



RHD 유전자검사로 확진된 Partial D type VI-3 증례

A Case of Partial D Type VI-3 Confirmed by RHD Genotyping

이종권¹ · 유흥비² · 정유나¹ · 배재춘¹ · 조 덕^{1,2}Jong Kwon Lee, M.D.¹, HongBi Yu, B.S.², Yoo Na Chung, M.D.¹, Jae Chun Bae, M.T.¹, Duck Cho, M.D.^{1,2}성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학과¹, 성균관대학교 삼성융합의과학원 융합의과학과²Department of Laboratory Medicine and Genetics¹, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul; Department of Health Sciences and Technology², SAIHST, Sungkyunkwan University, Seoul, Korea

Weak D and partial D result in quantitative and qualitative changes in RhD protein expression respectively. It is difficult to discriminate weak D from partial D by serological tests alone. *RHD* genotyping is a useful method that complements serological results. A 64-year-old woman visited our hospital for microvascular decompression surgery. Her blood type was O, D negative by manual tube test and as per auto analyzer results (QWALYS-3 system; DIAGAST, France). Weak D and partial D tests were performed by using two different monoclonal anti-D reagents (Bioscot; Merck Millipore, UK; Bioclone; Ortho Clinical Diagnostics, USA) and a panel of nine monoclonal antibodies, including anti-D IgM and IgG (D-Screen; DIAGAST, France). However, these serological tests could not confirm the subtype of partial D. Therefore, sequencing of *RHD* exon 1 to 10 was additionally performed for the patient and the case was revealed to be partial DVI type 3.

Key Words: RhD, Weak D, Partial D, Genotyping, Sequencing

서 론

RhD (이하 D) 혈액형은 ABO 혈액형 다음으로 임상적으로 중요한 혈액형이다. 안전한 수혈을 위해서는 공여자와 환자의 정확한 D 혈액형 검사가 필수적이다. 그런데, 일부 D 변이형은 혈청학적 검사 방법으로는 D 혈액형을 정확하게 규명할 수 없어 *RHD* 유전자검사가 필요하다. D 검사(D typing)와 약-D 검사로는 D 음성으로 분류되지만 이중 약 20%는 *RHD* 유전자검사로 Asia type DEL(1227G>A) 형으로 재분류되는 경우가 대표적인 예다[1]. 이와 유사하게 다른 D 변이형(약-D형, 부분-D형 등)도 혈청학적 검사만으로는 정확한

D 혈액형 규명이 되지 않을 수 있는데, 그간 국내에 보고된 부분-D형 대부분은 혈청학적 검사로만 이루어진 보고들이었다[2-4]. Cho 등[2]이 한국인 헌혈자에서 선별된 부분-D형 14예 중 대부분(92.9%, 13/14)은 혈청학적 검사로 DFR유형으로 보고하였는데, Lee 등[4]은 한국인 부분-D형 16예를 분석하여 대부분(62.5%, 10/16)이 D type VI라고 다르게 보고하였다. 이러한 불일치는 부분-D형의 정확한 유형을 규명하기 위해서는 혈청학적 검사뿐 아니라 *RHD* 유전자검사가 필수적임을 시사한다. 하지만, 그간 국내에서는 *RHD* 유전자의 전체 10개 엑손을 분석하여 부분-D형의 정확한 유형을 규명한 사례가 없었다.

이에 저자들은 혈청학적으로 약한 D 발현을 보인 검체에서 혈청학적 검사만으로는 정확하게 부분-D 유형을 규명할 수 없었지만, *RHD* 유전자 전체 엑손 분석으로 그간 국내에서는 정확하게 규명할 수 없었던 partial D type VI-3형을 처음으로 보고하는 바이다.

증 례

64세 여자 환자가 미세혈관 신경감압술을 받기 위해 입원하였다. K2-EDTA 튜브의 정맥혈 검체로 자동화 장비(QWALYS-3 system; DIAGAST, Loos Cedex, France)로 실시한 혈액형검사에서 O형이었고, 항-D에는 음성이었다. D 혈액형에 대한 추가 분석을 위해 실시한 RhCE 표현형검사(anti-C, -c, -E 및 -e, Ortho Clinical Di-

Corresponding author: Duck Cho, M.D., Ph.D.

<https://orcid.org/0000-0001-6861-3282>

Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 81 Irwon-ro, Gangnam-gu, Seoul 06351, Korea

Tel: +82-2-3410-2403, Fax: +82-2-3410-2719, E-mail: duck.cho@skku.edu

Received: May 24, 2019

Revision received: August 5, 2019

Accepted: August 27, 2019

This article is available from <https://www.labmedonline.org>

© 2020, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

agnostics, High Wycombe, UK)는 Cce형이었다. D 혈액형 검사를 Anti-D SIHDIA 시약(Shinyang Diagnostics, Siheung, Korea)을 사용하여 시험관법으로 재검하여 응집반응이 없음을 확인하였고, 이어서 추가로 2개의 제조사의 항-D 시약(Bioscot; Merck Millipore, Watford, UK 및 Bioclon; Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA)으로 실시한 약-D 검사에서 각각 4+, 3+였다. 이후 잔여 검체로 추가로 실시한 9개의 다른 클론으로 제조한 항-D 시약으로 실시한 부분-D 검사에서 P3X21223B10 클론에서 제작한 시약에서만 응집을 보이고, 나머지는 응집이 관찰되지 않았다. 다양한 clone의 시약으로 실시한 D typing, 약-D 검사 및 부분-D 검사 결과와 시약에 대한 정보를 Table 1에 정리하였다.

D 변이형의 유형을 확인하기 위해 *RHD* 유전자의 엑손 1-10 그리고 각 엑손의 주변부 인트론을 *RHD* 유전자 특이적인 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응으로 *RHD* 유전자를 증폭한 후 증폭된 엑손 1, 2, 7-10은 다시 증폭 프라이머로 직접염기서열분석을 Seo 등이 보고한 방법과 동일하게 실시하였고, 증폭되지 않은 엑손 3-6은 *RHCE* 유전자로 판단하였다[1]. 각각의 *RHD* 유전자 특이적인 프라이머는 Fasano 등이 사용한 것과 동일하였다[1, 5]. 표준염기서열인 NM_016124.4를 기준으로 비교 분석한 결과 *RHD*와 *RHCE* 유전자 사이 교차(crossing over)의 결과인 *RHD*-*RHCE*(3-6)-*RHD* hybrid 구조의 돌연변이가 발견되었다(Fig. 1). 이 유전자에서 발견된 변이는 International Society of Blood Transfusion (ISBT) 명명법에 의하여 *RHD**06.03, *RHD**DVI.3로 명명할 수 있었다. 또한, 3-6번 엑손 이외의 자리에서도 *RHD* (*IVS1-29G>C*)의 변이가 추가로 확인되었다. 이 후 환자는 RhD 음성 혈액을 준비하였으나, 수술 시 출혈이 적어 수혈이 필요치 않았다.

고 찰

부분-D형은 약-D형 및 DEL형과 함께 D 변이형의 대표적인 유형이다. 이는 초기에는 “blood factors”, 이후에는 “mosaics”라고도 불렸지만, 1984년 Salmon 등에 의해 “부분-D (partial D)형”으로 명명되어 현재까지 사용되고 있다[6]. 최근에는 부분-D형과 약-D형의 정확한 감별이 어려운 경우가 있으니 ‘D 변이형’으로 통합하여 사용되기도 한다[7].

부분-D형은 항-D 시약에 대한 적혈구응집반응이 항-D 시약의 클론의 종류에 따라 다르게 나타난다. 이러한 특징은 *RHD* 유전자 분석을 통해 부분-D형은 적혈구 세포 밖 또는 막 표면의 고리

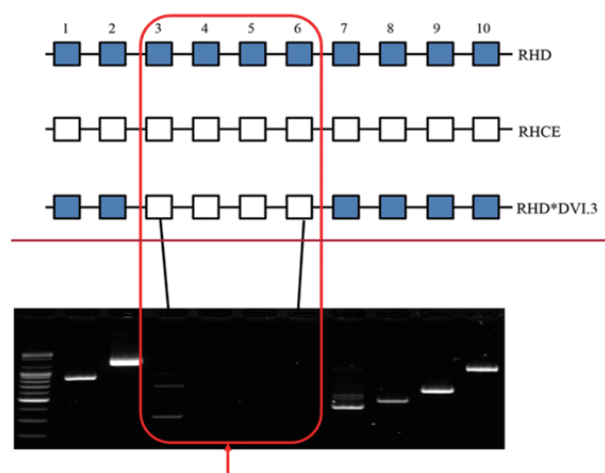


Fig. 1. The blue boxes and the white boxes represent *RHD* and *RHCE* exons 1-10, respectively. The arrows indicate negative PCR amplification of *RHCE* exons 3-6, which suggests *RHD**DVI.3.

Table 1. Summary of RhD typing, weak D test and partial D test performed by various anti-D reagents and information on corresponding epitopes and clones (types)

Tests	Methods	Reactivity (patient)	DVI	Brand	Epitope	Clone (type)
RhD typing	Tube	-	NI	SIHDIA	NI	TH-28 (IgM), MS-26 (IgG)
	Microplate	-	NI	QWALYS	NI	P3X61 (IgM)
Weak D test	Tube	4+	NI	Merck Millipore	NI	TH-28 (IgM), MS-26 (IgG)
		3+	NI	Ortho	NI	NI
Partial D ⁺ test	Tube	-	-	Diagast	epD2	P3X249 (IgG)
		-*	+/-		epD3	P3X290 (IgG)
		-	-		epD5	P3X241 (IgG)
		-	-			P3X35 (IgG)
		-	-		epD6	HM10 (IgM)
		-	-			HM16 (IgG)
		-	-			P3X61 (IgM)
		-	-		epD8	P3X21211F1 (IgM)
		4+	+		epD9	P3X21223B10 (IgM)

*According to Ye et al., RHDVI type 3 can have trace or negative reactivity against P3X290 clone [23].

[†]Partial RhD category was detected with the D-Screen Diagast kit, which consisted of 9 monoclonal anti-D antibodies specific for the most common categories of partial D (DII, DIIa, DIIb, DIIc, DIVa, DIVb, DVa, DVI, DVII, DFR, DBT, DHAR, and DHMI).

(RBC membrane surface loops)에 최소한 하나의 아미노산변이가 존재하므로 적혈구 표면의 D항원의 부분 결손이 항상 존재한다는 사실과 관련이 있다[8, 9]. Kim 등[3]은 65세 여자에서 수술 전 검사로 시행한 D 혈액형검사서 “부분-D Category Va 1예”를 보고하였는데, 환자의 적혈구는 D 검사에서 Ortho사의 항-D 시약에는 적혈구응집이 보이지 않았으나, Baxter Dade사의 항-D 시약에는 응집이 관찰되었다. 한편, Cho 등[2]은 14예의 부분-D형을 보고하였는데, 이들의 적혈구는 D 검사에서는 제조사가 다른 4개의 항-D 시약에서 모두 응집이 관찰되지 않았으나, 약-D 검사에서는 3개의 제조사(Merck Millipore, Ortho 및 GreenCross)의 시약에는 응집을 보이고 Dade사의 시약에는 응집이 없었다. 본 증례에서는 부분-D형에서 관찰되는 이러한 특징이 국내검사실에서 흔히 사용되고 있는 4종류의 항-D 시약에서는 관찰되지 않아 부분-D형을 의심할 수 없었으나, 9종류의 다른 클론에서 제조된 항-D 시약으로 실시한 약-D 검사에서 일부 시약에 다른 응집 강도를 보여 부분-D형을 의심할 수 있었다. 이는 D 항원이 양적으로 감소할 뿐 아니라 질적인 결손도 함께 관찰되는 소견으로 부분-D형에 해당하였다. 그러나, 비록 9개의 단클론성 항-D 시약을 사용하였지만 부분-D형의 세부 유형은 정확하게 결정할 수 없어 *RHD* 유전자검사를 실시하였다.

RHD 유전자검사는 혈청학적 검사의 보조적인 수단으로 사용되어왔다. 혈청학적 검사법으로 명확히 규명할 수 없었던 일부 공여자나 환자의 약-D형, 부분-D형, DEL형 등을 *RHD* 유전자검사로 정확하게 규명할 수 있었고, 이런 다양한 D 변이형의 유전형이 Rh 관련데이터베이스(예, <http://www.rhesusbase.info/>)에 정리되어 있다. 국내에서는 서구와 달리 *RHD* 유전자검사가 활발하지 않았다. 그런데 최근 기본 혈청학적 검사에 의해 D 음성으로 분류되었던 검체에서 *RHD* 유전자검사로 Asia type DEL형의 규명이 증가하는 추세이다[10-15]. 하지만, 약한 표현형을 갖는 약-D형이나 부분-D형을 대상으로 한 *RHD* 유전자검사는 몇 증례 보고를 제외하고는 드물었다[16]. 본 증례는 혈청학적으로는 완벽하게 D 변이형의 유형을 구분할 수 없었으나 *RHD* 유전자검사로 정확하게 부분-D형을 규명할 수 있었던 또 하나의 사례이다.

부분-D형의 대부분은 *RHD*와 *RHCE* 유전자의 교차에 의해 발생한다고 보고되었다[7]. 본 증례도 *RHD-CE-D* 교차에 의해 발생하였는데, 그간 보고된 부분-D VI type3와 동일한 유전자변이가 확인되었다. 문헌에 보고된 부분-D형은 1994년에 DVI type 2가 처음 보고되었는데, 이후 다양한 부분-D형들이 보고가 되었다. 이 중 DVI형은 D 양성 수혈을 받아 심각한 태아신생아용혈성질환을 일으킨 사례도 보고되어 임상적으로 중요하다[17]. 특히, 본 연구에서 발견된 Partial DVI type 3 유형은 Wagner 등[18]에 의해 1998년도에 처음 보고되었으며, 그 후 벨기에에서 4례, 그리고 인도에서

1예가 보고되었다[19, 20]. 한편, 동양에서는 중국에서는 비교적 흔하게 발견되는 부분-D형으로 보고되었다[21-24]. 이번 증례는 혈청학적 부분-D 검사에서 부분-D type 6에 가장 근접한 소견이었으나 하나의 항-D 시약에서 응집 여부에 차이가 있어 추가로 *RHD* 유전형검사를 실시하여 부분-DVI type 3로 확인되었다. 부분-D형의 유전형을 확인한 후 동일하게 보고된 증례들의 혈청학적 소견을 검토하였더니, Ye 등[24]은 P3X290 클론에서 제조한 항-D 시약에 음성임을 보고하여 본 증례와 동일한 소견이었다.

요 약

약-D형은 적혈구에 표현되는 D 단백질의 양적 감소를, 부분-D형은 질적 결손을 유발한다. 이들은 혈청학적 방법만으로는 정확한 감별이 어려운데, *RHD* 유전자검사는 이런 혈청학적 검사를 보완할 수 있는 유용한 검사다. 본 증례는 64세 여자 환자로 미세혈관감압술을 위해 내원하였다. 환자는 수기투브법과 자동혈액형검사장비(QWALYS-3 system; DIAGAST, France)에 의해 O형, D 음성이었고, 두 종류의 단클론성 항-D 시약(Bioscot; Merck Millipore, UK 및 Bioclone; Ortho Clinical Diagnostics, USA)을 이용한 약-D 검사와 9개의 단클론성항체(항-D IgM & IgG)로 구성된 시약(D-Screen; DIAGAST, France)으로 실시한 부분-D 검사로도 부분-D형의 세부 유형을 결정할 수 없었다. 따라서, *RHD* 유전자의 엑손 1에서 10까지 염기서열분석법을 추가로 실시하였고, 혈청학적으로 약한 D 표현형의 본 환자는 부분-D type 3형으로 확인되었다.

이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

REFERENCES

- Seo MH, Won EJ, Hong YJ, Chun S, Kwon JR, Choi YS, et al. An effective diagnostic strategy for accurate detection of RhD variants including Asian DEL type in apparently RhD-negative blood donors in Korea. *Vox Sang* 2016;111:425-30.
- Cho D, Choi GR, Jeon MJ, Kim KS, Seo JY, Shin MG, et al. Reactivity patterns of various anti-D reagents in 14 cases with partial D. *Korean J Lab Med* 2003;23:443-7.
- Kim DA and Kim JW. A case of partial-D category Va. *Korean J Blood Transfus* 2000;11:189-93.
- Lee HR, Chang HE, Lee K, Park KU, Song J, Han KS. Analysis of partial D subtypes by various anti-D reagents. *Korean J Blood Transfus*

- 2007;18:152-8.
5. Fasano RM, Monaco A, Meier ER, Pary P, Lee-Stroka AH, Otridge J, et al. RH genotyping in a sickle cell disease patient contributing to hematopoietic stem cell transplantation donor selection and management. *Blood* 2010;116:2836-8.
6. Sandler SG, Chen LN, Flegel WA. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the *RHD* genotype. *Br J Haematol* 2017;179:10-9.
7. Mark KF, ed. Technical manual. 19th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2017:304.
8. Flegel WA, von Zabern I, Doescher A, Wagner FF, Vytisková J, Písacka M. DCS-1, DCS-2, and DFV share amino acid substitutions at the extracellular RhD protein vestibule. *Transfusion* 2008;48:25-33.
9. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93:385-93.
10. Ma T, Yu H, Jeon S, Cho D, Chun S, Shin MG. Case of D-Variant from a Frameshift Mutation *RHD* 711delC. *Korean J Blood Transfus* 2019 Aug;30:168-73.
11. Luettringhaus TA, Cho D, Ryang DW, Flegel WA. An easy *RHD* genotyping strategy for D- East Asian persons applied to Korean blood donors. *Transfusion* 2006;46:2128-37.
12. Yoon J, Ko YE, Kim HN, Kim J, Jung BK, Lee SA, et al. A case of primary anti-D alloimmunization by *RHD* (c.1227G>A) DEL red blood cell transfusion. *Korean J Blood Transfus* 2016;27:169-73.
13. Kim KH, Kim KE, Woo KS, Han JY, Kim JM, Park KU. Primary anti-D immunization by DEL red blood cells. *Korean J Lab Med* 2009;29:361-5.
14. Yang HS, Lee MY, Park TS, Cho SY, Lee HJ, Lim G, et al. Primary anti-D alloimmunization induced by "Asian type" *RHD* (c.1227G>A) DEL red cell transfusion. *Ann Lab Med* 2015;35:554-6.
15. Choi S, Chun S, Seo JY, Yang JH, Cho D. Planned transfusion of D-positive blood components in an Asia type DEL patient: Proposed modification of the Korean national guidelines for blood transfusion. *Ann Lab Med* 2019;39:102-4.
16. Chun S, Yun JW, Park G, Cho D. The synonymous nucleotide substitution *RHD* 1056C>G alters mRNA splicing associated with serologically weak D phenotype. *J Clin Lab Anal* 2018;32:e22330.
17. Daniels G. Variants of RhD-current testing and clinical consequences. *Br J Haematol* 2013;161:461-70.
18. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Three molecular structures cause rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematologic features. *Blood* 1998;91:2157-68.
19. Van Sandt VS, Gassner C, Emonds MP, Legler TJ, Mahieu S, Körmöczí GF. *RHD* variants in Flanders, Belgium. *Transfusion* 2015;55:1411-7.
20. Fichou Y, Parchure D, Gogri H, Gopalkrishnan V, Le Maréchal C, Chen JM, et al. Molecular basis of weak D expression in the Indian population and report of a novel, predominant variant *RHD* allele. *Transfusion* 2018;58:1540-9.
21. He J, Ying Y, Hong X, Xu X, Zhu F, Lv H. Molecular basis and zygosity determination of D variants including identification of four novel alleles in Chinese individuals. *Transfusion* 2015;55:137-43.
22. Yan L, Wu J, Zhu F, Hong X, Xu X. Molecular basis of D variants in Chinese persons. *Transfusion* 2007;47:471-7.
23. Ye SH, Wu DZ, Wang MN, Wu XY, Xu HG, Xu H, et al. A comprehensive investigation of *RHD* polymorphisms in the Chinese Han population in Xi'an. *Blood Transfus* 2014;12:396-404.
24. Ye L, Wang P, Gao H, Zhang J, Wang C, Li Q, et al. Partial D phenotypes and genotypes in the Chinese population. *Transfusion* 2012;52:241-6.