

# RhD 음성 환자에서 확인된 *RHD-CE(3-8)-D* Hybrid형의 국내 최초 증례

## The First Korean Case of *RHD-CE(3-8)-D* Hybrid Type with a D-negative Phenotype

배고은<sup>1</sup> · 김태열<sup>1</sup> · 유홍비<sup>2</sup> · 서지영<sup>1</sup> · 조 덕<sup>1,2</sup>

Go Eun Bae, M.D.<sup>1</sup>, Tae Yeul Kim, M.D.<sup>1</sup>, HongBi Yu, B.S.<sup>2</sup>, Ji-Young Seo, M.T.<sup>1</sup>, Duck Cho, M.D.<sup>1,2</sup>

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학과<sup>1</sup>, 성균관대학교 삼성융합의과학원 융합의과학과<sup>2</sup>

Department of Laboratory Medicine and Genetics<sup>1</sup>, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul;

Department of Health Sciences and Technology<sup>2</sup>, SAIHST, Sungkyunkwan University School, Seoul, Korea

*RHD-CE-D* hybrid alleles cause partial D or D-negative phenotypes depending on the crossing-over sites between *RHD* and *RHCE*. The *RHD-CE(2-9)-D* hybrid allele is the only hybrid form reported as D-negative in the Korean population. Here, we report the first Korean case of the *RHD-CE(3-8)-D* allele in a D-negative patient with heart failure. His blood sample was typed as D-negative by the automated microplate method (QWALYS-3 system; DIAGAST, France). Weak D test was weak positive, but false positive reactivity could not be excluded due to positive direct antiglobulin test. To confirm the RhD type, *RHD* genotyping was performed, and the *RHD-CE(3-8)-D* hybrid, known as D-negative allele, was identified. Upon the patient's subsequent visit 7 months later, a follow-up RhD typing including an adsorption-elution test confirmed that the patient was D-negative.

**Key Words:** RhD, Genotyping, *RHD-CE-D* hybrid, D-negative

### 서론

RhD 혈액형은 적혈구 표면 D 항원의 발현 정도에 따라 D 항원이 정상적으로 발현된 D 양성, 발현되지 않는 D 음성, 양적 감소나 질적 결손이 발생한 D 변이형으로 분류할 수 있다. 혈청학적 검사로 분류된 RhD 음성의 발생 기전은 인종마다 다양하다. 유럽인은 *RHD* 유전자의 완전 결손(total deletion), 아프리카인은 *RHD* 위유전자(*RHD* pseudogene)가 대부분이며[1, 2], 한국인은 *RHD* 유전자의 완전 결손이 74.2%, 점돌연변이가 17.1%, 그리고 하이브리드

형(*RHD-CE-D* hybrid)은 8.7%였다[1]. 하이브리드형은 부분-D형과 RhD 음성을 유발하는 기전으로 알려져 있는데, RhD 음성을 유발하는 경우 그간 보고된 바에 의하면 모두 *RHD-CE(2-9)-D*로 알려져 있고 그 외의 하이브리드형은 국내에서 보고된 바가 없다[1].

이에 저자들은 혈청학적 검사에서 D 음성을 보인 30대 환자에서 *RHD-CE(3-8)-D* 유전형을 새롭게 발견하였기에 국내에서 처음으로 보고하는 바이다.

### 증례

30대 남자 환자가 심부전으로 외래 방문하였다. K2-EDTA 튜브의 정맥혈 검체를 이용하여 자동화 장비(QWALYS-3 system; DIAGAST, Loose Cedex, France)로 실시한 혈액형 검사는 A형, RhD 음성이었다. RhD 혈액형에 대한 추가 분석을 위해 시행한 RhCE 표현형은 (anti-C, -c, -E 및 -e, Bio-Rad, Cressier, Switzerland) Cce형이었다. 약-D 검사는 클론이 다른 두 개의 제조사의 항-D 시약(SIH-DIA; Shinyang Diagnostics, Siheung, Korea 및 Bioclone; Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA)으로 실시하였고 각각 음성, 약양성을 보였다. 그러나 약-D 검사의 음성 대조 시험(환자의 적혈구와 immuClone Rh-Hr Control; Immucor Med., Dreieich, Germany)에서도 약양성을 보여, Bioclone 시약에서 보인 약양성 반응

**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: September 8, 2021

Revision received: November 17, 2021

Accepted: December 27, 2021

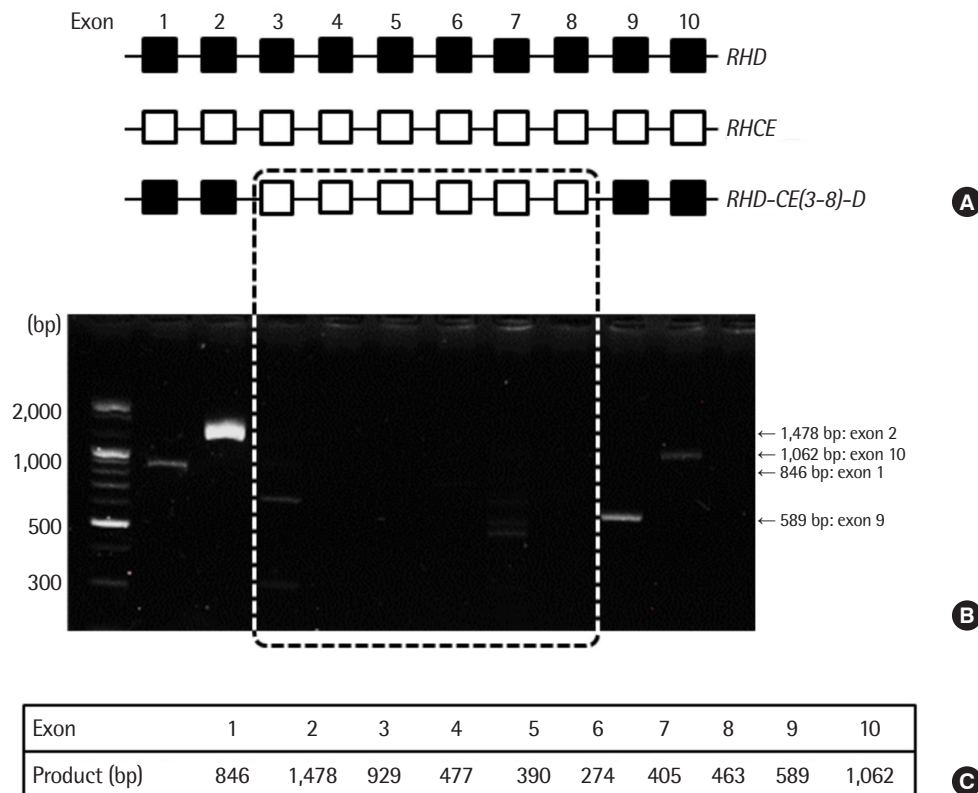
This article is available from <https://www.labmedonline.org>

© 2022, 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.

이 위양성일 가능성을 배제할 수 없었다. 이를 확인하기 위해 DC-Screening II (Bio-Rad)를 사용하여 실시한 단특이성(monospecific) 직접항글로불린검사에서 항 IgG단특이성 시약과 약양성을 보였다. 따라서 약-D 검사 결과는 환자의 적혈구에 부착되어 있는 IgG에 의한 위양성 반응이라 판단하였다. 위양성 반응의 원인을 제거한 후 추가적인 흡착-용출 검사(adsorption-elution test) 시행을 고려하였으나 검체량이 충분하지 않아 시행할 수 없었다. 이에 제한된 검체량으로 정확한 RhD 유형을 확인하고자 *RHD* 유전자 검사를 우선적으로 시행하였다. DNA는 정맥혈로부터 MagNA Pure 96 DNA Isolation kit (Roche, La Roche, Switzerland)로 추출하여, *RHD* 프로모터, 인트론 4, 엑손 7 그리고 엑손 10에 존재하는 *RHD* 특이적 다형성(*RHD*-specific polymorphism) 여부를 확인하고자 polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) 검사를 시행하였다[3]. 그 결과, 인트론 4와 엑손 7은 증폭되지 않았고 프로모터와 엑손 10이 증폭되어 전형적인 하이브리드형의 결과와 일치했다. 그러나 동시에 시행한 *RHD* 엑손 9번에 대한 직접염기서열분석에서, 정상 *RHD* 염기서열이 확인되어 한국인에서 보고되었던 전형적인 *RHD-CE(2-9)-D* 하이브리드형에서 예측되

는 결과와 상이했다. 이에 정확한 하이브리드 유형을 동정하기 위해 *RHD* 유전자의 엑손 1-10과 그 주변부 인트론을 Fasano 등[4]이 사용한 것과 동일한 *RHD* 유전자 특이적인 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응으로 *RHD* 유전자를 증폭하였다. 증폭된 산물로 Seo 등[3]이 보고한 방법과 동일하게 직접염기서열분석을 실시하였다. 그 결과, 엑손 1, 2, 9, 10이 증폭되었고 엑손 3-8은 증폭되지 않았다(Fig. 1). 증폭되지 않은 엑손 3-8은 *RHCE* 유전자로 판단하였고 증폭된 엑손 1, 2, 9, 10의 염기서열을 표준 염기 서열인 NM\_016124.4를 기준으로 분석한 결과, 돌연변이는 확인되지 않았다. 이에 본 환자는 *RHD*와 *RHCE* 유전자 사이 교차(crossing over)의 결과인 *RHD-CE(3-8)-D* hybrid 형이라 예상할 수 있었다. 이후 외래 재방문한 환자의 정맥혈 검체로 혈액형 검사를 다시 시행하였고, 항-D 검사와 약-D 검사, 직접항글로불린검사, 그리고 추가로 시행한 흡착-용출 검사 결과 모두 음성이 확인되어 본 환자의 표현형은 RhD 음성으로 최종 확인하였다(Table 1). 따라서 해당 환자는 RhD 음성 혈액을 준비할 예정이었으나 전혈구검사상 헤모글로빈 수치가 수혈 기준치보다 높아 수혈이 필요치 않았다.



**Fig. 1.** (A) Schematic representation of the genomic structure of *RHD-CE(3-8)-D* compared with intact *RHD* and *RHCE* gene. The black and white boxes represent *RHD* and *RHCE* exons 1-10, respectively. (B) PCR-SSP for *RHD* exon scanning. Exons 3-8 indicated by the dotted line did not result in amplification, suggesting *RHD-CE(3-8)-D* hybrid. Faint bands in exons 3 and 7 were considered non-specific according to (C), the expected size for amplification.

Table 1. Serological results of RhD typing, weak D test, and adsorption-elution test performed on the patient's first and subsequent visits

Test	Methods	Reactivity		Brand	Clone (type)
		1st visit	2nd visit		
DAT					
IgG	Microcolumn	+/-	-	Bio-Rad	Polyclonal
C3d	Microcolumn	-	-	Bio-Rad	BRIC8 (IgM)
RhD typing	Microplate	-	-	Qwalys	P3X61 (IgM)
	Tube	-	-	Bioclone	MAD2 (IgM), Polyclonal
	Tube	-	-	SIH DIA	TH-28 (IgM), MS-26 (IgG)
Weak D	Microcolumn	+/-	-	Bioclone	MAD2 (IgM), Polyclonal
		-	-	SIH DIA	TH-28 (IgM), MS-26 (IgG)
	Tube	+/-	-	Bioclone	MAD2 (IgM), Polyclonal
		-	-	SIH DIA	TH-28 (IgM), MS-26 (IgG)
	Autocontrol	+/-	-	Immucor	NI
Adsorption-elution	Glycine acid	NT	-	MIRRSCTECH	NI

Abbreviations: NT, not tested; NI, no information available.

## 고 찰

RhD 항원의 변화를 유도하는 대표적인 유전자 변이는 점 돌연 변이(point mutation)와 *RHD-CE-D* hybrid이다. *RHD-CE-D* hybrid형은 *RHD*와 *RHCE* 유전자 사이 교차(crossing over) 위치에 따라 부분-D형 혹은 D 음성의 표현형을 보인다. 부분-D형은 *RHD-CE(3-6)-D* hybrid형이, D 음성은 *RHD-CE(4-7)-D* hybrid형과 *RHD-CE(2-9)-D* hybrid형이 대표적이다[5]. 국내에서는 *RHD-CE(2-9)-D* hybrid가 D 음성 표현형을 보이는 hybrid형으로 유일하게 보고 되었다[1]. 본 증례는 국내 최초로 *RHD-CE(3-8)-D* hybrid형을 확인하였고 해당 변이가 RhD 음성 표현형을 보인다는 것을 혈청학적으로 확인하였다.

본 증례에서 발견된 *RHD-CE(3-8)-D* hybrid형은 인도인[7]과 튀니지인[8]에서 보고된 바 있으며 모두 D 음성 표현형을 보였다. Wagner 등[5]에 따르면 세포의 도메인 중 RhD 항원과 RhCE 항원을 구별할 수 있는 RhD-특이적 아미노산(RhD-specific amino acids)은 loop3, loop4, loop7에 존재하며, 각각 엑손 4, 엑손 5, 엑손 7이 암호화하고 있기 때문에 3개의 엑손 중에 1개 이상의 엑손에 변이가 생기면 D 항원결정인자(epitope)의 질적 결손이 발생하여 부분-D형의 표현형을 보이고, 3개의 엑손 모두 변이가 생기면 D 항원결정인자가 완전히 결손된 D 음성 표현형을 보이게 된다. 따라서 *RHD-CE-D* hybrid형에서 적어도 엑손 4에서 엑손 7까지 *RHCE*로 전환(conversion)되어야 D 음성의 표현형이 나타난다. 본 증례에서 발견된 *RHD-CE(3-8)-D* hybrid형은 엑손 3에서 엑손 8까지 *RHCE* 유전자로 전환되었기 때문에 D 음성 표현형을 보일 것으로 예상되었고, 실제로 혈청학적 검사에서 D 음성의 표현형을 보였다. 이는 약-D 검사 및 흡착-용출 시험을 통해 입증되었다(Table 1).

혈청학적 검사에서 위양성, 위음성, 검사법의 한계 등 여러 원인

에 의해 RhD 음성이거나 RhD 변이형 등 RhD 혈액형을 정확히 확인할 수 없을 경우에는 *RHD* 유전자 검사가 권고된다. 본 증례는 자동혈액형검사장비에 의해 RhD 음성, 약-D 검사에서 약양성 반응을 보였으나, 직접항글로불린검사에서도 약양성을 보여 RhD 음성과 RhD 변이형을 구분할 수 없었다. 검체의 부족으로 추가적인 혈청학적 검사를 할 수 없어 소량의 검체로도 가능한 *RHD* 유전자 검사를 실시하였고, *RHD-CE(3-8)-D* hybrid형에 의한 RhD 음성임을 확인할 수 있었다. 이는 *RHD* 유전자 검사를 통해서 RhD 혈액형에 대한 혈청학적 검사의 한계를 보완할 수 있는 사례였다.

*RHD*와 *RHCE* 유전자는 염기서열 간의 높은 유사성을 가지고 있으며 인접한 DNA 가닥(DNA strand)에 서로 반대 방향으로 위치하고 있어 유전자 전환이 일어나기 쉽다[5]. 이러한 전환의 결과로 발생하는 *RHD-CE-D* hybrid 대립 유전자는 교차 위치에 따라 적혈구 D 항원의 표현형 약화 혹은 결손을 유발한다. 본 증례에서는 중합효소연쇄반응으로 *RHD* 유전자 산물을 증폭하고 증폭된 산물인 엑손 1, 엑손 2, 엑손 9, 엑손 10 대해 직접염기서열분석법을 시행하여 변이가 없음을 확인하였다. 이러한 결과를 종합하여 본 환자는 엑손 3에서 엑손 8까지 *RHCE*로 치환되어 D 항원이 결손된 *RHD-CE(3-8)-D* hybrid형이라 판단할 수 있었다. 이러한 결과를 명확히 확인하고자 절단부위(breakpoint) PCR을 사용하여 염기서열 내 정확한 절단부위를 확인하는 것이 추가 연구로 필요할 것으로 생각된다. 또한 가족들에 대한 유전자 검사를 통해 본 증례에서 국내 처음으로 확인한 *RHD-CE(3-8)-D* hybrid 대립유전자의 유전양상을 확인하는 것 또한 도움이 될 것이다.

## 요 약

*RHD-CE-D* hybrid형의 유전자 변이는 *RHD* 유전자와 *RHCE* 유

전자의 교차 위치에 따라 D 음성 혹은 부분-D형의 표현형을 보인다. 그간 국내에서 보고된 바로는 D 음성의 표현형을 보이는 hybrid형으로 *RHD-CE(2-9)-D*가 유일했다. 이에 본 연구팀은 심부전으로 외래 방문한 D 음성 환자에서 *RHD-CE(3-8)-D* hybrid형을 발견하여 국내에서 최초로 보고하는 바이다. 본 환자는 자동혈액형검사장비(QWALYS-3 system; DIAGAST, France)에 의해 D 음성 이었고, 약-D 검사에서 약양성 반응을 보였으나 직접 항글로불린 검사에서도 약양성을 보여 약-D 검사 결과가 위양성일 가능성을 배제할 수 없었다. 이에 정확한 RhD 유형을 확인하고자 유전자 검사를 시행하였고, 중합효소연쇄반응과 직접염기서열분석법을 통해 D 음성 표현형을 보이는 대립유전자로 알려진 *RHD-CE(3-8)-D* hybrid형을 확인하였다. 추후 다시 내원한 환자의 정맥혈 검체를 이용하여 흡착-용출 검사를 포함한 혈청학적 검사를 다시 실시하였고, D 음성임을 확인하였다.

## 이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

## REFERENCES

1. Kim JY, Kim SY, Kim CA, Yon GS, Park SS. Molecular characterization of D- Korean persons: development of a diagnostic strategy. *Transfusion* 2005;45:345-52.
2. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, et al. The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 2000;95:12-8.
3. 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.
4. 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.
5. Wagner FF and Flegel WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology* 2004;20:23-36.
6. Kulkarni SS, Gogri H, Parchure D, Mishra G, Ghosh K, Rajadhyaksha S, et al. RHD-positive alleles among D- C/E+ individuals from India. *Transfus Med Hemother* 2018;45:173-7.
7. Moussa H, Tsochandaridis M, Kacem N, Chakroun T, Abdelkefi S, Gaubert J, et al. RHD positive among C/E+ and D-negative blood donors in Tunisia. *Transfus Clin Biol* 2014;21:320-3.
8. Yang HS, Chun S, Lee SA, Kwon JR, Choi YS, Kim JN, et al. Transfusion strategy of RhD-negative/variant patients in the Korean population. *Lab Med Online* 2017;7:89-93.