë të RBC (M, N, S, s, P<sub>1</sub>, C<sup>e</sup>, Lu<sup>a</sup>, Lu<sup>b</sup>, K, k, Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Kp<sup>a</sup>, Kp<sup>b</sup>, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, I<sup>a</sup>, Co<sup>b</sup>), nevojiten reagente dhe mjete konsumi 28€. Fenotipizimi manual kërkon një kosto personeli prej 10€ kurse ai i automatizuar prej 5€. përgjithësisht një kosto për dhurues nga 35€ -39€, përfshirë këtu tipizimin me dy metoda të ndryshme të domosdoshme në protokollet rutinë.

Me metodën multiplex PCR, kostoja e tipizimit të një mostre të vetme për 35 antigene RBC është 5€ për reagentë dhe mjete konsumi (tuba, pipeta) përfshirë këtu edhe ekstraktimin e ADN-së, 5 € kosto për personelin dhe 5€ për zhvlerësimin e investimit. Kostoja totale për gjenotipizim llogaritet 15 € për një individ.

Megjithatë ngrihen edhe çështje të cilat venë në udhëkryq implementimin e metodave molekulare, si më poshtë:

- Metodatat serologjike janë të shpejta, ndërkohë që metoda molekulare kërkon shumë më tepër kohë, veçanërisht nëse mostra do të dërgohet në një laborator tjetër. Ky argument është pjesërisht i vërtetë, sepse askush nuk mund të mohojë që pacientët e transfuzuar kronikisht tentojnë të përsërisin transfuzionet, edhe nëse përdoret metoda molekulare më e ngadaltë do të ketë nxjerrë një rezultat deri në episodin e radhës (2).
- Metodatat molekulare janë të kushtueshme dhe rimbursimi i analizës mund të mos mjaftojë. Metodatat e tipizimit molekular kanë koston e tyre, të cilën ne e sqaruam më lart, por kjo kosto është duke u ulur vazhdimisht dhe kohët e fundit kitet disponojnë përcaktimin e disa antigeneve paralelisht, duke e reduktuar koston për antigen.
- Për të shtuar, rezultati i testimit me metoda molekulare është më i sakti, ndërkohë që për pacientët e transfuzuar kronikisht, përcaktimi me metoda serologjike shpesh çon ose në rezultat të gabuar, ose nuk mund të identifikojë praninë e antigenit, dhe gjithsesi, është një humbje kohe dhe shpërdorim reagentësh (2).

**Implikimi i strategjive të tipizimit të Rrezus: metodat molekulare kundrejt serologjisë**

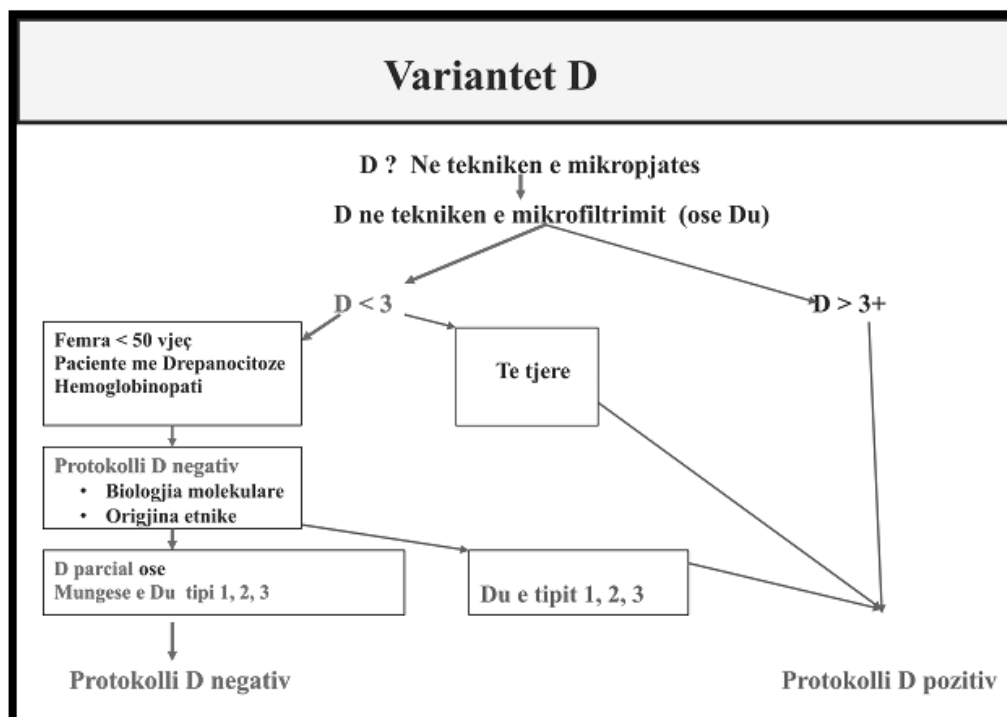
Kohët e fundit gjenotipizimi për RH është marrë në konsideratë për indikacionet e mëposhtme (15):

- a) Në rastin e një fetusit nga lëngu amniotik ose qelizat trofoblastike (vilet korionike);
- b) Në pacientët e politransfuzuar nëse metodat standarde serologjike në përcaktimin e statusit të D, kanë dështuar;
- c) Në rastin e një anemie hemolitike autoimune ose alloimune, nëse metodat standarde serologjike kanë dështuar;
- d) Në identifikimin e pranisë së tipeve D të dobët dhe formave të tjera të aberant RH alleles, nëse serologjia është jo e qartë në vendimin e një terapie me transfuzion ose profilaksinë me anti-D;
- e) Indikimi (a) konsiderohet si metoda kryesore për përcaktimin e Rrezusit tek fetusit;
- f) Indikimi (b) dhe (d), nëse përdoret me metodën e duhur mund të jetë me leverdi (cost-efficient) nëse arrin të stabilizohet në një laborator.

Për dekada me radhë, dallimi i heterozigozitetit të gjenit RHD nga homozigoziteti, nuk ka qenë praktik, për shkak të mungesës së sensitivitetit të metodës serologjike. Një nga zhvillimet më të fundit është identifikimi specifik i këputjes të gjenit RHD në individët Rrezus pozitivë (2; 7; 8). Nëse një grua është e imunizuar me anti-D, shanset e mbajtjes së një fetusit RhD negativ mund të llogariten qartë, duke testuar babain RhD pozitiv për këtë këputje të gjenit RHD. Kohët e fundit janë publikuar disa teknika të përshtatshme (3; 4; 5), versioni i përmirësuar i të cilave mund të bëhet rutinë në të ardhmen. Gjenotipizimi i RHD kryhet në popullata të ndryshme për qëllime të ndryshme. Pajisjet e një laboratorit dhe eksperiencia e fokusuar në një sistem gjenotipizimi specifik, mund të ofrojë plotësimin e nevojave dhe të mundësojë udhëzuesit e duhur në gjenotipizimin e sistemit Rrezus. Kryesisht, kërkohet testimi i një ose më shumë "diagnostik site" në gjenin RHD, në mënyrë që të limitohet shkalla e rezultateve false. Kërkimi i exonit 7 si një prej exoneve RHD specifike dhe mundësisht e kombinuar me exon ose intron 4, rekomandohet si procedura e duhur në identifikimin e RHD. Këshillohet nga (5), që identifikimi i RHD të kryhet nëpërmjet reaksioneve të amplifikimit zinxhir (PCR) të gjenit RHD me primers me sekuencë specifike. Shkalla e pritshmërisë së rezultatit fals pozitiv në më pak se 1:12 000 parashikimesh, me një vlerë reale të rezultatit pozitiv prej 0.999920. Këto vlera krahasohen favorshëm në pothuajse të gjitha llojet e gjenotipizimeve tek njeriu.

**Gjenotipizimi i RHD: Procedura që rekomandohet**

Kohët e fundit ne sugjerojmë një teknikë që bazohet në PCR me primers sekuencë specifike, e cila është stabilizuar për popullatën shqiptare (6). Këtë teknikë e rekomandojmë për gjenotipizimin e RHD të përmbledhur si në skemën e mëposhtme:



**Figura 1.** Skema e plotë e përcaktimit të saktë të statusit të antigenit D.

Dy metoda të ndryshme në mikropjatë dhe mikrofiltrimi (kartat me xhel), ku parimi është hemaglutinimi. Nëse rezultati i aglutinimit është  $\leq 3+$ , duhet të ballafaqohet me metodat e biologjisë molekulare, duke përdorur ADN-në e mostrave, sidomos nëse individi është: një grua nën moshën 50 vjeç; një dhurues për herë të parë; një pacient me Hemoglobinopati; një pacient me Drepanocitozë; një pacient i politransfuzuar. Mostrat të cilat rezultojnë D e dobët do të jenë subjekt i gjenotipizimit molekular fillimisht për të paktën 3 variantet më të përhapura në popullatën tonë; D varianti tipi 1, D varianti tipi 2 dhe D varianti tipi 3. ADN gjenomike do të ekstrahet nga 2-mL gjak me kitin QIAmp DNA Blood Mini, sipas udhëzimeve të prodhuesit. Variantet e gjenit RHD do të identifikohen sipas metodave të publikuara së fundmi (6). Shkurtimisht, mostrat fillimisht skrinohen për alelet D e dobët tipi 1,2,3 nëpërmjet metodës Tm-shift (3; 4). Më pas të dhjetë ekzonet e gjenit RHD në mostrat që nuk përmbajnë asnjë nga alelet për variantet 1, 2,3, i nënshtrohen amplifikimit – PCR, sekuencimit direkt (3; 4) dhe të dhënat analizohen me programin Sequencher® v5.1 (Genes Codes Corporation, Ann Harbor, MI, USA)

## Përfundime dhe diskutime

Ky studim demonstroi përparësinë e analizave molekulare në përcaktimin e antigeneve të ruazave të kuqe të gjakut tek pacientët e varur nga transfuzioni, sikurse janë pacientët me sëmundje hematologjike dhe dështim të funksionit renal. Ne treguam, që gjatë praktikës rutinë në laborator, ekziston mundësia e mungesës së identifikimit të antigenit me metodat serologjike, për shkak të imunizimit nga transfuzionet e mëparshme dhe/ose varianteve të ndryshme të antigenit që përcaktohen nga gjenet përgjegjëse. Këto vështirësi në identifikim, serologjia i has shpesh, dhe ajo që ne kërkojmë të implementojmë, veçanërisht për këtë kategori individësh, është metoda molekulare nëpërmjet analizës së ADN për gjenin përgjegjës. Në këtë mënyrë, gjenotipizimi përmirëson kujdesin ndaj pacientit dhe ul imunizimin nga D (9; 10; 11). Studiuesit në fushën e gjenotipizimit molekular të grupeve të gjakut (2; 11; 12; 13; 14), e rekomandojnë

fuqishëm gjenotipizimin, si metodën e duhur për përcaktimin e saktë të antigeneve eritrocitare me rëndësi klinike në përgjithësi, por edhe në veçanti për antigenin D (8; 15; 16), që njihet tashmë edhe si shkaktari i Sëmundjes Hemolitike të Fetusit dhe të Porsalindurit HDFN.

## Referenca

- Ribeiro, K.R., Guarnieri, M.H., da Costa, DC., Costa, F.F., Pellegrino, Jr. J., Castilho, L., DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang* 2009; 97:147–152.
- Wagner, F., Why do we use serological blood group phenotype determination in chronically transfused patients? *Blood Transfusion* 2014; 12:1-2.
- Fichou, Y., Le Maréchal, C., Jamet, D., *et al.*: Establishment of a medium-throughput approach for the genotyping of *RHD* variants and report of nine novel rare alleles. *Transfusion* 2012; Dec 11. doi: 10.1111/trf.12009.
- Fichou, Y., Le Maréchal, C., Bryckaert, L., *et al.*: A convenient qualitative and quantitative method to investigate *RHD-RHCE* hybrid genes. *Transfusion* 2013; Apr 3. doi: 10.1111/trf.12179.
- Flegel, W.A., Eicher, N.I., Doescher, A., Hustinx, H., Goulard, P., Mansouri Taleghani, B., Petershofen, E.K., Wagner, F.F., In frame triplet deletions in *RHD* after the D antigen phenotype. *Transfusion* 2006; 46:2156-61.
- Xhetani, M., Seferi, I., Ferec, C., Zoraqi, G., Fichou, Y., Distribution of Rhesus blood group antigens and weak D alleles in the population of Albania. *Blood Transfusion* 2014 Oct; 12(4):565-9.
- Daniels, G., Finning, K., Martin, P., Soothill, P., Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: An important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang* 2004; 87:225–232.
- Daniels, G., Finning, K., Martin, P., Summers, J., Fetal blood group genotyping. Present and future. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1075: 88–95.
- Reid, M.E., Rios, M., Powell, V.I., *et al.* DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 2000; 40: 48-53.
- Castilho, L., Rios, M., Pellegrino, J. Jr., *et al.* Blood group genotyping facilitates transfusion of beta-thalassemia patients. *J Clin Lab Anal* 2002; 16: 216-20.
- Guelsin, G.A., Sell A.M., Castilho, L., *et al.* Benefits of blood group genotyping in multi-transfused patients from the south of Brazil. *J Clin Lab Anal* 2010; 24: 311-6.
- Hojjati, M.T., Einollahi, N., Nabatchian, F., *et al.* Allele- specific oligonucleotide polymerase chain reaction for the determination of Rh C/c and Rh E/e antigens in thalassaemic patients. *Blood Transfusion* 2011; 9: 301-5.
- Da Costa, DC., Pellegrino, J. Jr., Guelsin, G.A., *et al.* Molecular matching of red blood cells is superior to serological matching in sickle cell disease patients. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013; 35: 35-8.
- Bakanay, S.M., Ozturk, A., Ileri, T., *et al.* Blood group genotyping in multi-transfused patients. *Transfus Apher Sci.* 2013; 48: 257-61.
- Rujirojindakul, P., Flegel, W.A., Applying molecular immunohaematology to regularly transfused thalassaemic patients in Thailand. *Blood Transfusion* 2014; 12: 28-35.
- Veldhuisen, B., van der Schoot, C.E., de Haas, M., Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sang* 2009; 97:198–206. or screening. *Vox Sang* 2009; 97:198–206.