Važnost genotipizacije u RhD negativnih darivatelja krvi

Safić Stanić, Hana

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:089998

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Hana Safić Stanić

Važnost genotipizacije u RhD negativnih darivatelja krvi

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Hana Safić Stanić

Važnost genotipizacije u RhD negativnih darivatelja krvi

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu

Voditelj(i) rada: Prof.dr.sc. Ante Ćorušić

Doc.prim.dr.sc. Irena Jukić

Zahvaljujem prof.dr.sc. Anti Ćorušiću i doc.prim.dr.sc. Ireni Jukić na prihvaćanju mentorstva i stručnom vodstvu tijekom izrade disertacije. Beskrajno sam zahvalna svim djelatnicima Odjela za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, posebno dr.Vesni Đogić i dr.sc. Jasni Bingulac-Popović koje su uz ostale djelatnike Odjela pomogle u dizajniranju i izvođenju ove studije. Zahvale i izv.prof. dr.sc. Milanu Miloševiću na pomoći pri statističkoj obradi podataka.

I na kraju, posebnu zahvalu upućujem svojem suprugu, kćeri i roditeljima na velikom strpljenju i podršci u mojem profesionalnom napredovanju.

Disertaciju posvećujem svojoj majci i pokojnom ocu, koji su mi čitav život bili bezuvjetna potpora, besprijekorno odgajali i usmjerili na prave životne vrijednosti.

Sadržaj

1. UVOD I SVRHA RADA 1

1.1. Povijest otkrića Rh sustava krvnih grupa 2

1.2. Rh krvni sustav- pregled i molekularna osnova alela *RH* 4

1.2.1. Molekularna zbivanja u genima *RH* tijekom evolucije vrsta 4

1.3. Organizacija Rh proteina u membrani 5

1.4. D varijante 7

1.5. Nomenklatura Rh sustava 8

1.6. Anti-D protutijela 9

1.7. D negativni fenotip 10

1.8. Slabi D antigen 10

1.9. Parcijalni D antigen 12

1.10. DEL fenotip 13

1.11. Klinički značaj slabog D, parcijalnog D i DEL fenotipa 15

1.12. Značaj metoda *RHD* genotipizacije 18

2. HIPOTEZA 20

3. CILJEVI RADA 21

4. MATERIJALI I METODE (ISPITANICI-UZORAK) 22

4.1. Etička načela 22

4.2. Ispitanici 22

4.2.1. Uzorci 23

4.3. Imunohematološke serološke metode određivanja D antigena 23

4.3.1. Određivanje slabog izražaja D antigena 25

4.4. Molekularne metode 26

4.4.1. Automatizirana izolacija nukleinskih kiselina 26

4.4.2. *RHD* probir real-time PCR metodom 28

4.4.3. *RHD* genotipizacija pomoću PCR-SSP metode 31

4.4.4. DNA sekvenciranje..... 39

4.5. Reagensi korišteni u studiji..... 39

4.5.1. Reagensi za izolaciju genomske DNA 39

4.5.2. Reagensi za *RHD* probir 40

4.5.3. Reagensi za *RHD* genotipizaciju..... 40

4.5.4. Reagensi za elektroforezu 41

4.6. Statistička obrada podataka..... 41

5. REZULTATI 42

5.1. Socio-epidemiološke karakteristike ispitanika 42

5.2. Rezultati *RHD* probira RhD negativnih ispitanika 42

5.2.1. Rezultati genotipizacije RhD negativnih ispitanika..... 44

5.3. Rezultati *RHD* genotipizacije DDK kojima je serološki dokazan slabi D antigen..... 53

6. RASPRAVA..... 61

7. ZAKLJUČAK 82

8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU..... 84

9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU - SUMMARY 85

10. POPIS LITERATURE..... 86

11. KRATKA BIOGRAFIJA..... 99

POPIS OZNAKA I KRATICA :

DDK dobrovoljni darivatelj krvi

HBFN hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta

RhIg anti-D ljudski imunoglobulin

pb parovi baza

AHG antihumani globulin

HZTM Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

EDTA Etilendiamintetraoctena kiselina

IAT indirektni antiglobulinski test

PCR engl. *polymerase chain reaction* (lančana reakcija polimerazom)

PCR-SSP engl. *polymerase chain reaction with sequence specific priming* (lančana reakcija polimerazom sa specifičnim početnicama za sekvencu)

2´3´ddNTP 2,3-dideoksi-nukleotid trifosfat

dNTP deoksi-nukleotid trifosfat

KE koncentrat eritrocita

KT koncentrat trombocita

HZJZ Hrvatski zavod za javno zdravstvo

SZO Svjetska zdravstvena organizacija

1. UVOD I SVRHA RADA

Rh sustav je najsloženiji sustav krvnih grupa, a zbog visoke imunogenosti pojedinih antigena tog sustava od velikog je značaja u transfuzijskom liječenju i porodništvu. Oko 85% europske populacije na eritrocitnoj membrani nosi normalan D antigen, a oko 14% nema D antigen (1-3). Razlika između RhD pozitivnih i RhD negativnih ispitanika serološkim metodama nije uvijek jasna te ovisno o vrsti anti-D reagensa D antigen može biti i različito određen. Takve razlike se mogu pojaviti kod nositelja D varijanti koji imaju promijenjene epitope i/ili smanjen broj antigenih mjesta na eritrocitu (4, 5). Približno 0,2 do 1% Europljana nosi alele *RHD* promijenjene strukture koji kodiraju različite varijante D antigena koje je teško prepoznati rutinskim serološkim testiranjem, dok se genotipizacijom može točno odrediti alel. Sukladno tome definira se način transfuzijskog liječenja te prosudba primjene anti-D imunoprofilakse kod trudnica (2, 6). Do sada je otkriveno preko 200 alela koji određuju D varijante: 170 slabih D tipova te 115 parcijalnih D (7). Učestalost alela *RHD* varira u različitim populacijama. Studije su pokazale da je u Europi najučestaliji slabi D tip antigena 1, 2 i 3 te da kod nositelja istih ne dolazi do razvoja anti-D protutijela, pa mogu biti transfundirani s RhD pozitivnim krvnim pripravcima, a trudnice ne zahtijevaju anti-D imunoprofilaksu (8, 9). S druge strane nositelji parcijalnog D antigena kao darivatelji krvi mogu imunizirati RhD negativnu osobu, a kao primatelji RhD pozitivne krvi mogu razviti anti-D protutijelo (10, 11). Ekstreman oblik slabog D antigena je DEL fenotip, kojeg karakterizira manje od 30 antigena na membrani eritrocita zbog čega je D antigen izuzetno slabo serološki izražen te ga je moguće dokazati najčešće samo metodom adsorpcije i elucije anti-D s eritrocita. Zabilježeni su i slučajevi RhD imunizacije nakon transfuzije eritrocitnih pripravaka DEL fenotipa (2, 6, 12). S obzirom na sve veći broj dostupnih anti-D monoklonskih reagencija bilježe se i sve učestalije razlike u serološkim rezultatima određivanja novootkrivenih D varijanti. Važnu ulogu u razlučivanju ovakvih nalaza ima *RHD* genotipizacija.

Svrha studije je molekularnim metodama ispitati učestalost i tipove slabog i parcijalnog D antigena u skupini serološki RhD negativnih dobrovoljnih darivatelja krvi (DDK) i u skupini DDK sa slabom ekspresijom D antigena, te usporediti naše podatke s dostupnim podacima iz europskih zemalja. Provjerit ćemo i stupanj nesigurnosti

seroloških metoda u određivanju D antigena, te sukladno rezultatima predložiti novi algoritam određivanja D antigena u Hrvatskoj. Definirat ćemo učestalost i razdiobu alela *RHD* u Hrvatskoj, te omogućiti racionalizaciju primjene RhD negativnih krvnih pripravaka, kao i hiperimunog anti-D imunoglobulina.

1.1. Povijest otkrića Rh sustava krvnih grupa

Prije dvadesetog stoljeća sustavi krvnih grupa bili su slabo poznati. Pokušavajući riješiti problem ozbiljnog gubitka krvi uslijed većih trauma, liječnici su pokušali ubrizgati krv druge osobe ili životinje u ozlijeđenog pacijenta. U nekim je slučajevima to uspjelo i pacijent se oporavio. U mnogo više slučajeva, transfuzija krvi je zapravo naškodila pacijentu, često uzrokujući smrt. Nitko nije mogao predvidjeti koja će se vrsta reakcije dogoditi kao rezultat transfuzije krvi. Stoga je na početku devetnaestog stoljeća većina europskih nacija zabranila praksu transfuzije krvi. Godine 1900. Karl Landsteiner je ponudio objašnjenje za takve vrste reakcija nakon transfuzije krvi. Otkrićem ABO sustava krvnih grupa utemeljio je transfuzijsko liječenje. Tri glavne krvne grupe Landsteiner je objasnio postojanjem dva antigena A i B na eritrocitima, te protutijelima anti-A i anti-B u serumu. Četvrtu i najrjeđu krvnu grupu AB, kasnije su opisali Decastello & Sturli (13).

Rhesus krvni sustav je prvi put opisan 1939. kada su Levine i Stetson istražujući jaku hemolitičku reakciju kod rodilje nakon transfuzije ABO podudarne krvi supruga primijetili da njezin serum aglutinira suprugove eritrocite, kao i eritrocite 80% europske ABO kompatibilne populacije (14). U to je vrijeme većina liječnika prilikom davanja transfuzije krvi smatrala dovoljnim samo ABO podudarnost. Stetson je prvi shvatio da postoje i druge nepodudarnosti koje dovode do transfuzijskih reakcija. Bio je svjestan da se radi o novom antigenu koji je neovisan o tada poznatim antigenima ABO, MN i P sustava krvnih grupa. Transfuzijska reakcija koja se javila kod te rodilje nakon prve transfuzije, a koja nikad prije nije bila transfundirana potakla je kod Levine-a sumnju kako je dezintegrirani fetus uzrokovao imunizaciju s fetusnim antigenom. Ubrzo, 1939. godine Levine zajedno sa Stetsonom objavljuje rad u *Journal of the American Medical Association* pod nazivom „An unusual case of intra-group agglutination“ (14-16). Međutim, tada još nije uočena poveznica između majčine imunizacije i fetalne

eritroblastoze. Za razliku od Levina, Wiener je zaključio kako do imunizacije kod trudnica dolazi zbog djetetovih eritrocita, odnosno antigena koji se nalaze na njima i koje je dijete naslijedilo od oca. Antigen na eritrocitima supruga dobio je naziv *Rhesus* godinu dana kasnije kada su Landsteiner i Wiener pokazali da serum dobiven ubrizgavanjem krvi majmuna (*Macacus rhesus*) zecu, može aglutinirati eritrocite čovjeka, odnosno da krv zeca proizvodi protutijela nazvana anti-Rh na antigen koji se nalazi na membrani eritrocita majmuna *Macacus rhesus* (17). Tijekom 1941.godine Levine i suradnici potvrđuju kako je Rh nepodudarnost između majke i fetusa uzrok hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta (HBFN) (18). Godine 1942. dokazano je da se ljudski i životinjski anti-Rh razlikuju te da dvije skupine znanstvenika nisu utvrdili isti antigen. Naziv antigena dokazanog na životinjskim eritrocitima je kasnije promijenjen u LW, u čast Landsteineru i Wieneru.

Otkriće da anti-D protutijelo uzrokuje fetalnu eritroblastozu bilo je temelj za otvaranje laboratorija za određivanje krvnih grupa. Prvi laboratorij utemeljio je Diamond 1942. godine u Bostonu. Također, to je otkriće potaknulo liječnike na razmišljanje o prevenciji i liječenju aloimunizacija (15, 16).

Nekoliko godina kasnije, 1946. otkrivena kvantitativna varijanta slabo izraženog D antigena je od iznimnog kliničkog i dijagnostičkog značaja, prvobitno nazvana D^u, pa preimenovana u slabi D. Nakon 1953. otkrivene su kvalitativne varijante D antigena, tzv. parcijalni D. Pacijenti s parcijalnom D varijantom iako posjeduju D antigen mogu stvoriti anti-D protutijela (19-22).

Tijekom šezdesetih godina prošlog stoljeća otkriveno je kako se primarnu imunizaciju tijekom trudnoće i po život opasnu HBFN može spriječiti primjenom hiperimunog anti-D imunoglobulina nakon poroda (RhIg) (23). Nakon uvođenja poslijeporođajne anti-D imunoprofilakse početkom šezdesetih godina, te kombinirane prije- i poslijeporođajne anti-D imunoprofilakse devedesetih, učestalost HBFN smanjena je za > 90% (24).

Najveći napredak u razumijevanju Rh sustava doprinijelo je kloniranje gena (25). Promjene u organizaciji i konfiguraciji *RHD* i *RHCE* lokusa dovode do izmjene gena i nastanka hibridnih proteina, te posljedično novih antigena. Genetsko testiranje za gene *RH* danas se koristi u prijenatalnoj i kliničkoj transfuzijskoj medicini, za potvrdu ili

otkrivanje serološki slabih varijanti D antigena kod osoba s rizikom imunizacije na Rh antigene. Prvi *RH* gen, *RHCE* otkriven je 1990. godine, a *RHD* dvije godine kasnije. Danas je poznato više od 200 alela gena *RHD* (7, 24).

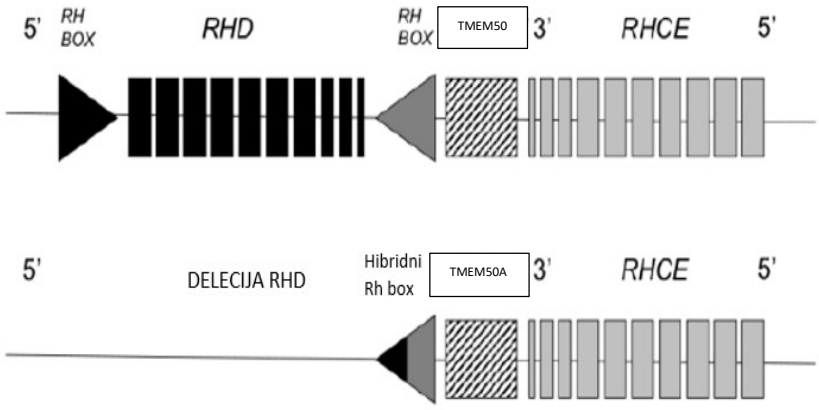
1.2. Rh sustav krvnih grupa- pregled i molekularna osnova alela *RH*

Rh sustav je uz ABO sustav klinički najznačajniji sustav krvnih grupa koji obuhvaća 54 Rh antigena. Rh proteini su produkti dva visoko homologna i blisko povezana gena koji čine *RH* lokus, smješten na kratkom kraku prvog kromosoma *1p36.2–p34*; *RHD* koji kodira D antigen i *RHCE* koji kodira protein na kojem se nalaze antigeni Cc i Ee (2). *RHCE* postoji u četiri glavne alelne skupine. Svaki alel određuje ekspresiju dva antigena u kombinacijama *Ce*, *ce*, *cE* ili *CE*. Oba gena imaju gotovo identičnu genomsku organizaciju (93,8 % homologije), s 10 egzona i pripadajućim intronima. Egzoni 1 do 7 kodiraju svaki po 50-60 aminokiselina, dok egzoni 8 do 10 skupa kodiraju preostalih 58 aminokiselina. Najznačajnija razlika je u intronu 4, gdje postoji delecija gena *RHD* od oko 600 parova baza (pb) u odnosu na gen *RHCE*. Između oba gena *RH* smješten je treći gen *TMEM50A* (engl. *transmembrane protein 50A*) i u neposrednoj je blizini 3' kraja gena *RHCE*. Dva DNA segmenta s 9000 pb tzv. *Rh box*, graniče sa genom *RHD* (24). Razumijevanje događaja koji dovode do polimorfizma *RHD* i temeljnih mehanizama doprinijeli su poboljšanju strategije *RH* genotipizacije.

1.2.1. Molekularna zbivanja u genu *RH* tijekom evolucije vrsta

Usporedbom mišjeg i humanog genoma 2002. godine dokazano je kako je *RHCE* nastao umnožavanjem ancestralnog gena *RH* tijekom evolucije sisavaca. Većina sisavaca ima samo jedan gen *RH*, čiji položaj odgovara ljudskom genu *RHCE*. Duplikacijom *RHCE* je stvoren *RHD* gen u evolucijskoj prošlosti. Pretpostavka je kako se orijentacija *RHD*-a obrnula tijekom ovog događaja. U genomu čovjeka su za vrijeme duplikacije i vjerojatno u vrijeme njegovog nastanka, stvorene dvije homologne ponovljene sekvence, dužine oko 9,000 pb, nazvane *Rh boxes*, koje su bočno pridružene genu *RH*. Moguće je da su Rh box segmenti bili presudni za umnožavanje. Gen *RHD* se izgubio iz genoma za

vrijeme nejednakog križanja (engl. *crossing-over*), u događaju koji je obuhvatio i uzvodni i nizvodni *Rh box*, a ponovio se vjerojatno više puta (Slika 1). Delecija *RHD*-a dogodila se tijekom evolucije hominida, tako da danas mnogim ljudima potpuno nedostaje gen za *RHD*. Ovaj haplotip je vodeći uzrok RhD negativnog fenotipa u svijetu (26-28).

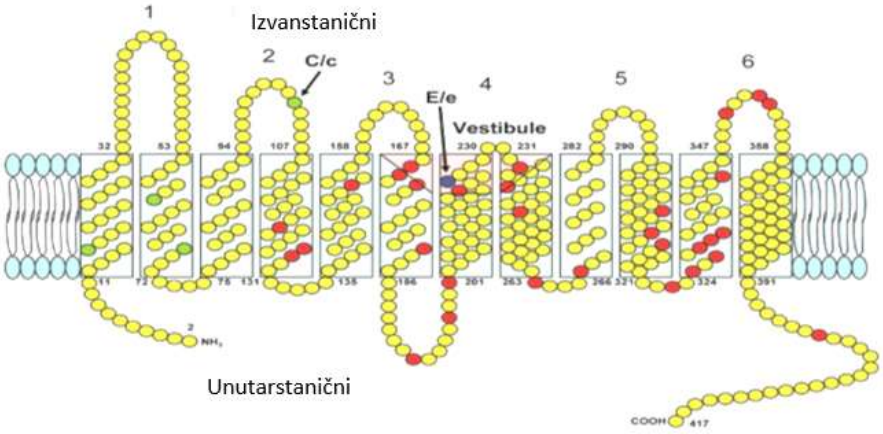


Slika 1. Shematski prikaz strukture *RH* lokusa, gornji panel prikazuje organizaciju gena kod D pozitivnih haplotipa, donji panel pokazuje organizaciju gena nakon nejednakog križanja *(*engl. *crossing-over)* između dva *Rh box*-a, što dovodi do D negativnog haplotipa (preuzeto i prilagođeno iz Dohmen SE. The human immune response to Rh antigens, 2008.)

1.3. Organizacija Rh proteina u membrani

Geni *RH* se nasljeđuju kao dva haplotipa - jedan od oca i jedan od majke. Rh sustav ima složeni oblik genetskog nasljeđivanja, uključujući pet najčešćih Rh antigena (C, D, E, c, e). Sve tri skupine antigena su u kodominantnom odnosu prilikom nasljeđivanja (29). Za antigenu aktivnost i ekspresiju Rh polipeptida neophodno je formiranje kompleksa s *Rh50* glikoproteinom, produktom još jednog funkcionalnog gena *RHAG* (naziva se još i *RH50)*. *RHAG* je slično organiziran u 10 egzona i sličan je *RHCED* u 36% sekvence, ali se nalazi na zasebnom lokusu, na kratkom kraku šestog kromosoma: 6p21.1–p11. Dok su alteracije *RHAG* lokusa relativno rijetke, lokusi *RHCE/D* pokazuju značajan polimorfizam (2).

RhD i RhCE proteini se sastoje od 417 aminokiselina i formiraju 6 izvanstaničnih petlji s više od 30 epitopa, 12 transmembranskih i 7 unutarstaničnih proteinskih segmenata. Međusobno se razlikuju po 31 do 35 aminokiselina. D antigen može snažno potaknuti imuni odgovor i stvaranje anti D-protutijela, čija posljedica može biti jaka poslijetransfuzijska hemolitička reakcija i HBFN. *RHCE* kodira C/c antigene koji se razlikuju u 4 aminokiseline te E/e koji se razlikuju u jednoj aminokiselini (Slika 2) (24, 30).



Slika 2. Model RhD i RhCE polipeptida u membrani, s 12 intramembranskih i 6 izvanstaničnih domena. Žuti krugovi predstavljaju aminokiseline koje se podudaraju. Crveni krugovi predstavljaju pozicije RhD ili RhCE u kojima se aminokiseline razlikuju. Zeleni i plavi krugovi predstavljaju C/c i E/e polimorfizme (preuzeto i prilagođeno iz: Daniels G. Human Blood Groups. 3.Izd. WileyBlackwell, 2013.)

Kompleks Rh proteina je značajan za strukturu eritrocitne membrane. Zajedno s drugim membranskim proteinima (RhAG, LW, CD47 i GPB) te interakcijom s proteinom 4.2 i ankirinom, doprinosi održanju citoskeleta stanice (31). Rh_{null} eritrociti, koji nemaju Rh protein, imaju oblik stomatocita i sferocita, a osobe s ovim fenotipom često pokazuju simptome hemolitičke anemije. Dva su mehanizma nastanka Rh null fenotipa: RhD negativna osoba koja ima inaktivan *RHCE* gen ili češće - naslijeđeni inaktivan *RHAG* gen koji inače kodira protein bitan za ekspresiju Rh proteina na membrani eritrocita (32, 33). Zbog snažne indukcije imunog odgovora i stvaranja anti-D protutijela D antigen je klinički najznačajniji antigen. Pored svog značenja u transfuziji

krvi, nedavno provedene funkcionalne studije i analize strukturnih modela ukazuju kako su Rh proteini članovi jedne prastare obitelji membranskih proteina koja je uključena u transport amonijaka (34-37). Non-eritroidni Rh proteini pronađeni su i u drugim tkivima uključujući bubreg, jetru, mozak i kožu, na mjestima gdje dolazi do proizvodnje i eliminacije amonijaka (38-41).

1.4. D varijante

Više od 85% europske populacije ima, dok oko 14% nema D antigen na eritrocitnoj membrani što je posljedica delecije gena *RHD*. Učestalost RhD negativnih fenotipova varira među pripadnicima različitih etničkih skupina (42). Molekularna osnova RhD negativnog fenotipa je jedinstvena za pojedinu etničku skupinu te zbog toga mora postojati specifični molekularni dijagnostički pristup za pojedine populacije. RhD negativni fenotip nastaje kao posljedica tri različita haplotipa: 1. delecija gena *RHD*, 2. *RHDψ* (RHDpsi) – pseudogen (prisutna duplikacija od 37 pb posljednjih 19 nukleotida introna 3 i prvih 18 nukleotida egzona 4 što dovodi do pomicanja okvira čitanja i pojave prijevremenog stop kodona) i 3. *RHD-CE-D* hibrid koji nastaje genskom konverzijom velikog odsječka *RHD –RHCE*. U Aziji je najčešće prisustvo velikog *RHD-CE (2-9)-D* hibrida, dok je kod Europljana najčešća delecija *RHD*-a, a u Africi - *RHDψ*. Iako je većina osoba bijele rase RhD pozitivna ili negativna, postoje varijacije u izražaju D antigena koje zajednički nazivamo D varijante. Oni obuhvaćaju D antigene koji imaju potpuni, ali slabo izražen D antigen, kao i parcijalne D antigeni kojima nedostaju D epitopi. Oko 0,2-1% Europljana nosi alele *RHD* promijenjene strukture koji kodiraju D varijante. Većina kodira pojedinačne promjene aminokiselina, mnoge od njih jednostavno mijenjaju količinu RhD proteina u membrani, dok druge mijenjaju topologiju RhD membrane i D epitope. Potonje su odgovorne za RhD pozitivne osobe koje se prezentiraju s anti-D protutijelima nakon transfuzije ili trudnoće. Pojedine D varijante znatno se razlikuju po učestalosti u pojedinim populacijama. Serološki je teško razlikovati pojedine tipove slabog te slabi i parcijalni tip s dostupnim komercijalnim anti-

D reagensima, a važno ih je razlučiti jer su pojedini, ali ne svi tipovi D varijanti odgovorni za nastanak RhD imunizacije kod RhD negativnog bolesnika (33).

Opisane su različite molekularne osnove nastanka pojedinih D varijanti. Slabi D antigen nastaje zbog jednostruke mutacije gena *RHD* koja dovodi do zamjene aminokiselina u unutarstaničnom ili transmembranskom segmentu RhD proteina, što rezultira različitim brojem D antigena na površini eritrocita, a kreću se od 30 do 6200. Normalni Rh fenotip sadrži 10 000 do 30 000 antigenih mjesta (2, 43). Poseban oblik slabog D antigena je DEL fenotip, kod kojeg je D antigen izuzetno slabo serološki izražen zbog manje od 30 antigena na membrani eritrocita (44). Molekularne osnove za nastanak parcijalnog D antigena su *RHD/CE* hibridi, jednostruka ili višestruke mutacije u segmentu gena koje kodiraju izvanstanični dio D antigena i dovode do njegove kvalitativne promjene (Slika 2.).

Pojedine osobe koje nose takve varijante u serološkim testovima mogu biti antigen negativni, slabo pozitivni ili pozitivni. Najčešći parcijalni oblik D antigena među europskom populacijom je DNB (45). DVI je klinički najznačajniji s obzirom da često uzrokuje RhD imunizaciju i HBFN. Njegova učestalost u Europljana je između 0,02-0,05% (46).

1.5. Nomenklatura Rh sustava

Od njegova otkrića 1940. godine nekoliko nomenklatura je korišteno za opisivanje antigena, proteina i gena u Rh sustavu. Najvažniji Rh antigeni: D, C ili c, i E ili e, izvorno su bili pisani abecednim redom (CDE), ali kasnije, kada je prepoznato da se C i E antigeni naslijeđuju u paru („*en bloc*“), redoslijed je promijenjen u DCE. Slovo "d" se koristi kao oznaka za D negativni fenotip, iako “d“ antigen ne postoji.

Fisher i Race su vjerovali kako se Rh sustav sastoji od 3 blisko povezana gena ili alela: D na jednom lokusu, C/c na drugom, i E/e na trećem lokusu, što je rezultiralo DCE terminologijom. Wiener terminologija je zasnovana na ideji da su Rh antigeni produkt jednog gena koji kodira „aglutinogen“ sastavljen od više čimbenika. Terminologija je danas zastarjela i izvan uporabe. Modificirana Wienerova terminologija koristi se

najčešće u govornom jeziku kako bi opisala pojedini haplotip. Veliko slovo R označava haplotip koji producira D antigen, malo slovo r označava odsustvo D antigena, dok simboli 1, 2, 0 i z, te ´, ˇ , y označavaju kombinacije Cc i Ee antigena.

ISBT nomenklatura zasniva se na ideji dodjele broja svakom antigenu, primjerice D antigen je Rh1, C je Rh2, E Rh3, c Rh4, e Rh5. Prisutnost ili odsutnost pojedinog antigena označava se s oznakom Rh:1 za prisutnost, te Rh:-1 za odsutnost D antigena. Primjerice eritrocit nereaktivan D,C,E, a pozitivan c,e bio bi označen kao Rh:-1,-2,-3,4,5. ISBT nomeklatura nije praktična za govorni jezik, već isključivo za pisanje. Novija Rh nomenklatura razlikuje antigene, gene i proteine. Antigeni se označavaju slovima D, C, E, c, e, dok se geni *RH* označavaju velikim slovima, u „italic". Aleli se označavaju kao i gen uz dodatak zvijezde (*), npr. *RHCE**ce, a proteini prema antigenu koji nose ,,RhCe, RhcE, RhCE (1).

1.6. Anti-D protutijela

Uz protutijela iz ABO sustava krvnih grupa, anti-D protutijelo je klinički najznačajnije u transfuzijskoj medicini jer može uzrokovati hemolitičku poslijetransfuzijsku reakciju i HBFN (47). To su IgG protutijela koja nastaju kao posljedica izlaganja RhD pozitivnim eritrocitima tijekom transfuzije krvi ili trudnoće. Anti-D protutijela najčešće ne aktiviraju komplement, a nakon oblaganja eritrocita dovode do ekstravaskularne hemolize eritrocita. U transfuzijskom liječenju osoba koje su stvorile anti-D moraju se primijeniti D negativni pripravci. Prema objavljenim istraživanjima, otprilike 80% zdravih RhD negativnih dobrovoljaca i 20-30% RhD negativnih pacijenata koji su primili veći volumen RhD pozitivne krvi su razvili anti-D protutijela. (28, 47-50). Stoga je imperativ da se RhD pozitivni krvni pripravci ne transfundiraju RhD negativnim djevojčicama i ženama u reproduktivnoj dobi, pacijentima s anti-D protutijelima te pacijentima koji zahtijevaju učestalo transfuzijsko liječenje.

S obzirom da su anti-D- protutijela IgG razreda, mogu proći placentarnu barijeru i obložiti fetalne eritrocite koji imaju dobro razvijen D antigen. To rezultira s hemolizom obloženih eritrocita i fetalne anemije. RhD HBFN ostaje i dalje glavna indikacija za eksangvinotransfuziju u novorođenčadi (24).

1.7. D negativni fenotip

D negativni fenotip karakterizira potpuni nedostatak RhD proteina na membrani eritrocita. Najrasprostranjeniji je u europskoj populaciji (15-18%), dok je rjeđi u Africi (5%) i u Australiji, a kod Azijata se smatra rijetkom krvnom grupom i ne određuje se rutinski (<1%). U Europljana najčešći uzrok D negativnog fenotipa je delecija čitavog gena *RHD*-a, uz prisustvo hibridnog *Rh box-a,* dok Afrikanci i Azijati često imaju neaktivan ili tihi *RHD* (51). Otprilike 66% RhD negativnog domicilnog stanovništva Afrike imaju *RHD* s umnoženih 37 pb koji uzrokuje preuranjeni stop kodon i ne kodiraju funkcionalni protein, dok 15% nosi hibridni *RHD-CE-D* gen (52). Ovaj hibrid *D-CE-D* ne ispoljava D antigen i kodira izmijenjeni C antigen. U Azijata, 10-30% RhD negativnih osoba je DEL fenotipa i imaju vrlo nisku razinu D antigena koju nije moguće otkriti serološkim metodama direktne aglutinacije (33). U rutinskom kliničkom radu, teško je utvrditi DEL fenotip, a važno ga je otkriti kod DDK jer transfuzija DEL eritrocita RhD negativnom primatelju može uzrokovati imunizaciju. S druge strane, najčešći azijski DEL fenotip rijetko uzrokuje stvaranje anti-D protutijela nakon transfuzije RhD pozitivnih eritrocita, ali ga je važno prepoznati kod primatelja krvnih pripravaka (1/3 svih serološki RhD negativnih) i time smanjiti potrebe za RhD negativnim eritrocitima (53).

1.8. Slabi D antigen

Neki eritrociti ispoljavaju slabije oblike D antigena dajući i slabiju reaktivnost s anti-D reagensom u inicijalnom dokazivanju D antigena, a pojedini reagiraju s anti-D reagensom samo u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT). Obe skupine označavamo i nazivamo slabim D tipovima. Broj takvih uzoraka ovisi o anti-D reagensima koji se koriste za dokazivanje D antigena. To je prvi zamijetio Stratton 1946. godine pa je takve varijante nazvao D^u. Naziv je promijenjen 90-ih godina prošlog stoljeća u „*slabi D"* kada je utvrđeno kako se radi o smanjenom broju D antigena (54). Promijenjena odnosno smanjena ekspresija D antigena javlja se u 0,2-1% europske populacije (2, 42). Takva

ekspresija je posljedica točkastih mutacija *RHD*-a koje dovode do zamjene aminokiselina u unutarstaničnom ili transmembranskom dijelu RhD proteina, što dovodi do smetnji u integraciji proteina u membranu eritrocita (55). Posljedično tome dolazi do smanjenog broja D antigena na eritrocitu premda sam antigen ostaje kvalitativno nepromijenjen. Slabi oblik D antigena nije imunogen kao normalan D antigen. Ovisno o prisutnoj mutaciji broj antigena varira. Eritrociti s vrlo malim brojem antigena kao što je slabi D tip 2, mogu ostati neotkriveni u testiranju s pojedinim komercijalnim anti-D reagensima ili metodama testiranja. To rezultira proturječnim rezultatima pa jedna te ista osoba može biti proglašena kao RhD pozitivna i RhD negativna u različitim institucijama, ili testirana različitim reagensima i metodama (2).

Varijante slabog D antigena tip 1, 2, 3 i 4.0/4.1, koji imaju najveću učestalost u europskim populacijama, predstavljaju više od 90% svih slabih D tipova i ne dovode do anti-D imunizacije (56). U istraživanju provedenom 2011. u skupini pacijenata s područja središnje Hrvatske njihova učestalost je iznosila 85% (57). Bolesnici s ovim tipovima slabog D antigena ne mogu se imunizirati D antigenom pa stoga mogu biti transfundirani RhD pozitivnim krvnim pripravcima, a trudnice ne moraju primiti RhIg imunoprofilaksu. Imunizacija osoba sa slabim oblikom D antigena nije česta pojava. Izuzeci obuhvaćaju osobe sa slabim D tipom 11, 15 i 4.2, poznatog i pod nazivom DAR, kao i slabim D tipom 7 (58, 59). Ove osobe ne smiju biti transfundirane s RhD pozitivnim krvnim pripravcima, a kao trudnice moraju biti obuhvaćene imunoprofilaksom. U naših DDK koji su predstavnici hrvatske populacije učestalost slabih D antigena tip 4.2, 11 i 15 je približno 1 na 10 000 ispitanika (60). Sukladno tome za pretpostaviti je da je i rizik imunizacije primatelja krvi u Hrvatskoj, s istim RhD genotipom, jednako nizak.

Broj mutacija koje dovode do pojave slabog D fenotipa raste, a navedene su na web stranicama Rhesus Base (7). Testiranje Rh negativnih pacijenata na slabi D nije preporučeno osim ako je riječ o novorođenčetu kako bi utvrdili treba li majka primiti RhIg ili u naizgled D negativnog pacijenta za kojeg se predviđaju višestruke transfuzije s ciljem uštede D negativnih krvnih pripravaka. Preporuke su testirati DDK, a krvni pripravci u slučaju pozitivnog rezultata moraju biti označeni kao RhD pozitivni. Dostupne serološke metode ne mogu otkriti eritrocite s vrlo malim ili nemjerljivim brojem D antigena pa bi u slučaju prijave RhD imunizacije u pacijenta koji je primio

RhD negativni krvni pripravak trebalo proširiti testiranje darivatelja metodom adsorpcije-elucije anti-D reagensa i *RH* genotipizacijom.

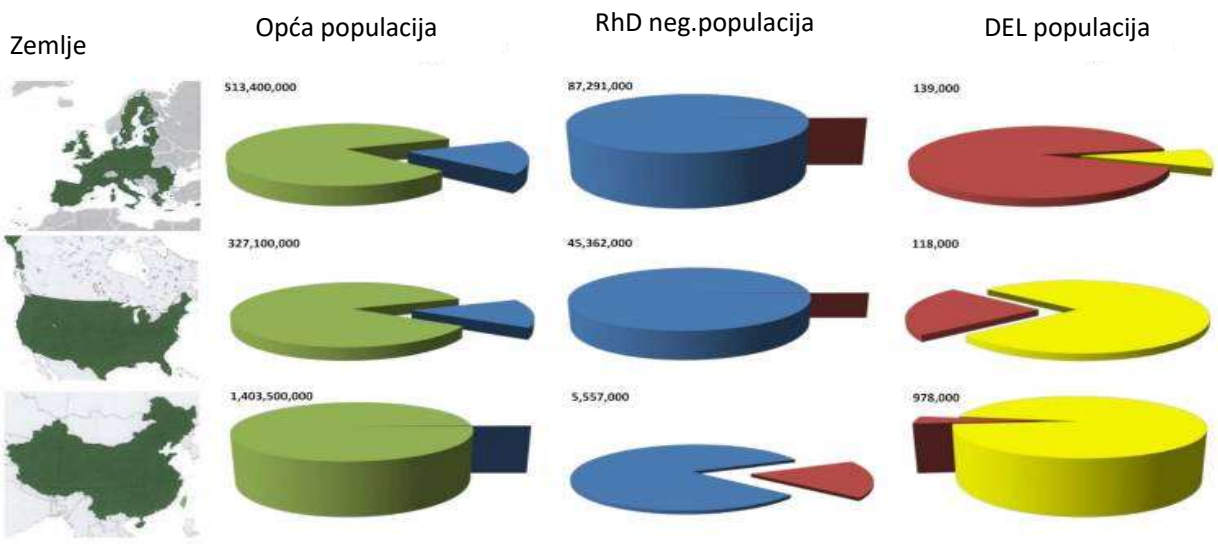
1.9. Parcijalni D antigen

Rijetko RhD pozitivne osobe mogu stvarati anti-D aloprotutijela. To je shvatio i Argall i suradnici davne 1953. godine otkrivši prisutnost anti-D protutijela u serumu pacijenta sa slabim D antigenom (61). Od tada je otkriveno više od 100 tipova parcijalnog D antigena (7). Parcijalni D antigen posljedica je ili izmjene egzona između 2 gena ili točkastih mutacija gena *RHD* koje dovode do zamjena aminokiselina na izvanstaničnom dijelu proteina, pa za razliku od slabog D, dolazi do izmijenjenih ili nastanka novih epitopa. Kategorije D antigena (od DII do DVII) predstavljaju skup svih parcijalnih oblika D antigena, od kojih je DVI klinički najznačajnija u Europljana jer dovodi do stvaranja anti-D protutijela. Prevalencija DVI među DDK u jugozapadnoj Njemačkoj je oko 0,02%, dok je prevalencija DVI u populaciji DDK klasificiranih kao slabi D u jugozapadnoj Engleskoj 5%, a u SAD-u se kreće između 5-10% (62). Kategorije DII i DVII uzrokovane su pojedinačnim zamjenama aminokiselina, dok su DIII, DIV, DV i DVI nastale od hibridnih *RHD-CE-D* alela, a svaki od njih kodira nastanak nekoliko podtipova. Kod hibridnih alela dijelovi gena *RHD* zamijenjeni su odgovarajućim regijama *RHCE*. Ove zamjene obuhvaćaju male regije koje uključuju nekoliko kodona, cijele egzone ili velike regije gena, kao i nove sekvence aminokiselina. One nastaju kao rezultat stvaranja hibridnih proteina (nastalih od dijelova RhD i RhCE) koji predstavljaju nove Rh antigene (npr. DAK, Goa , Evans, Dw, BARC, FPTT, Rh32) (32, 33).

Eritrociti s parcijalnim D antigenom tipiraju se kao D pozitivni, neki u direktnoj aglutinaciji, neki u IAT-u, a pojedinci s takvim fenotipom često stvore anti-D protutijela nakon izlaganja normalnom D antigenu tijekom transfuzijskog liječenja ili trudnoće. Ponekad parcijalni D tipovi imaju smanjenu ekspresiju D antigena pa se rutinskim serološkim testovima tipiraju kao slabi D (62).

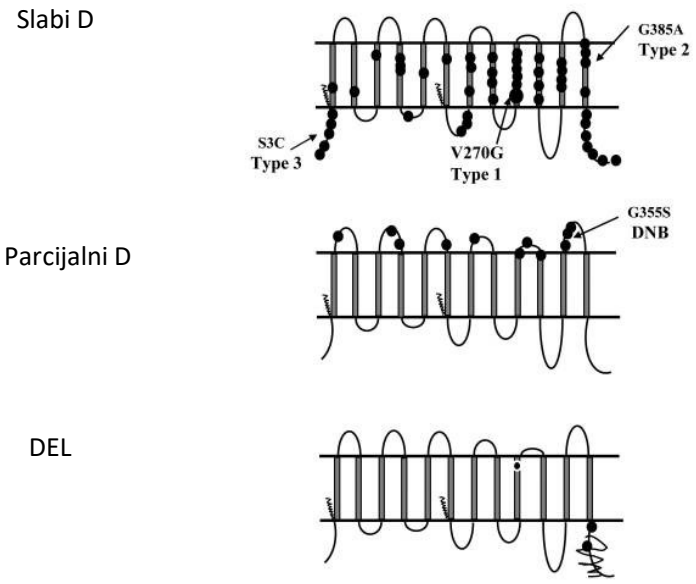
1.10. DEL fenotip

Izrazito slabo izražen oblik D antigena naziva se DEL (raniji naziv bio je D_{el}). Moguće ga je dokazati serološki isključivo adsorpcijom anti-D reagensa na ispitivane eritrocite, a potom elucijom s ispitivanih eritrocita ili molekularnim metodama. Eritrociti takvog fenotipa na membrani obično imaju vrlo mali broj D antigena, manji od 22, za razliku od normalnog D-fenotipa koji ima 30 000 ili slabog D antigena s 1 500 do 7 000 antigena. Rutinskim tipiranjem najčešće se klasificiraju kao D negativni (43, 44, 62, 63). DEL varijante su nereaktivne s antihumanim globulinom (AHG) što ih razlikuje od slabog D. Primijećeno je kako su DEL varijante povezane s *RHCE**Ce ili *RHCE**cE alelima. Mehanizmi nastanka DEL varijanti su promjene nukleotida u transmembranskom ili citoplazmatskom dijelu RhD proteina. Postoje značajne razlike u prevalenciji DEL fenotipova među različitim rasama i etničkim populacijama. Najveća prevalencija DEL fenotipa u populaciji D negativnih osoba prijavljena je u osoba azijskog podrijetla i to slijedom: 30% kod Kineza, 28% kod Japanaca i 17% kod Korejaca. *RHD*DEL1* ili *RHD*01EL.01* alel je odgovoran za približno 98% DEL fenotipova kod Azijata, te se shodno tome naziva azijski tip DEL-a (64, 65). Prevalencija DEL fenotipa u populaciji RhD negativnih Europljana je vrlo niska (0,1%) (62, 66). Najčešći *DEL* alel kod bijelaca je *RHD M295I*. Danas postoji oko 43 DEL alela prijavljena u *Rhesus Base* - bazi podataka (65). Ovisno o prevalenciji DEL alela u određenoj populaciji trebalo bi implementirati i optimalnu strategiju testiranja (46). Kombinacija C^+ fenotipa i molekularnog probira smatra se isplativom i pouzdanom metodom za probir DDK u transfuzijskim centrima (67).



Slika 3. Učestalost DEL varijanti u 3 populacijske skupine (Europa, SAD, Kina). I. Više od 83% u općoj populaciji čine RhD pozitivni (zeleno). II. U populaciji RhD negativnih (plavo), mali segment čine DEL fenotipovi (crveno) III. Azijski tip DEL-a (žuto) predstavlja sve DEL varijante u Kini, ali ga ima i u populaciji SAD i EU (preuzeto i prilagođeno iz Flegel WA i sur. DEL, 2020.)

Istraživanja iz istočne Azije i Europe su dokazala da DEL može uzrokovati RhD aloimunizaciju kod RhD negativnih primatelja krvi (12, 68-71). Dodatno, DEL aleli mogu uzrokovati neusuglašenosti u tumačenju genotipa, odnosno fenotipa. Nedavne studije su pokazale kako pacijenti i trudnice najčešćeg azijskog *RHD*DEL1* alela ne razvijaju aloimunizaciju te mogu primiti RhD pozitivnu krv i ne zahtijevaju RhIg nakon poroda RhD pozitivnog novorođenčeta, dok trudnice s parcijalnim i *RHD-CE-D* hibridnim DEL alelima mogu stvoriti anti-D protutijela (64, 65, 72, 73). Fenotip DEL kod fetusa može inducirati RhD aloimunizaciju kod majki koje su RhD negativne (63).



Slika 4. Slabi, parcijalni D i DEL fenotip. **A**. Slabi D tip karakteriziraju promjene aminokiselina u transmembranskom ili unutarstaničnom djelu. Naznačene su promjene (krug) karakteristične za najčešće tipove slabog D-1, 2 i 3; **B.** Zamjena aminokiselina u izvanstaničnom djelu odgovorna je za nastanak parcijalnog D. Naznačena je promjena za učestali tip parcijalnog D fenotipa u Europi-DNB; **C.** DEL fenotip. Prikazane su promjene karakteristične za DEL, a najčešća mutacija u Europi *M295I* prikazana je u 9. transmembraskom segmentu (preuzeto i prilagođeno iz Westhoff CM. The Structure and Function of the Rh Antigen Complex, 2007.)

1.11. Klinički značaj slabog D, parcijalnog D i DEL fenotipa

Određivanje D antigena dio je nalaza krvne grupe prema kojem se provodi transfuzijsko liječenje bolesnika, odnosno primjenjuje RhIg kod trudnica. Budući je D antigen najjači imunogen, a stvoreno anti-D protutijelo uzrokuje ekstravaskularnu hemolitičku poslijetransfuzijsku reakciju i HBFN, svrha određivanja D antigena je sprječavanje RhD imunizacije. Posljednja dva desetljeća prikupljena su brojna saznanja o molekularnoj osnovi i genetskim varijacijama Rh sustava. Oko 1% Europljana ima

aberantne alele čiji proizvod su varijante D antigena: slabi i mozaični/parcijalni D antigeni. Komercijalnim serološkim testovima nije moguće razlikovati navedene varijante, a to može rezultirati neprimjerenom transfuzijskom terapijom i povećanim rizikom od aloimunizacije kod pacijenata koji primaju krvne pripravke od ovih darivatelja. Kod određivanja D antigena iznimno je važno posebno kod žena generativne dobi, razlikovati slabe i parcijalne D varijante. Naime, istraživanja su pokazala da osobe sa slabim D antigenom tipa 1, 2 i 3 koji čine do 93% svih slabih D antigena, te tipom 4.0 i 4.1 ne stvaraju anti-D protutijela i mogu biti transfundirani s RhD pozitivnim krvnim pripravcima, a trudnice ne moraju primiti RhIg (62, 74). Takav pristup bi mogao uštedjeti do 5% RhD negativnih krvnih pripravaka i 3-5% RhIg-a kod trudnica kada bi se radio molekularni probir na D varijante (24). Nasuprot tome, parcijalni D antigeni povezani su sa stvaranjem anti-D protutijela. Transfuzijsko liječenje pacijenata s parcijalnim D antigenom treba provesti RhD negativnim krvnim pripravcima, a trudnice i rodilje moraju primiti RhIg. Mnogi parcijalni D antigeni budu na žalost određeni kao RhD pozitivni te prepoznati tek nakon što se bolesnik imunizira. Parcijalni D antigen- DVI je najznačanija varijanta u populaciji Europljana koja uzrokuje svaranje anti-D protutijela nakon izlaganja D antigenu (2). U osoba afričkog podrijetla najčešće su DIII i DAR varijante. Učestalost ostalih slabih D antigena je vrlo niska ili su dokazani samo sporadično. Od njih se jedino osobe koje imaju slabi D antigen tip 4.2, 11, 15, 21, 27 mogu imunizirati D antigenom. Ove osobe stoga ne smiju biti transfundirane s RhD pozitivnim krvnim pripravcima, a kao trudnice moraju biti obuhvaćene imunoprofilaskom (74).

Značaj stvaranja anti-D protutijela kod RhD negativnih žena jest da svaka slijedeća trudnoća s RhD pozitivnim fetusom nosi rizik od HBFN-a, a kod RhD negativnih primatelja krvi eliminira mogućnost transfuzije RhD pozitivnih pripravaka u hitnim stanjima te zahtijeva doživotnu transfuziju RhD negativnim krvnim pripravcima. Određivanje genotipa *RHD* ima veći značaj kod DDK nego kod primatelja, jer može isključiti osobe sa slabim D ili DEL fenotipom u skupini naizgled negativnih DDK. Imunogenost slabog D antigena i sposobnost stvaranja anti-D protutijela u RhD negativnih primatelja krvi je dugi niz godina predmetom rasprava (48, 75-77). Klinička studija koja je procjenjivala rizik aloimunizacije u RhD negativnih pacijenata koji su primili 68 krvnih pripravaka s D varijantama nije zabilježila ni jedan slučaj RhD

imunizacije u 49 pacijenata (78). Druga studija je prijavila učestalost RhD aloimunizacije s RhD negativnim krvnim pripravcima od 63,5% kod pacijenata koji su primali višestruke transfuzije (79). Međutim neće svi RhD negativni pacijenti stvoriti anti-D protutijela nakon transfuzije RhD pozitivnih krvnih pripravaka. To ovisi o više čimbenika, a prije svega o imunološkom statusu primatelja krvi (79, 80). Dakle, transfuzija krvnih pripravaka s varijantom slabog D antigena ipak može prouzročiti RhD imunizaciju kod RhD negativnih primatelja. Dokumentirano je nekoliko RhD imunizacija transfuzijom eritrocita slabog D krvnog pripravka s 800 -1500 antigena po eritrocitu (81). Iako osnovni aleli ovih darivatelja nisu određeni i može se tvrditi da predstavljaju iznimke koje nose posebne alele, pojavila su se druga izvješća o RhD imunizacijama od strane DDK sa slabim D alelima: na Novom Zelandu, ccDEe darivatelj krvi slabog D tipa 2 s oko 450 antigena/stanici uzrokovao je primarnu RhD imunizaciju (82). Isto je prijavljeno i za slabi D tip 1 s Cde u transu, gustoće 357 antigena po eritrocitu (83). Uz to, RhD imunizaciju uzrokovao je rijetki slabi D tip 26, s gustoćom antigena nižom od 70 antigena po eritrocitu (84). Dokazi o DEL imunizaciji također postoje, premda je rizik znatno niži nego za normalan RhD, a detaljnije su obrađeni u nastavku ovog rada.

Zaključno, prilikom određivanja D antigena i kod odabira krvi treba uzeti u obzir učestalost pojedinih varijanti u populaciji, osobitost bolesnika, rizik stvaranja anti-D protutijela i raspoložive zalihe RhD negativne krvi. Treba imati na umu kako je anti-D klinički značajno protutijelo, a nakon izlaganja RhD pozitivnoj krvi svi bolesnici odnosno trudnice ne stvaraju anti-D protutijelo. RhD imunizaciju treba spriječiti u žena generativne dobi i u trudnica te bolesnika kronično ovisnih o transfuzijskom liječenju.

1.12. Značaj metoda *RHD* genotipizacije

Serološke metode određivanja D antigena imaju svoja ograničenja, pa je pojava različitih rezultata česta u rutinskoj praksi. Razlog tome jest činjenica da nema standardne prakse u interpretaciji rezultata serološki slabo izraženog D antigena, a osim toga postoje i razlike u metodi izvođenja rutinskih seroloških testova kao i korištenih monoklonskih anti-D reagensa koji različitim aviditetom aglutiniraju slabe D varijante. Velik broj različitih gena *RHD* može utjecati i na razinu ekspresije i potencijalno na strukturu molekule i D epitopa (33). Iako su dostupna jaka standardizirana monoklonska anti-D protutijela i relativno brze i jednostavne metode aglutinacije, mnogi RhD fenotipovi ne mogu se definirati samo na osnovu tih testova.

Nedoumice se mogu riješiti kombinacijom seroloških i molekularnih metoda. Posljednje desetljeće ubrzani razvoj molekularne dijagnostike utječe na sva područja medicine. U transfuzijskoj medicini DNA genotipizacija se koristi kao nadopuna ili zamjena za serološke testove u određivanju krvnih grupa (84). Većina polimorfizama antigena nastaje zbog promjene jednog nukleotidnog polimorfizma u odgovarajućim genima, a DNA testovi koji ciljaju te promjene usporedivi su sa serološkom tipizacijom. U nekim slučajevima, kada test serumi nisu dostupni, genotipizacija eritrocitnih krvnih grupa je jedini način kojim se omogućava transfuzija podudarnih koncentrata eritrocita. Genotipizacija je zadovoljavajući način u pronalaženju antigen negativnih pripravaka krvi. Upotreba genotipizacije antigena krvnih grupa je našla svoju primjenu na nekoliko područja medicine uključujući prijenatalnu medicinu za procjenu rizika od HBFN i kandidata za RhIg, odabir darivatelja koštane srži, za hematološke bolesnike s anemijom koja zahtijeva kronično transfuzijsko liječenje te onkološke pacijente koji primaju terapiju monoklonskim protutijelima koja interferiraju s prijetransfuzijskim ispitivanjem (85, 86). Određivanje D antigena serološki RhD negativnim DDK molekularnim metodama još nije postala rutinska praksa. Studije su pokazale da je *RHD* genotipizacija opravdana za RhD negativne, a C+ ili E+ darivatelje, uzimajući u obzir rezultate nekih autora koji su pronašli slabe D ili DEL varijante kod serološki RhD negativnih, a C+ ili E+ osoba samo *RHD* molekularnom tipizacijom (6, 64, 84, 85).

Uvođenje genotipizacije u laboratorijsku praksu značajno povećava sigurnost testiranja i pouzdanost određivanja RhD antigena te smanjuje nepotrebnu primjenu RhIg kod žena

sa serološki slabo izraženim D antigenom. Istodobno bi uvođenje genotipizacije utjecalo na uštedu RhD negativnih krvnih pripravaka koji bi inače bili transfundirani osobama sa slabim D tipovima 1, 2 i 3. Sekvenciranje cijelog genoma u budućnosti omogućit će pacijentima određivanje gena za veliki broj eritrocitnih antigena koji će biti dio medicinske dokumentacije te omogućiti personalizirani odabir transfuzijske terapije (86-88).

2. HIPOTEZA

Uvođenjem genotipizacije *RHD* u skupini RhD negativnih dobrovoljnih darivatelja krvi možemo otkriti one koji imaju oslabljenu varijantu D antigena i koji mogu imunizirati primatelje transfuzije.

3. CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

RHD genotipizacijom odrediti vrstu i učestalost alela *RHD* koji uzrokuju serološki slabe D varijante u populaciji dobrovoljnih darivatelja krvi.

SPECIFIČNI CILJEVI:

- usporediti rezultate *RHD* genotipizacije s rezultatima serološkog testiranja D antigena
- razmotriti potrebu uvođenja molekularnog probira skupine RhD negativnih DDK na prisustvo DEL alela
- procijeniti rizik RhD aloimunizacije transfuzijom krvnih pripravaka sa serološki slabim varijantama RhD (nakon što se otkriju i proglase RhD pozitivnima)
- usporediti učestalosti RhD varijanti u ispitivanoj skupini s podacima drugih europskih zemalja
- procijeniti osjetljivost seroloških metoda u otkrivanju slabog i/ili parcijalnog D antigena
- izraditi prijedlog integracije *RHD* genotipizacije u algoritam testiranja dobrovoljnih darivatelja krvi

4. MATERIJALI I METODE (ISPITANICI-UZORAK)

4.1. Etička načela

Ovo presječno istraživanje (engl. *cross-sectional study*) odobrilo je Etičko povjerenstvo Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM) i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. Broj: 380-59-10106-21-111/54). Istraživanje je provedeno u HZTM u Zagrebu u skladu sa svim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje su sudjelovale u ovom znanstvenom istraživanju uključujući Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske, Zakon o krvi i krvnim pripravcima.

4.2. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u Odjelu za molekularnu dijagnostiku u HZTM. U istraživanje je bilo uključeno 6533 ispitanika - RhD negativnih DDK s područja središnje Hrvatske u razdoblju od 6 mjeseci. Oni su činili prvu istraživačku skupinu. Kriteriji za uključivanje DDK u istraživanje bili su sljedeći: RhD negativni DDK koji dolaze na darivanje krvi u HZTM i na terenske akcije, muškarci i žene bez obzira na dob koji zadovoljavaju opće kriterije za darivanje krvi. Svi ispitanici su bili građani Hrvatske dobnog raspona od 18 do 65 godina (dobni raspon u kojemu osobe mogu biti DDK) te nisu postojali kriteriji za isključivanje ispitanika iz istraživanja. Prema postojećem algoritmu imunohematološkog testiranja DDK, svi su bili RhD negativni u direktnoj aglutinaciji i IAT-u na prisustvo D antigena. Toj skupini je učinjen *RHD* probir te u slučaju pozitivnog rezultata i *RHD* genotipizacija.

U istraživanje je bila uključena i druga skupina od 263 DDK kojima je dokazan D antigen samo indirektnom metodom (DDK sa slabijom ekspresijom D antigena) kojima je učinjena *RHD* genotipizacija i definiran *RHD* polimorfizam.

Prije uzimanja uzorka venske krvi, a nakon informiranja o detaljima studije potpisom su potvrdili pristanak za planirano ispitivanje.

4.2.1. Uzorci

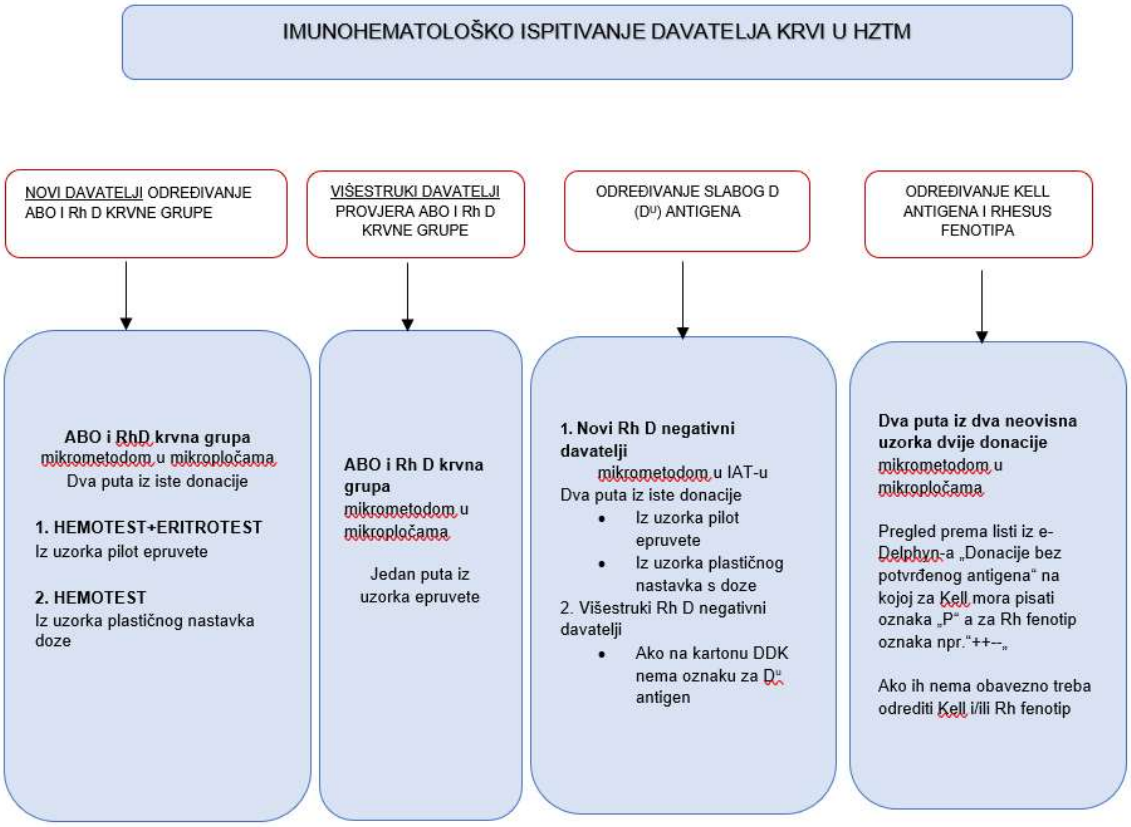
Svim RhD negativnim DDK je uzet uzorak venske krvi (6 ml) u epruvetu-K_2EDTA (Becton, Dickinson and Company, SAD) s antikoagulansom etilendiamintetraoctena kiselina. Svi uzorci venske krvi označavani su identifikacijskim brojem donacije te je identitet ispitanika - DDK zaštićen, a svi podaci su bili dostupni jedino voditelju studije ulaskom u bazu podataka kompjutorskog programa HZTM-a (eDelphyn®).

Epruvete s uzorcima venske krvi bile su dostavljene na Odjel te su uzorci pripremani za molekularno testiranje. Načinjene su mješavine (engl. *pool*) od po 20 uzoraka nakon čega je slijedila izolacija genomske DNA, *RHD* probir (real-time PCR) i *RHD* genotipizacija (PCR-SSP metodom). U provođenju ispitivanja korišteni su laboratorijski uređaji koji su redovito verificirani sukladno sustavu osiguranja kvalitete uz niže navedene reagense.

4.3. Imunohematološke serološke metode određivanja D antigena

Svakoj dozi krvi mora biti određen D antigen. Novim DDK D antigen se odredio dva puta iz iste donacije s dva monoklonska anti-D reagensa (istog ili različitih proizvođača) usmjerena na različite epitope molekule D antigena. Ako je rezultat oba testa bio istovjetan, uslijedila je validacija rezultata. Višestrukim DDK D antigen je određen direktnom mikrometodom u mikropločama na poluautomatskom sustavu Tecan-Genesis-Medusa (Tecan Trading AG, Švicarska) s monoklonskim reagensima RUM1 (HZTM, RH) i MS 201 (Bioscot Serological, Engleska) te mikrometodom u mikropločama na 2 automatska sustava: PK 7300 (Beckman Coulter, SAD) s RUM 1 i MS 201 (Merck Milipore, SAD) i NEO (Immucor, Njemačka) s RUM 1 i D175+D415 1E4 (Immucor, Njemačka). Rezultat se usporedio s povijesnim nalazom te ukoliko su bili istovjetni, rezultat je validiran. U slučaju izostanka pozitivne reakcije s monoklonskim anti-D reagensima u direktnoj aglutinacijskoj metodi, ispitivanje je nastavljeno s anti-D reagensom metodom u IAT-u (Slika 5)(89).

Ostali antigeni iz Rhesus sustava C, c, E, e odredili su se dva puta iz neovisnih donacija (inicijalno i potvrdno određivanje). Kod sljedećeg dolaska DDK, nalaz je bio potvrđen, a rezultat pohranjen na karton DDK i više nije bio ponavljan.



Slika 5. Algoritam imunohematološkog ispitivanja darivatelja krvi u HZTM-u (89)

4.3.1. Određivanje slabog izražaja D antigena

Slabi D antigen dokazan serološkim tehnikama ili serološki slabi D fenotip je oblik D antigena koji s monoklonskim anti-D reagensom u direktnoj aglutinacijskoj metodi daje slabo pozitivnu reakciju (≤2+) ili aglutinacija izostane, a u metodi u IAT-u daje vidljivu aglutinaciju.

Darivateljima koji su u direktnom testu s monoklonskim anti-D reagensima bili negativni prisustvo D antigena na eritrocitima ispitivano je manualno mikrometodom u DiaMed mikrokarticama (BioRad, Švicarska) u IAT-u s IgM/IgG monoklonskim anti-D reagensom koji sadrži mješavinu klonova D415 1E401/172-2 (Immucor, Njemačka). Prvo određivanje slabog D antigena izvodilo se iz epruvete s uzorkom venske krvi DDK, a drugo određivanje (samo kod novih DDK) iz uzorka krvi iz nastavka vezanog na dozu eritrocitnog pripravka. Mikrokartice su inkubirane 15 minuta na 37°C u DiaMed grijaču i potom centrifugirane u DiaMed centrifugi. Rezultati ispitivanja očitavali su se promatranjem stupnja aglutinacije s prednje i stražnje strane jažica. Aglutinirane stanice na površini gela u obliku crvene crte ili raspoređeni aglutinati u gelu označavali su pozitivan rezultat, a kompaktni talog stanica na dnu mikrostupca negativan rezultat. U slučaju nejasnog ili nesukladnog rezultata određivanja D antigena uzorak je upućen na daljnje imunohematološko ispitivanje. Ispitanike kod kojih smo dokazali klinički značajne alele smo dodatno serološki analizirali dokazivanjem D antigena postupkom adsorpcije/elucije. Za dokazivanje DEL antigena korišten je anti-D NOVACLONE (Immucor Gamma, Belgija) serum koji sadrži IgM (stanična linija D175-2) i IgG (stanična linija D415 1E4) protutijela. Jednake količine (1mL) eritrocita ispitanika i anti-D seruma su se inkubirale 1h u vodenoj kupelji na +37°C, nakon čega smo uzorak cenrifugirali (3000 okretaja/3min) i odvojili supernatant, a na preostalim eritrocitima radili kemijski eluat (DiaCidel, Diamed, Švicarska). Dobivene eluate smo testirali u Ortho panelu (0,8% RESOLVE Panel A, Ortho Clinical Diagnostics, Engleska).

Uzorke druge skupine ispitanika (n-263) kojima je D antigen dokazan samo metodom u IAT-u (slabija ekspresija D antigena) retestirali smo različitim monoklonskim anti-D reagencijama i serološkim metodama kako bi ustanovili jačine serooloških reakcija pojedinih D varijanti:

1. Automatskom metodom- sustav Tango optimo: komercijalne BioRad mikrotitar ploče sa stripovima koji sadrže monoklonske anti-D (IgM) reagense: BS 226 i BS 232 (BioRad, Njemačka)
2. DiaClon ABO/Rh mikrokartice koje sadrže monoklonske anti-D (IgM) reagense: LDM3(LHM59/20) i 175-2 (BioRad, Njemačka)
3. DiaClon, ABD Confirmation mikrokartice koje sadrže monoklonske anti-D (IgM) reagense: TH 28, RUM-1 i LDM1 (BioRad, Njemačka)
4. DiaClon anti-D-VI neg. mikrokartice koje sadrže monoklonske anti-D (IgM) reagense: TH 28, MS-26 i 175-2.7(BioRad, Njemačka)

Granična vrijednost (engl. *cut-off*) za proglašavanje pozitivnog rezultata D antigena u gel karticama je +++ (score 10), a cut-off kod sustava Tango u mikropločama za monoklonski reagens BS 226 je +++ (score 10), a za BS 232 + (score 5).

Rezultate smo tumačili na sljedeći način:

- Darivatelji koji nisu na eritrocitima imali dokazan D antigen u IAT-u proglašeni su RhD negativnima.
- Darivatelji sa serološki slabo izraženim D antigenom su kao darivatelji krvi RhD proglašeni pozitivnima, a kao primatelji RhD negativnim, osim ako molekularnom metodom nije određeno da su slabi D tip 1, 2 i 3 kada se i kao primatelji proglašavaju RhD pozitivnima.

4.4. Molekularne metode

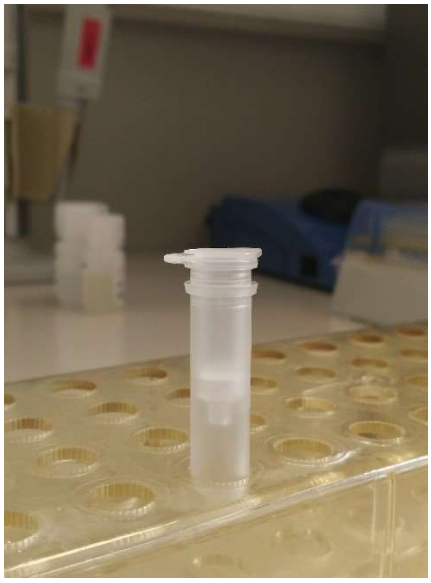
4.4.1. Automatizirana izolacija nukleinskih kiselina

DNA visokog stupnja čistoće je izolirana iz mješavine pune krvi darivatelja na QIAcube uređaju (Qiagen, Njemačka). Od svakog uzorka DDK je uzet po 1mL krvi te je

volumen mješavine od 20 DDK iznosio 20 mL (V1). Volumen svakog uzorka (V2), točnije mješavine od 20 DDK koju smo uzimali u izolaciju je 200 µL. QIAcube uređaj (Slika 6a) je robotska radna stanica za automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina na kolonama sa silika gel membranom (Slika 6b), iz širokog spektra materijala (puna krv, trombocitno-leukocitni međusloj, plazma, serum, kultura stanica, kultura tkiva). Izolacija se provodila standardnim QIAGEN kitovima za izolaciju nukleinske kiseline prema protokolima proizvođača. U našem protokolu korišten je QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Njemačka). Moguće je izolirati najmanje dva, a najviše dvanaest uzoraka u isto vrijeme. Početni volumen uzorka je bio 200 µL, a elucijski volumen genomske DNA također 200 µL.

Prije samog početka izolacije uređaj bi proveo inicijalizacijski test, a zatim se postavio nosač s reagensima (lizirajući pufer, puferi za ispiranje, apsolutni etanol i puferi za eluciju) te napunili nosači s nastavcima s filterom od 1000 µL i 200 µL. Na odgovarajuće pozicije umetnula se QIAGEN proteaza u epruveti od 1,5 ml, kolona sa silika-gel membranom i epruveta za eluciju. Tako pripremljeni adapter stavio se u centrifugu. Uzorci u epruvetama od 2mL su umetnuti u inkubator s miješalicom. Uz svaki uzorak umetnuo se gumeni čep koji označava poziciju uzorka i njihov broj. Princip izolacije se temelji na lizi membrane stanice i oslobađanju nukleinske kiseline, zatim na adsorpciji DNA na QIAamp silika gel membranu QIAamp spin kolone te ispiranju s membrane. Na ekranu uređaja bi odabrali protokol izolacije ovisno o kitu koji se koristi i materijalu iz kojeg vršimo izolaciju. Prilikom izolacije na ekranu su bile prikazane sve faze izolacije: liziranje, inkubacija, vezanje, ispiranje i elucija. Postupkom izolacije uklanjaju se proteini i inhibirajuće tvari koje nisu nukleinske kiseline te mogu ometati polimeraznu lančanu reakciju. DNA koja se vezala na membranu se pročišćavala ispiranjem pomoću dva različita pufera za ispiranje (AW1 i AW2) te se eluirala s membrane puferom za ispiranje (AE pufer). Nakon toga se izolirana DNA umnožila PCR reakcijom. Pomoću QIAamp DNA Blood Mini Kita se može izolirati oko 6 µg DNA iz 200 µL pune krvi. Automatizirana izolacija DNA za 12 uzoraka trajala je 90 min.





Slika 6. a) QIACube uređaj za izolaciju DNA b) prikaz silika-gel kolone (slikano u HZTM)

4.4.2. *RHD* probir pomoću real-time PCR metode

DNA uzorke RhD negativnih DDK testirali smo na prisustvo gena *RHD* u mješavini od 20 uzoraka, koristeći uređaj 7500 Real-time system (Applied Biosystems, SAD) i umnožavajući egzone 7 i 10 pomoću lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (engl. *real-time PCR*). Potonji se primjenjuje za umnožavanje i simultanu detekciju ili kvantifikaciju ciljane molekule DNA. Postupak je inačica klasičnog PCR-a, a ključno obilježje je što se umnožena DNA otkriva kako reakcija napreduje, u "realnom vremenu" praćenjem intenziteta emisije fluorescentne aktivnosti. Intenzitet emitirane fluorescencije nastale umnožavanjem proporcionalan je količini PCR produkta. Ovo je noviji pristup u odnosu na standardni PCR gdje se detektira proizvod PCR reakcije metodom završne točke. Real-time TaqMan tehnologija koristi dvostruko označenu fluorescentnu probu (segment jednolančane DNA) s emitirajućom bojom („reporter“ bojom) i prigušivačem („quencher“ bojom). Kada je proba intaktna fluorescencija reporter boje je onemogućena blizinom prigušivača. Tijekom umnažanja dolazi do hibridizacije probe za komplementarnu ciljnu sekvencu te njene razgradnje kao

posljedice 5`-3` nukleazne aktivnosti Taq DNA polimeraze. Pri tome dolazi do oslobađanja i odvajanja emitirajuće boje od prigušivača i povećanja njene fluorescentne aktivnosti. Signal fluorescencije se normalizira usklađivanjem emisije intenziteta emitirajuće boje s emisijom referentne boje koja je uključena u reakcijsku smjesu. Taj proces se ponavlja u svakom ciklusu i ne utječe na eksponencijalnu akumulaciju produkta. Intenzitet fluorescencije emitirajuće boje se povećava iz ciklusa u ciklus, razmjerno s povećanjem količine umnoženog produkta. Amplifikacijska krivulja grafički prikazuje povezanost signala fluorescencije i broja ciklusa umnožavanja. Bazičnu liniju amplifikacijske krivulje čine početni ciklusi umnožavanja u kojima ne dolazi do velike promjene u signalu fluorescencije. Detekcija signala iznad bazične linije označava umnoženi produkt. *Treshold cycle* (Ct) vrijednost prikazuje broj ciklusa u kojem intenzitet fluorescencije prelazi intenzitet praga. Uređaj kontinuirano mjeri fluorescenciju u uzorcima, a softver te podatke analizira.

Prije postavljanja uzoraka u aparat u kabinetu s laminarnim protokom zraka istovremeno su pripremljene 2 PCR-mješavine (za *RHD* egzon 7 i egzon 10) koje se sastoje od Univerzalnog master mixa, primera R (engl. *reverse*) i F (engl. *forward*), probe i bidestilirane vode. Kao dio procesne kontrole u seriji uzoraka rađene su po jedna negativna i jedna pozitivna kontrola za *RHD* egzon 7 i *RHD* egzon 10. Ukupni volumen reakcijske smjese je iznosio 25 µL (20 µL PCR mješavine i 5 µL uzorka genomske DNA). U epruvete od 0,2 mL je otpipetirano po 20 µL PCR mješavine (Tablica 1, 2), a zatim je dodano po 5 µL kalupa DNA, a u negativnu kontrolu je dodano po 5 µL destilirane vode te 5 µL pozitivne kontrole. Epruvete su zatim stavljene u RT-PCR uređaj (Slika 7.), izabrani su uvjeti reakcije i započeto je umnožavanje.

Tablica 1. PCR reakcijska smjesa za *RHD* egzon 7

2x Univerzalni master mix	12,5 µL
Primer F konc. 300 nM	1 µL
Primer R konc. 300 nM	1 µL
Proba konc 200 nM	0,5 µL
H_20	5 µL

Tablica 2. PCR reakcijska smjesa za *RHD* egzon 10

2x Univerzalni master mix	12,5 µL
Primer F konc. 200 nM	0,7 µL
Primer R konc. 200 nM	0,7 µL
Proba konc. 100 nM	0,25 µL
H_20	5,85 µL

Ako je pojedina mješavina bila pozitivna u testu *RHD* probira, raščlanila bi se na manje mješavine kako bi se utvrdilo koji je uzorak bio pozitivan. Slijedeća faza raščlanjivanja bila je izrada 4 mješavine po 5 uzoraka koji su ponovno testirani. Nakon utvrđivanja pozitivne mješavine pristupili smo pojedinačnoj izolaciji svakog uzorka te utvrdili koji je od njih pozitivan. Daljnji korak je uključivao genotipizaciju zbog definiranja alela *RHD*.



Slika 7. Uređaj 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) za *RHD* probir (slikano u HZTM)

4.4.3. *RHD* genotipizacija pomoću PCR-SSP metode (engl. *polymerase chain reaction with sequence-specific primer)*

Svim DDK sa slabijom serološkom ekspresijom D antigena i uzorcima izabranim nakon pozitivnog rezultata dobivenog *RHD* probirom radili smo *RHD* genotipizaciju, koristeći lančanu reakciju polimerazom sa specifičnim početnicama za sekvencu (PCR-SSP) pomoću komercijalnih kitova Ready Gene D weak, Ready Gene CDE, Ready Gene DAddOn i Ready Gene ZygoFast (Inno-Train, Njemačka) prema uputama proizvođača na uređajima AB PCR 2720 i 2700, 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, SAD). PCR-SSP metoda ili alel-specifični PCR je metoda umnožavanja DNA koja koristi više parova početnica koje su specifične za umnožavanje pojedinog alela tj. dijela sekvence u kojoj se nalazi promjena u genomu koju želimo analizirati, elektroforeze i vizualne interpretacije rezultata.

Prije početka reakcije u kabinetu s laminarnim protokom zraka pripremila se PCR reakcijska smjesa (komercijalni master mix, Taq DNA polimeraza, bidestilirana voda i uzorak genomske DNA) prema određenim protokolima ovisno o kitu kojeg smo koristili (Tablica 3-6). Otpipetirali smo PCR reakcijsku smjesu u svaku jažicu PCR pločice u kojoj se već nalazi odgovarajući set predpipetiranih liofiliziranih alel-specifičnih početnica.

Tablica 3. PCR reakcijska smjesa za RBC-Ready Gene CDE

Red PCR (komercijalni master mix)	52,5 µL
Taq DNA polimeraza	1,5 µL
Bidestilirana voda	118,0 µL
DNA	8,0 µL

Tablica 4 . PCR reakcijska smjesa za RBC-Ready Gene D weak

Red PCR (komercijalni master mix)	42,8 µL
Taq DNA polimeraza	1,2 µL
Bidestilirana voda	98,0 µL
DNA	8,0 µ

Tablica 5. PCR reakcijska smjesa za RBC-Ready Gene DAddOn kit

Red PCR (komercijalni master mix)	32,1 µL
Taq DNA polimeraza	0,9 µL
Bidestilirana voda	73,0 µL
DNA	4,0 µL

Tablica 6. PCR reakcijska smjesa za RBC-Ready Gene Zygofast kit

Red PCR (komercijalni master mix)	16,0 µL
Taq DNA polimeraza	0,5 µL
Bidestilirana voda	34,5 µL
DNA	4,0 µL

Pločica se smjestila u PCR uređaj (Slika 8.) te se izabrao program za umnažanje. Po završetku reakcije, provjera PCR produkata se vršila pomoću elektroforeze, tako da se cjelokupni umnoženi sadržaj otpipetirao u pojedinu jažicu na 1,5% agaroznom gelu u 0,5 x TBE puferu ili gotovom Clearose BC gelu (Al-Diagnostic GmbH, Austrija). Nakon što su se uzorci nanjeli na gel, kadica se priključila na istosmjernu struju uz napon 60-100 V. Umnoženi PCR produkti su se razdvojili pod utjecajem istosmjerne električne struje. To su DNA sekvence određene veličine (pb) koje putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi. Veličina umnoženog PCR produkta tj. njegova specifičnost se uspoređivala s vrpcama molekularnog biljega koji je putovao pod istim uvjetima. Različite veličine

DNA sekvenci putuju različitom brzinom pa kraći fragmenti putuju duže, a duži fragmenti putuju kraće. Nakon završene elektroforeze agarozni gel s etidij bromidom se obasjao UV svijetlom valne duljine 254 nm. Etidij bromid je supstanca koja se umrežava između lanaca DNA i emitira svjetlost koja postane vidljiva obasjana UV-om. Pri tome se specifični umnoženi ulomci DNA vide kao svijetle vrpce, koje se dokumentiraju pomoću fotografiranja kamerom.



Slika 8. Uređaji AB PCR 2720 i 2700, thermal cycler (Aplied Biosystems, SAD) za PCR-SSP genotipizaciju (slikano u HZTM)

U svakoj SSP reakciji istodobno je napravljena amplifikacija ulomka gena za humani hormon rasta (engl. *Human growth hormon - HGH*) kao interna pozitivna kontrola, kako bi se potvrdila prisutnost DNA u reakcijskoj smjesi. Interna kontrola se od svih specifičnih reakcija razlikuje po veličini fragmenta, te je tako moguće na gelu agaroze napraviti potpunu distinkciju signala.

Za određivanje pojedine D varijante komercijalni kitovi RBC-Ready Gene CDE i RBC-Ready Gene D weak se mogu koristiti pojedinačno ili u kombinaciji. Koristeći RBC-Ready Gene D weak kit moguće je jasno odrediti najučestalije slabe D varijante (tip 1, 2, 3, 4.0, 4.1, 4.2, 5, 14, 11, 15, 17, 20, 31, 38), dok kit RBC-Ready Gene CDE

može precizno odrediti alele parcijalnog D, hibrida i C,c,E,e i C^w. RBC-Ready Gene Zygo Fast kit može se koristiti kao „brzi test“ za predviđanje zigotnosti. Uz samo 4 reakcije može analizirati je li uzorak "DD", "Dd" ili "dd". Potpuna delecija *RHD-a* dovodi do spajanja dva *Rhesus box-a* (koja omeđuju *RHD* sa svake strane) i stvaranja takozvanog *Hybrid box*-a, čija detekcija služi za određivanje zigotnosti. Amplifikacijom sekvenci uzvodnog *Rhesus box-a* potvrđuje se prisutnost gena *RHD*. RBC-Ready Gene D AddOn kit otkriva dodatne *RHD* sekvence i D-negativne alele, koji nisu uzrokovani delecijom cijelog gena *RHD*, npr. DEL-a, RHDpsi (RHD*08N.01), RHD-Cde-s (RHD*03N.01), D-CE (2-9) -D (RHD*01N.04) ili RHD W16x (RHD*01.N.08).

Interpretacija nalaza za genotipizaciju vršila se usporedbom snimke umnoženih produkata na gelu s odgovarajućim tablicama priloženim u komercijalnim kitovima (Slika 9-12). Pozitivan znak (+) u pojedinačnom polju interpretacijskih tablica znači prisutnost, a negativan znak (-) odsutnost DNA fragmenta. Amplikoni interne kontrole moraju biti vidljivi u svakom uzorku. Evaluacija je započela unošenjem pozicija naših specifičnih umnoženih PCR produkata u obliku vrpce određene veličine (pb) u *Radnu listu* te usporedbom našeg obrasca s odgovarajućim obrascem PCR produkata u priloženim tablicama. Kada nađemo pozicije na kojima se vrpce sa snimke i tablice podudaraju očita se alel *RHD* u krajnjem lijevom stupcu tablice.

U slučajevima kada nismo mogli definirati alele *RHD* navedenim kitovima, uzorci su poslani na sekvenciranje egzona 1-10 gena *RHD* u vanjski referentni laboratorij.

RBC-Ready Gene D weak

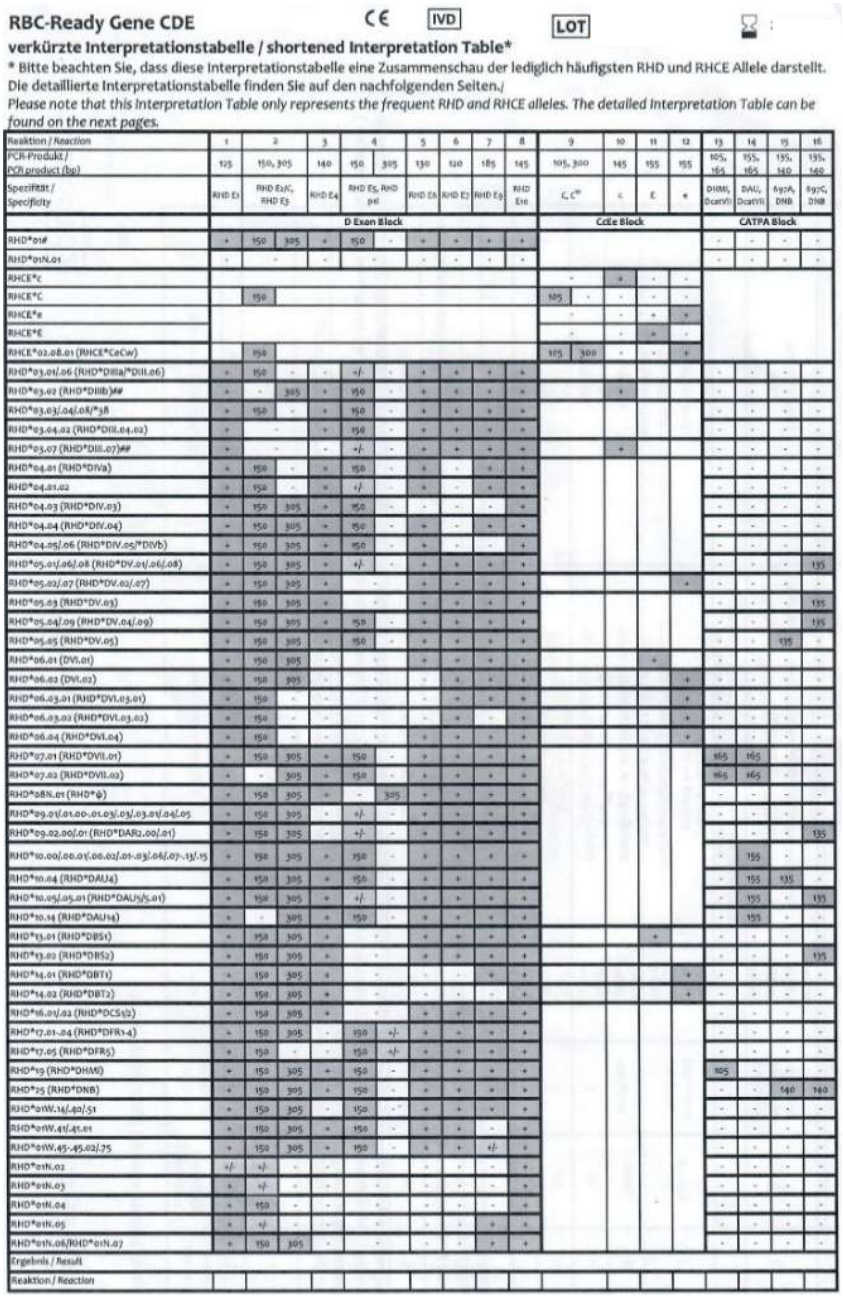
Protocol for Documentation

IVD CE LOT S9WP016

Date:

Reaction No.	1	2#	3*	4	5	6	7	8
PCR Product (size in bp)	248 151	126	166	138	112	175 98	221§ 125	221 136
Specificity(SNP) **ISBT Allele name** [common name]	52C>G 809T>G	1154G>C	8C>G	602C>G (514A)	446C>A	819G>A 885G>T	340C>T 957G>A 1025T>C	340C>T 845G>A
*RHD*01W.1 (RHD*weak D type 1)*	+ (151 bp)	-	-	-	-	-	-	-
*RHD*01W.1.1 (RHD*weak D type 1.1)*	+ (248 bp) + (151 bp)	-	-	-	-	-	-	-
*RHD*01W.2 (RHD*weak D type 2)* *RHD*01W.2.1 (RHD*weak D type 2.1)*	-	+	-	-	-	-	-	-
*RHD*01W.3 (RHD*weak D type 3)*	-	-	+	-	-	-	-	-
*RHD*03.07 (RHD*DIII.07)* *RHD*09.01.00 (RHD*DAR1.00)* [weak D 4.2] *RHD*09.01.03 (RHD*DAR1.03)* [weak D 4.2.3] *RHD*09.03 (RHD*DAR3)* [weak D 4.0.1] *RHD*01W.14 (RHD*weak D type 14)* *RHD*01W.40 (RHD*weak D type 40)* *RHD*01W.51 (RHD*weak D type 51)*	-	-	-	+	-	-	-	-
*RHD*03.01 (RHD*DIIIa)* *RHD*03.06 (RHD*DIII.06)* *RHD*09.03.01 (RHD*DAR3.01)* [weak D 4.0] *RHD*09.04 (RHD*DAR4)* [weak D 4.1] *RHD*09.05 (RHD*DAR5)* [weak D 4.3]	-	-	-	+	-	+ (175 bp)	-	-
*RHD*09.01.01 (RHD*DAR1.01)* [weak D 4.2.1] *RHD*09.01.02 (RHD*DAR1.02)* [weak D 4.2.2] *RHD*09.02.00 (RHD*DAR2.00)* [DAR2/DARE] *RHD*09.02.01 (RHD*DAR2.01)* [DAR2.1]	-	-	-	+	-	-	+ (125 bp)	-
*RHD*01W.5 (RHD*weak D type 5)*	-	-	-	-	+	-	-	-
*RHD*11 (RHD*weak partial 11)*	-	-	-	-	-	+ (98 bp)	-	-
*RHD*15 (RHD*weak partial 15)*	-	-	-	-	-	-	-	+ (136 bp)
*RHD*01W.17 (RHD*weak D type 17)*	-	-	-	-	-	-	+ (221 bp)	+ (221 bp)
*RHD*01W.29 (RHD*weak D type 29)*	-	-	-	-	-	-	+ (125 bp)	
Result:								

Slika 9. Primjeri tablice za interpretaciju rezultata *RHD* genotipizacije RBC Ready Gene D weak (preuzeto od Inno-train, Njemačka)



RBC-Ready Gene CDE CE IVD LOT

verkürzte Interpretationstabelle / shortened Interpretation Table*

* Bitte beachten Sie, dass diese Interpretationstabelle eine Zusammenschau der lediglich häufigsten RHD und RHCE Allele darstellt. Die detaillierte Interpretationstabelle finden Sie auf den nachfolgenden Seiten./

Please note that this Interpretation Table only represents the frequent RHD and RHCE alleles. The detailed Interpretation Table can be found on the next pages.

Reaktion / Reaction	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
PCR-Produkt / PCR product (bp)	125	150, 305	140	150	305	130	120	185	145	105, 300	145	155	155	165	140	140
Spezifität / Specificity	RHD E1	RHD E2/C, RHD E3	RHD E4	RHD E5, RHD pxl		RHD E6	RHD E7	RHD E9	RHD E10	C, C^w	c	E	e	DHMI, DcatVII	DAU, DcatVIII	697A, DNB	697C, DNB
	D Exon Block								CcEe Block					CATPA Block			
RHD*01#	+	150	305	+	150	-	+	+	+	+					-	-	-	-
RHD*01N.01	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+					-	+	-	+
RHCE*c									-	+	-	-						
RHCE*C		150							105	-	-	-	-					
RHCE*e									-	-	+	+						
RHCE*E									-	-	+	-						
RHCE*02.08.01 (RHCE*CeCw)		150							105	300	+	-	+					
RHD*03.01/.06 (RHD*DIIIa/*DIII.06)	+	150	-	-	+/-	-	+	+	+	+					-	-	-	-
RHD*03.02 (RHD*DIIIb)##	+	-	305	+	150	-	+	+	+	+	+				-	-	-	-
RHD*03.03/.04/.08/*38	+	150	-	+	150	-	+	+	+	+					-	+	-	-
RHD*03.04.02 (RHD*DIII.04.02)	+	-	-	+	150	-	+	+	+	+					-	-	-	-
RHD*03.07 (RHD*DIII.07)##	+	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	+				-	-	-	-
RHD*04.01 (RHD*DIVa)	+	150	-	+	150	-	+	-	+	+					-	-	-	-
RHD*04.01.02	+	150	-	+	+/-	-	+	-	+	+					-	-	-	-
RHD*04.03 (RHD*DIV.03)	+	150	305	+	150	-	-	-	-	+					-	-	-	-
RHD*04.04 (RHD*DIV.04)	-	150	305	+	150	-	+	-	+	+					-	-	-	-
RHD*04.05/.06 (RHD*DIV.05/*DIVb)	+	150	305	+	150	-	+	-	-	+					-	-	-	-
RHD*05.01/.06/.08 (RHD*DV.01/.06/.08)	+	150	305	+	+/-	-	+	+	+	+					-	-	-	135
RHD*05.02/.07 (RHD*DV.02/.07)	+	150	305	+	-	-	+	-	+	+				+	-	-	-	-
RHD*05.03 (RHD*DV.03)	+	150	305	+	-	-	+	+	+	+					-	-	-	135
RHD*05.04/.09 (RHD*DV.04/.09)	+	150	305	+	150	-	+	+	+	+					-	-	-	135
RHD*05.05 (RHD*DV.05)	+	150	305	+	150	-	+	+	+	+					-	-	135	-
RHD*06.01 (DVI.01)	+	150	305	-	-	-	+	-	+	+			+		-	-	-	-
RHD*06.02 (DVI.02)	-	150	305	-	-	-	-	+	+	+				+	-	-	-	-
RHD*06.03.01 (RHD*DVI.03.01)	+	150	-	-	-	-	-	+	+	+				+	-	-	-	-
RHD*06.03.02 (RHD*DVI.03.02)	+	150	-	-	-	-	+	-	+					+	-	-	-	-
RHD*06.04 (RHD*DVI.04)	+	150	-	-	-	-	+	+	+	+				+	-	-	-	-
RHD*07.01 (RHD*DVII.01)	+	150	305	+	150	-	+	+	+	+					165	165	-	-
RHD*07.02 (RHD*DVII.02)	+	-	305	+	150	-	+	+	+	+					165	165	-	-
RHD*08N.01 (RHD*Φ)	-	150	305	+	-	305	+	+	+	+					-	-	-	-
RHD*09.01/.01.00-.01.03/.03.01/.04/.05	+	150	305	+	+/-	-	+	+	+	+					-	-	-	-
RHD*09.02.00/.01 (RHD*DAR2.00/.01)	+	150	305	-	+/-	-	+	+	+	+					-	-	-	135
RHD*10.00/.00.01/.00.02/.01-.03/.06/.07-.13/.15	+	150	305	+	150	-	+	+	+	+					-	155	-	-
RHD*10.04 (RHD*DAU4)	+	150	305	+	150	-	+	+	+	+					-	155	135	-
RHD*10.05/.05.01 (RHD*DAU5/5.01)	+	150	305	+	+/-	-	+	+	+	+					-	155	-	135
RHD*10.14 (RHD*DAU14)	+	-	305	+	150	-	+	+	+	+					-	155	-	-
RHD*13.01 (RHD*DBS1)	+	150	305	+	-	-	+	-	+	+			+		-	-	-	-
RHD*13.02 (RHD*DBS2)	+	150	305	+	-	-	+	+	+	+					-	-	-	135
RHD*14.01 (RHD*DBT1)	+	150	305	+	-	-	-	-	+	+				+	-	-	-	-
RHD*14.02 (RHD*DBT2)	+	150	305	+	-	-	-	-	-	+				+	-	-	-	-
RHD*16.01/.02 (RHD*DCS1/2)	-	150	305	+	-	-	+	+	+	+					-	-	-	-
RHD*17.01-.04 (RHD*DFR1-4)	-	150	305	-	150	+/-	+	+	+	+					-	-	-	-
RHD*17.05 (RHD*DFR5)	+	150	-	-	150	+/-	+	+	+	+					-	-	-	-
RHD*19 (RHD*DHMI)	+	150	305	+	150	-	+	+	+	+					105	-	-	-
RHD*25 (RHD*DNB)	+	150	305	+	150	-	+	+	+	+					-	-	140	140
RHD*01W.14/.40/.51	+	150	305	-	150	-	+	+	+	+					-	-	-	-
RHD*01W.41/.41.01	+	150	305	+	150	-	+	+	-	+					-	-	-	-
RHD*01W.45-.45.02/.75	+	150	305	+	150	-	+	+	+/-	+					-	-	-	-
RHD*01N.02	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	+						-	-	-	-
RHD*01N.03	+	+/-	-	-	-	-	+	-	+						-	-	-	-
RHD*01N.04	+	150	-	-	-	-	-	-	+						-	-	+	-
RHD*01N.05	+	+/-	-	-	-	-	-	+	+						-	-	-	-
RHD*01N.06/RHD*01N.07	+	150	305	-	-	-	-	+	+						-	-	-	-
Ergebnis / Result																		
Reaktion / Reaction																		

Slika 10. Primjeri tablice za interpretaciju rezultata *RHD* genotipizacije RBC Ready Gene CDE kit. Polja 1-8 predstavljaju PCR-SSP rezultate za *RHD* egzone, polja 9 do 12 za *RHCE* egzone, a 13-16 *RHD* alelne varijante (preuzeto od Inno-train, Njemačka)

RBC-Ready Gene DAddOn CE IVD LOT

Interpretationstabelle / *Interpretation Table*

Reaktion / *Reaction*	1	2	3	4	5	6	7	8
PCR-Produkt/ *PCR product* (bp)	230 125	280	360 145	200 150	200 130	1150 495 150	420	425
Spezifität / *Specificity*	W16X D-(3-9)-CE-D-203C	D-(2-9)-CE-D-i2+268A	Ccdes-1 RHD psi	M295I IVS3+1G>A	M295I K409K	CE-exon 4-5 D-exon 4-5 D-exon 10	i8-32T	i8-32C
SNP	48G>A (i2-26C) 203G>C	i2+268G>A	410C>T i3-37bp ins (602C)	885G>T 486+1G>A	885G>T 1227G>A	i4-653bp ins (654G) +105A	i8-32T (i9+271C)	i8-32C (i9+271C)
ISBT Allelname / *Allele name*	RHD*01N.08 RHD*01N.04	-	RHD*03N.01 RHD*08N.01 (RHD*Pseudogene)	RHD*11 (RHD*weak partial 11) RHD*01EL.08 (RHD*DEL8)	RHD*11 (RHD*weak partial 11) RHD*01EL.01 (RHD*DEL1)/ RHD*01EL.36 (RHD*DEL36)	* * *	*	*
ISBT Phänotyp / *Phenotype*	D- D-	D-	D- C+ D-	weak partial 11 or Del Del	weak partial 11 or Del Del	* * *	*	*
Ergebnis / Result								
Reaktion / Reaction								
RHD*01N.08	230	-	-	-	-	495/150	+	-
RHD*01N.04	230	-	-	-	-	495/150	-	+
D-(2-9)-CE-D-i2+268A	125	-	-	-	-	150	-	-
RHD*03N.01	-	+	-	-	-	150	-	-
RHD*11	-	-	360	-	-	150	+	-
RHD*01EL.08	-	-	360	-	-	150	-	+
RHD*01EL.01/RHD*01EL.36	-	-	-	200	200	495/150	+	-
RHD*08N.01, RHD*08N.01 or RHD*08N.01, RHD*01N.01	-	-	-	200	200	495/150	-	+
RHD*08N.01, RHD*01	-	-	-	150	-	495/150	+	-
RHD*01, RHD*01	-	-	-	150	-	495/150	-	+
RHD*01, RHD*01 or RHD*01, RHD*01N.01	-	-	-	-	130	495/150	+	-
RHD*01N.01, RHD*01N.01	-	-	-	-	130	495/150	-	+
	-	-	145	-	-	150	+	-
	-	-	145	-	-	150	-	+
	-	-	145	-	-	495/150	+	-
	-	-	145	-	-	495/150	-	+
	-	-	-	-	-	495/150	+	+
	-	-	-	-	-	495/150	+	-
	-	-	-	-	-	495/150	-	+
	-	-	-	-	-	1150	-	-

Slika 11. Primjeri tablice za interpretaciju rezultata *RHD* genotipizacije RBC Ready Gene DAddOn kit (preuzeto od Inno-train, Njemačka)

RBC-Ready Gene ZygoFast CE IV

Spezifitätentabelle / *Specificity Table*

Reaktion / *Reaction*	1	2	3	4
PCR-Produkt / *PCR product* (bp)	940	1525	935	1525
Spezifität / *Specificity*	Hybrid Box	Hybrid Box	Upstream Box	Upstream Box
ISBT Allelname / *Allele name*	RHD*01N.01	RHD*01N.01	RHD*01	RHD*01
ISBT Phänotyp / *Phenotype*	D-	D-	RH:1 (D)	RH:1 (D)
Ergebnisbeispiel / *Example for result*				
RHD*01N.01, RHD*01N.01 (dd)	+	+	-	-
RHD*01, RHD*01N.01 Dd	+	+	+	+
RHD*01, RHD*01 DD	-	-	+	+
Ergebnis / *Result*				

Slika 12. Primjeri tablice za interpretaciju rezultata *RHD* genotipizacije RBC Ready Gene ZygoFast kit (preuzeto od Inno-train, Njemačka)

4.4.4. DNA sekvenciranje

Uzorke koje nismo mogli odrediti PCR-SSP metodom poslali smo u referentni laboratorij za sekvenciranje, Institut za transfuzijsku medicinu, Bristol. Sekvenciranje je metoda koja omogućava određivanje redoslijeda (sekvence, niza) nukleotida molekule DNA. Metoda se još naziva i sekvenciranje prve generacije. Sangerova metoda sekvenciranja koristi prirodni tok replikacije kao uzorak za sekvenciranje, a metoda se temelji na prekidu sinteze novog lanca ugradnjom 2,3-dideoksi-nukleotid trifosfata (2´3´ddNTP), umjesto deoksinukleotida (dNTP) koji potom sprječavaju povezivanje daljnjih nukleotida. Za svaku bazu G,T,C, ili A postoji jedan odgovarajući 2´3´ddNTP. Pritom će se dobiti dijelovi lanaca (nizovi) različite dužine s odgovarajućim bazama koji će se razdvojiti gel elektroforezom. Ovaj gel ima vrlo veliku rezoluciju tako da je moguće odvojiti DNA nizove jedan od drugoga čak kad se oni razlikuju samo u jednom nukleotidu. Danas se koriste automatski sekvenceri kojima se određuju DNA sekvence uz računalne programe koji obrađuju dobivene podatke (90).

Reakcije sekvenciranja provedene su samo u uzorcima koji nisu u potpunosti karakterizirani PCR-SSP metodom kako bi se razlikovala i ispravno klasificirala specifičnost prisutnih alela *RHD*. *RHD* i *RHCE* egzon-specifično sekvenciranje izvedeno je uporabom *RHD*- i *RHCE*-specifičnih primera.

4.5. Reagensi korišteni u studiji

4.5.1. Reagensi za izolaciju genomske DNA

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Njemačka):
- AL pufer (lizirajući pufer)
- AW1 pufer i AW2 pufer (za ispiranje kolone)
- AE pufer (za eluiranje DNA s kolone)
- Proteinaza K

4.5.2. Reagensi za *RHD* probir

- Genomska DNA kao kalup
- Univerzalni master mix

- početnice za *RHD* egzon 7

  primer F – 5'—CTC CAT CAT GGG CTA CAA-3'

  primer R – 5'—CCG GCT CCG ACG GTA TC-3'

- početnice za *RHD* egzon 10

  primer F- 5'—CCT CTC ACT GTT GCC TGC ATT-3'

  primer R- 5'—AGT GCC TGC GCG AAC ATT- 3'

- TaqMan proba za egzon 7

  5'-(FAM) AGC AGC ACA ATG TAG ATG ATC TCT CCA (TAMRA)-3'

- TaqMan proba za egzon 10

  5'- (FAM) TAC GTG AGA AAC GCT CAT GACAGC AAA (TAMRA)-3'

- Bidestilirana voda

4.5.3. Reagensi za *RHD* genotipizaciju

- Komercijalni kitovi (PCR pločice s liofiliziranim primerima, primeri za HGH-pozitivna interna kontrola te master mix) - Ready Gene CDE, Ready Gene D weak, Ready Gene DAddOn, Ready Gene Zygofast

4.5.4. Reagensi za elektroforezu

- Agaroza ili pripremljeni gotovi Clearose BC gelovi (AL-Labortechnik, Austrija)
- 0,5 × TBE pufer
- etidij bromid 10 mg/mL
- pufer za nanošenje uzorka (loading buffer)

4.6. Statistička obrada podataka

Podaci su prikazani tablično i grafički. Kategorijski podaci su prikazani kroz apsolutne frekvencije i pripadajuće udjele te 95% intervale pouzdanosti.

Stupanj nesigurnosti seroloških metoda u otkrivanju slabog i/ili parcijalnog D antigena procijenjen je mjerama predikcije (pozitivna i negativna prediktivna vrijednost). Za usporedbu metoda koristili smo postotak dijagnostičke točnosti seroloških metoda. Temeljem izračunate učestalosti DEL-a kod darivatelja krvi i podataka o zastupljenosti RhD negativnih bolesnika procijenjen je rizik transfundiranja RhD negativnih bolesnika s DEL varijantama. Analizom arhivskih podataka o prethodnim donacijama DEL pozitivnih DDK i imunohematološkom ispitivanju primatelja pripravaka, istražili smo pojavnost RhD imunizacije primatelja krvi. Za usporedbu pojavnosti RhD aloimunizacije korišten je test razlike proporcija. Poissonov interval pouzdanosti od 95% (CI) za brojeve prikazane u Tablici 8. i 95% interval pouzdanosti (CI) za stopu incidencije u Tablici 9. izračunati su za *RHD* pozitivne nalaze i klinički značajne *RHD* pozitivne nalaze. Razlike u vrsti i učestalosti alela *RHD* koji uzrokuju D varijante u Hrvatskoj u odnosu na dostupne podatke iz europskih zemalja analizirane su hi kvadrat testom.

Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima.

U analizi je korištena programska podrška IBM SPSS Statistics verzija 25.0 (https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software).

5. REZULTATI

5.1. Socio-epidemiološke karakteristike ispitanika

Prvu skupinu ispitanika su činili RhD negativni DDK kojima smo radili *RHD* probir i genotipizaciju. Ukupan broj DDK u HZTM-u koji su darovali krv u razdoblju od 6 mjeseci je bio 34 063. RhD negativno je bilo 6 533 (19,20%), a 27 530 (80,80%) RhD pozitivno. Od toga je bilo ukupno 82,95% muškaraca i 17,05% žena. Darivatelji krvi su bili starosne dobi 18-65 godina. Distribucija krvnih grupa RhD negativnih ispitanika je bila sljedeća: 37,15% A krvna grupa, 36,78% O krvna grupa, 18,31% B i 7,76% AB krvna grupa.

Ukupan broj druge grupe ispitanika sa serološki potvrđenim slabim D antigenom je bio 263 (0,20%). Broj DDK koji je dao krv u razdoblju od tri godine kada smo prikupljali uzorke za određivanje slabog D antigena je bio 145 924. Od 263 ispitanika je bilo 60 ispitanika (22,80%) ženskog i 203 (77,20%) ispitanika muškog spola.

5.2. Rezultati *RHD* probira RhD negativnih DDK

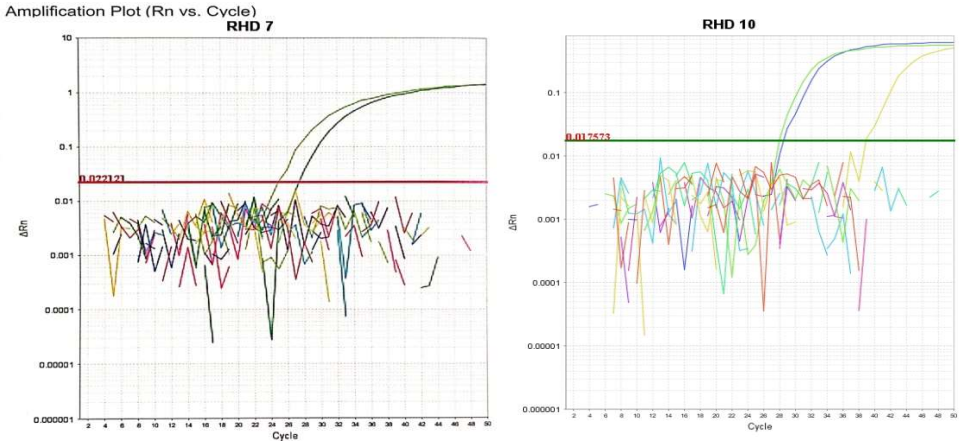
U istraživanju je prikupljeno 6533 uzorka prethodno testiranih serološki RhD negativnih DDK u HZTM-u. Svi ispitivani uzorci krvi bili su negativni u direktnom i indirektnom testu ispitivanja D antigena, te su upućeni na molekularnu obradu. Ukupno je izrađeno 326 mješavina po 20 uzoraka i 1 mješavina od 13 uzoraka za *RHD* probir metodom real-time PCR.

RHD probirom smo dobili 23/6533 (0,35%) PCR pozitivna uzorka (Tablica 7), od toga 20/23 (86,96%) muškaraca i 3/23 (13,04%) žene. Najveću učestalost među PCR pozitivnim ispitanicima imala je krvna grupa A (12 ispitanika), slijedi je krvna grupa O (8 ispitanika), potom krvna grupa B (3 ispitanika).

Tablica 7. Podudarnost serološkog probira D antigena s rezultatima molekularne dijagnostike

		RHD probir		Ukupno
		Negativna (*RHD*-)	Pozitivna (*RHD*+)	
Serološki probir	Negativan(D-)	6510	23	6533
	Pozitivan(D+)	0	0	0
Ukupno		6510	23	6533

Na slici 13. prikazan je ispis rezultata probira- amplifikacijske krivulje real-time PCR umnožavanja egzona 7 i egzona 10 gena *RHD*. Krivulja grafički prikazuje odnos signala fluorescencije i broja ciklusa umnožavanja. Bazičnu liniju amplifikacijske krivulje čine početni ciklusi umnožavanja u kojima ne dolazi do velike promjene u signalu fluorescencije. Signifikantni porast jačine signala iznad bazične linije označava umnoženi produkt.



Slika 13. Ispis rezultata 7500 Real-time PCR System uređaja umnožavanja egzona 7 i 10 gena *RHD*

5.2.1. Rezultati genotipizacije RhD negativnih DDK

Nakon *RHD* probira i testiranja pojedinačnih uzoraka pozitivne mješavine (prvo raščlanjena na 4 manje mješavine od 5 uzoraka, a potom do pojedinačnog uzorka), pristupili smo *RHD* genotipizaciji pozitivnih uzoraka kako bi definirali alel *RHD*. Nakon prikaza umnoženih ulomaka elektroforezom, rezultate smo očitavali pomoću tablica dobivenih u sklopu komercijalnih kitova Ready Gene (Inno-Train, Njemačka) opisanih i prikazanih u *Materijalima i metodama* (Slike 9-12). *RHD* genotipizacijom smo dobili sljedeće rezultate prikazane u Tablici 8. i 9. Relativne frekvencije i pripadajući 95% interval pouzdanosti su korišteni u procjeni učestalosti D varijanti.

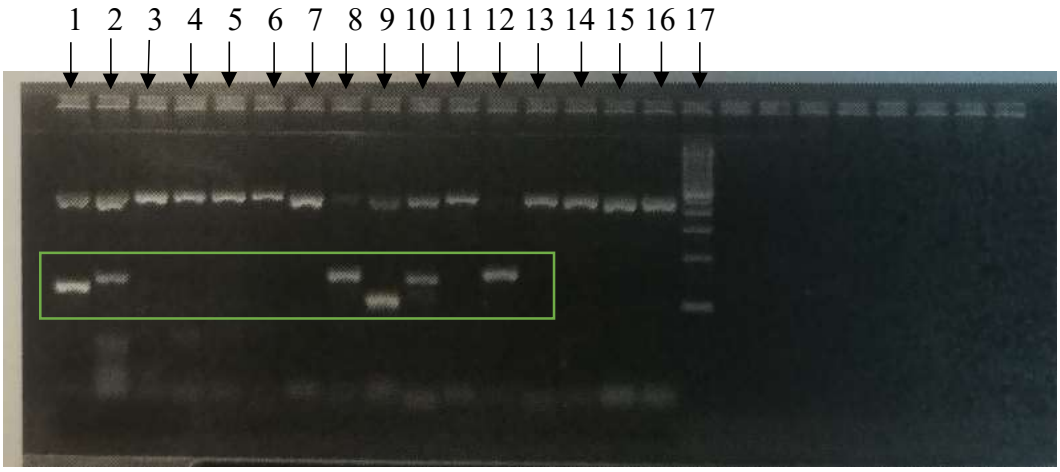
Tablica 8. Učestalost klinički značajnih alela *RHD* utvrđenih u **RhD-** DDK

ALEL	POLIMORFIZAM	N (%) (N=6533 RhD-)	95% CI
RHD*11	*RHD* (885G→T)	**4** (0,06)	1.09-10.24
RHD*01W.2	*RHD* (1154G→C)	**2** (0,03)	0.24-7.22
RHD* (1027delT)	*RHD* (1027delT)	**1** (0,01)	0.03-5.57
RHD*01W.28	*RHD* (1152A→C)	**1** (0,01)	0.03-5.57
RHD*01	/	**4** (0,06)	1.09-10.24
RHD*01N.03	*CE* egzon 2-9	**11** (0,17)	5.49-19.68
Ukupno		**23 (0,35)**	14.58-34.51
Klinički značajni aleli		**12 (0,18)**	6.20-20.96

Tablica 9. Učestalost i 95% CI pojedinih alela *RHD* u populaciji **RhD-, C/E +** DDK

ALEL	N (%) (N=640 D-, C/E+)	95% CI
RHD*11	0,63	1,35-9,47
RHD*01W.2	0,31	0,42-6,39
RHD* (1027delT)	1,16	0,11-4,66
RHD*01W.28	1,16	0,11-4,66
RHD*01	0,63	1,35-9,47
RHD*01N.03	1,72	5,87-18,91
Ukupno	**3,60**	15,07-33,61
Klinički značajni aleli	**1,88**	6,59-20,18

Alel *RHD*01N.03* (*RHD-CE* (2-9) *D-CE)* veliki hibrid utvrđen je u 11/23 (47,80%) DDK koji su bili pozitivni samo na egzon 10 u *RHD* probiru. Hibridni proteini nastaju konverzijom 2 gena, *RHD* i *RHCE,* i zamjene velikog segmenta *RHD*-a s genom *RHCE*, dovodeći do manjka ekspresije RhD proteina na membrani eritrocita. Najčešće se pojavljuje u sklopu CDe haplotipa (Slika 14).

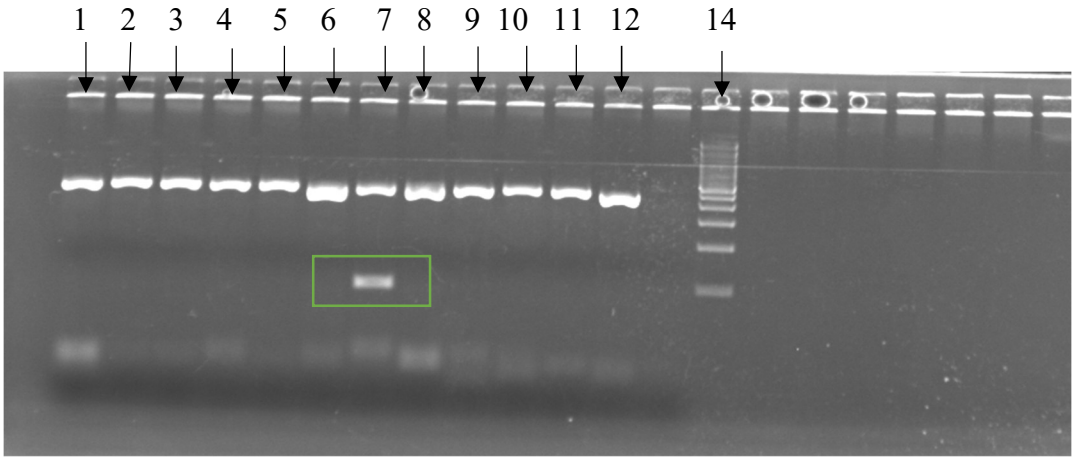


Slika 14. Elektroforeza umnoženih fragmenata (*RHD*01N.03*) pomoću kita Ready Gene CDE (Inno-Train, Njemačka). Linije: 1-125pb, 2-150pb, 8-145 pb, 9-

105pb, 10-145pb, 12-155pb. Linija 17-molekularni biljeg. Pozitivna interna kontrola 434 pb

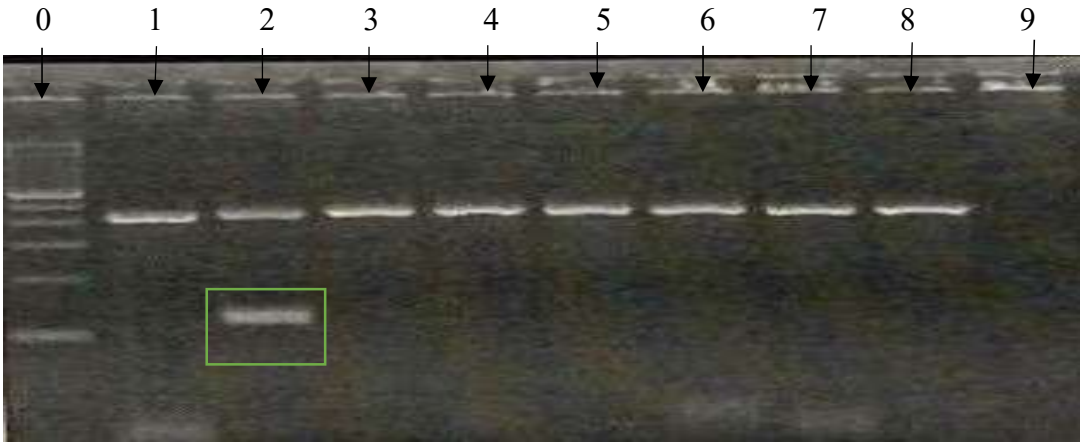
Veliki hibridi *RHD-CE* (2-9) *D-CE* su po ISBT nomenklaturi klasificirani kao RhD negativni, dakle klinički nisu značajni. Brojne su nukleotidne promjene karakteristične za taj alel, sve su opisane u online bazi podataka prisutnoj na rhesusbase.info.

Alel *RHD*11* (slabi D tip 11/DEL) je utvrđen u 4/23 (17,40%) DDK, a jedina mu je razlika u odnosu na normalni *RHD*, promjena nukleotida G→T na poziciji c.885, tj aminokiseline metionin u izoleucin, proteina na kodonu 295 (M295I) (Slika 15). *RHD*11* se javlja u dva haplotipa sa različitom fenotipskom ekspresijom. U CDe haplotipu gustoća antigena je manja pa je fenotipski DEL, dok je u cDe haplotipu gustoća antigena puno veća pa je fenotipski slabi D tip 11. Nositelji ovog DEL/slabog D mogu uzrokovati aloimunizaciju, te ih je potrebno klasificirati kao RhD pozitivne.



Slika 15. Elektroforeza umnoženih fragmenata (*RHD*11*) pomoću kita Ready Gene D weak (Inno-Train, Njemačka). Linije 7-100pb. Linija 14-molekularni biljeg

Alel *RHD*01W.2* (slabi D tip 2) utvrđen je u 2/23 (8,70%) DDK. Glavna promjena u odnosu na normalni *RHD* je zamjena nukleotida G→C na c.1154, tj. zamjena aminokiseline glicina u alanin proteina na kodonu 385. Fenotipski se klasificira kao slabi D i javlja se u sklopu cDE haplotipa (Slika 16).



Slika 16. Elektroforeza umnoženih fragmenata (*RHD*01W.2*) pomoću kita Ready Gene D weak (Inno-Train, Njemačka). Linije: 2-125 pb. Linija 0-molekularni biljeg. Pozitivna interna kontrola 434 pb

Ukupno 6 RhD negativnih, a *RHD* pozitivnih uzoraka je ostalo nedefinirano pa su poslani na daljnju obradu- DNA sekvenciranje u referentni europski laboratorij- International Blood Group Reference Laboratory (IBGRL) Red Cell Reference laboratory, Bristol.

U jednom uzorku je utvrđena nova mutacija, s promjenom u egzonu 7: *RHD* (1027delT) koja rezultira s prijevremenim stop kodonom na aminokiselinskoj poziciji 358 (M358*) proteina, dovodeći do sinteze "oštećenog" proteina koji je slabije izražen na membrani eritrocita i posljedično DEL fenotipa. Jedan uzorak je određen kao *RHD*01W.28* (slabi D tip 28) s poznatom nukleotidnom promjenom u egzonu 8 (1152A→C) što posljedično dovodi do modificiranog izrezivanja prekursorske mRNA (engl. *pre-mRNA*), promijenjenog sljepljivanja krajeva kodirajućih sekvenci te kvantitativno i/ili kvalitativno promjenjene zrele mRNA, što u konačnici utječe na protein koji se prepisuje.

Za preostala 4 uzorka nije pronađena nijedna mutacija u genu *RHD*, što ukazuje na normalan genotip *RHD*01* (normalan D).

U svrhu određivanja učinkovitosti serološkog testiranja koristili smo prediktivnu vrijednost testa. Pozitivna prediktivna vrijednost nije mogla biti izračunata jer kod serološkog probira nismo imali pozitivnih nalaza, dok je negativna prediktivna vrijednost iznosila 99,648 (95% CI: 99,648-99,648) što otkriva da 99,648% negativnih rezultata serološkog probira zaista nema D antigen. Postotak dijagnostičke točnosti seroloških metoda je 99,82% .

Samo kod 12 ispitanika koji su u serološkom testiranju RhD negativni, genotipizacijom je potvrđena RhD varijanta što je 0,18% od serološki D negativnih ispitanika (95% CI 0,095% - 0,321%). Razdioba spola i krvnih grupa kod molekularno dokazanih D varijanti nije pokazala odstupanje od razdiobe kod serološki RhD negativnih darivatelja krvi. Učestalost RhD varijanti je veća u populaciji muških DDK (86,9%) što odgovara učestalosti muškog spola u populaciji DDK u Hrvatskoj (HZTM neobjavljeni podaci). Varijante D antigena utvrđene *RHD* genotipizacijom kod serološki RhD negativnih DDK s najvećom učestalošću su dokazane kod osoba krvne grupe A (52,2%), zatim kod osoba krvne grupe O (34,8%) te krvne grupe B (13,0%). Svi PCR pozitivni uzorci u studiji su također bili C i/ili E-pozitivni (83,3% C+ i 16,7% E+). Rh fenotip je raspoređen na slijedeći način: CcDee je dokazan kod njih 18, ccDEe kod 2, CcDEe kod 3 ispitanika (Tablica 10).

Tablica 10. Razdioba Rh fenotipa kod molekularno utvrđenih D varijanti

ALEL	CcDee (%)	CcDEe (%)	ccDEe (%)
RHD 01N.03*	11 (61,1)	0 (0,0)	0 (0,0)
*RHD*11*	4 (22,2)	0 (0,0)	0 (0,0)
RHD 01W.2*	0 (0,0)	2 (66,7)	0 (0,0)
RHD 01W.28*	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)
*RHD*01*	3 (16,7)	1 (33,3)	0 (0,0)
*RHD** (1027delT)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)
Ukupno (%)	18 (100,0)	3 (100,0)	2 (100,0)

Za ukupno 12 od 23 uzorka (isključujući 11 uzoraka definiranih kao veliki hibridi), napravljena je adsorpcija/elucija s anti-D Novaclone, Immucor Gamma (stanične linije D175-2 i D415 1E4) koja je potvrdila kako je svih 12 uzoraka RhD pozitivno. Riječ je o DEL fenotipu koji je klinički značajan, a ne otkriva se indirektnom metodom ispitivanja D antigena već samo adsoprcijom i elucijom anti-D seruma (Tablica 11). Na taj je način potvrđeno postojanja D antigena na eritrocitima serološkim tehnikama. Učestalost klinički značajnih alela *RHD* je 0,18% u populaciji RhD negativnih DDK, odnosno 1,88% u skupini C / E + darivatelja. Svi su heterozigoti u testu zigotnosti *RHD*. U populaciji RhD negativnih DDK HZTM-a 0,18 % ima D antigen sa slabijom ekspresijom koji nisu prepoznati rutinskim serološkim testiranjem, a koji transfundirani RhD negativnim primateljima krvi mogu potaknuti stvaranje anti-D protutijela sa svojim aberantnim RhD proteinima. Nakon *RHD* probira i genotipizacije, nalaz krvne grupe je promijenjen iz D negativne u D pozitivnu kod svih DDK koji su imali klinički značajnu D varijantu, a DDK su obaviješteni o svom nalazu.

Tablica 11. Aleli *RHD* u populaciji RhD negativnih DDK vs. serološki rezultati

Aleli RHD (N)	IAT	Adsorpcija/Elucija
*RHD*11* (4)	neg	poz
*RHD*01W.2* (2)	neg	poz
*RHD*01W.28* (1)	neg	poz
*RHD*01N.03* (11)	neg	nr
RHD(1027delT)* (1)	neg	poz
*RHD*01* (4)	neg	poz

**nr-nije rađena adsorpcija/elucija*

U sklopu ove studije nismo aktivno pratili ishode transfuzija krvnih pripravaka RhD negativnih DDK kojima je molekularnom analizom dokazan D antigen, ali smo iz nacionalnog informatičkog sustava skupili podatke o njihovim donacijama koje su prethodile genotipizaciji. Podatke smo analizirali od 2011.g. od kada imamo informatički sustav eDelphyn. Analizirali smo dobivene podatke za 64 primatelja krvnih pripravaka. Četiri primatelja su bila RhD pozitivna, 2 koncentrata eritrocita (KE) su proglašena nesukladnima zbog isteka roka, te nisu utrošena, a za 18 KE nemamo podatak o IAT-u bolesnika nakon transfuzije (zbog smrti bolesnika ili nije ponavljano ispitivan u toj ustanovi). Za preostalih 40 KE, imamo podatke o IAT-u bolesnika prije i nakon transfuzije. Od 40 primatelja KE DEL fenotipa, jedan bolesnik (2,5%) je razvio RhD imunizaciju. Početni IAT bolesnika prije same transfuzije DEL pozitivnog KE je bio negativan. Bolesnik nije primio druge RhD pozitivne krvne pripravke. Mjesec dana nakon transfuzije navedenog pripravka, bolesnik je imao pozitivan IAT. Identifikacijom je u serumu dokazano antieritrocitno protutijelo iz Rh sustava krvnih grupa anti-D specifičnosti. Imunizaciju je izazvao krvni pripravak DDK-a koji je imao pozitivan *RHD* probir, ali je zbog nemogućnosti definiranja alela komercijalnim kitom u korištenju poslan na sekvenciranje gdje je definiran normalan *RHD*.

Adsorpcijom i elucijom je kod navedenog DDK dokazan DEL fenotip (Tablica 11).

Učestalost *RHD* pozitivnih i klinički značajnih alela u Hrvatskoj smo usporedili s učestalosti u drugim europskim državama, a kratki pregled je prezentiran u Tablicama 12, 13 i 14. Učestalost *RHD* pozitivnih alela u RhD negativnih DDK u našoj populaciji korelira s prijavljenom učestalošću nama bliskih europskih zemalja te se kreće između 0,2-0,5% (91).

Razlike u učestalosti *RHD* pozitivnih i klinički značajnih D alela među pojedinim zemljama prikazane su u Tablici 12, a značajnosti između razlika u učestalosti *RHD* pozitivnih u populaciji RhD negativnih DDK te klinički značajnih alela RHD u populaciji DDK u Tablicama 13. i 14.

Tablica 12. Razlike u učestalosti *RHD* pozitivnih i klinički značajnih D alela među pojedinim zemljama

Zemlja	Broj RhD neg DDK	*RHD* pozitivni	*RHD* + postotak učestalosti (%)	95% CI *RHD*+	Klinički značajni *RHD*+	Klinički značajni *RHD*+ (%)	95% CI klinički značajni *RHD*+
Njemačka[66]	46133	96	0,208	0,169-0,254	47	0,102	0,075-0,135
Austrija[116]	23330	94	0,403	0,326-0,493	74	0,317	0,249-0,398
Švicarska[114]	25370	120	0,473	0,392-0,566	37	0,146	0,103-0,201
Hrvatska	6533	23	0,352	0,229-0,518	12	0,184	0,100-0,310

Tablica 13. Usporedba učestalosti *RHD* pozitivnih u populaciji RhD negativnih DDK DDK iz Hrvatske u odnosu na 3 europske države

Zemlja	Razlika (%)	95% CI za razliku	χ^2	DF	P
Hrvatska *vs*.Njemačka[66]	0,14	0,018 - 0,324	5,266	1	0,022
Hrvatska *vs*.Austrija[116]	-0,05	-0,139 - 0,199	0,340	1	0,560
Hrvatska *vs*.Švicarska[114]	-0,12	-0,071 - 0,270	1,705	1	0,192

Tablica 14. Usporedba učestalosti klinički značajnih alel *RHD* u populaciji DDK iz Hrvatske u odnosu na 3 europske države

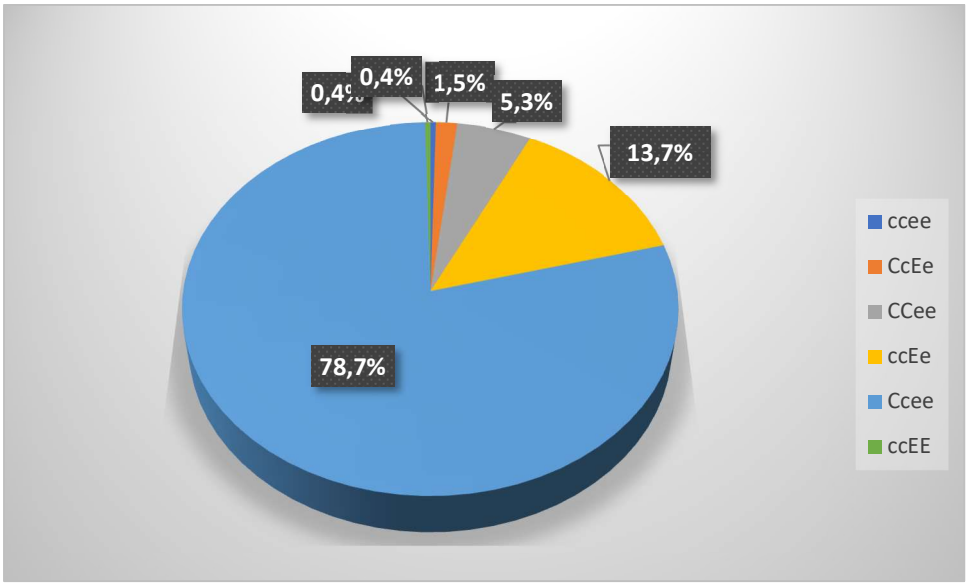
Zemlja	Razlika (%)	95% CI za razliku	χ^2	DF	P
Hrvatska *vs*.Njemačka[66]	0,082	-0,004 - 0,221	3,410	1	0,065
Hrvatska *vs*.Austrija[116]	0,133	-0,018 - 0,245	3,160	1	0,075
Hrvatska *vs*.Švicarska[114]	0,038	-0,058 - 0,181	0,481	1	0,488

Slične su učestalosti klinički značajnih alela u navedenim populacijama, s time da učestalost klinički značajnih alela u Austriji pokazuje nešto veće vrijednosti.

Značajna razlika je zabilježena u učestalosti *RHD* pozitivnih u populaciji RhD negativnih DDK između Hrvatske (0,352%; 95% CI:0,229%-0,518%) i Njemačke (0,208%; 95% CI:0,169%-0,254%) gdje je Hrvatska imala značajno veću učestalost za 0,14% uz 95% CI 0,018% - 0,324% te P=0,022. Ostale razlike u učestalostima nisu bile statistički značajne. Također nije bila značajna razlika u učestalosti klinički značajnih alela između pojedinih zemalja.

5.3. Rezultati *RHD* genotipizacije DDK kojima je serološki dokazan slabi D antigen

U istraživanju je sudjelovalo 263 DDK, kojima je serološki dokazan D antigen metodom u IAT-u, koje smo retestirali različitim monoklonskim reagensima i metodama. Cilj je bio utvrditi vrstu alela *RHD* koji uzrokuju serološki slabe D varijante i osjetljivost seroloških reagensa u detekciji D varijanti. Ukupan broj DDK u HZTM-u u razdoblju od 3 godine je bio 145 924, a udio DDK sa slabim D antigenom potvrđenim indirektnom metodom 263 (0,20%). Od 263 ispitanika je bilo 60 ispitanika (22,80%) ženskog i 203 (77,20%) ispitanika muškog spola. Zastupljenost Ccee fenotipa u populaciji DDK sa slabijom ekspresijom D antigena je bila 78,7%, ccEe 13,7%, CCee oko 5,3%, CcEe 1,5%, ccee 0,4% i ccEE 0,4% (Slika 17).

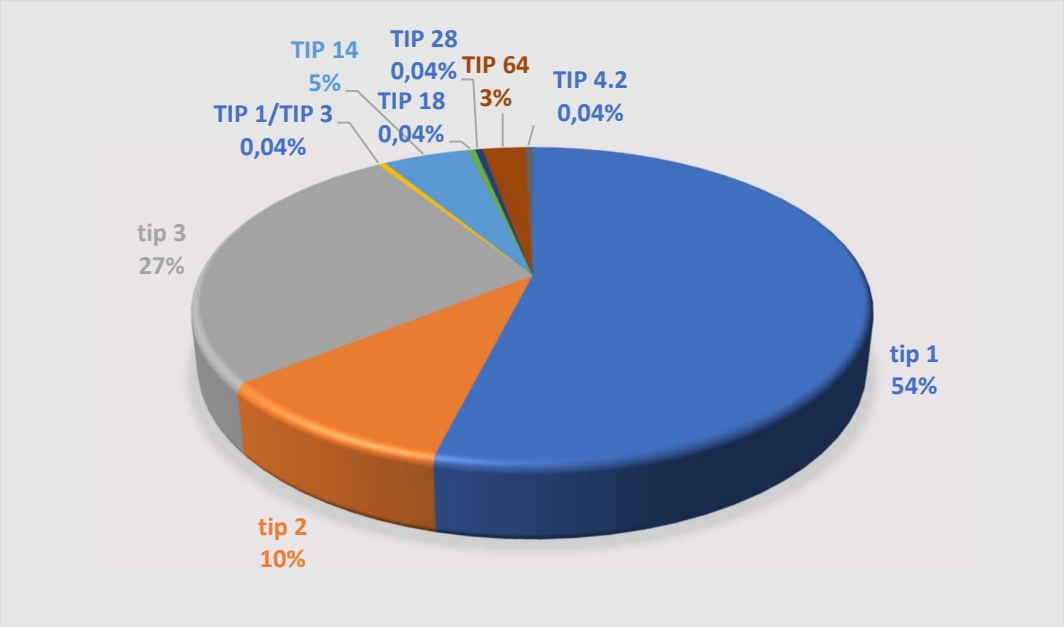


Slika 17. Zastupljenost pojedinih fenotipova u populaciji DDK sa slabijom ekspresijom D antigena

Od ukupnog broja testiranih DDK kod 243 (92,40%) je dokazana varijanta slabi D tip, dok je kod 20 (7,60%) dokazan parcijalni D tip (Tablica 15 i Slika 18).

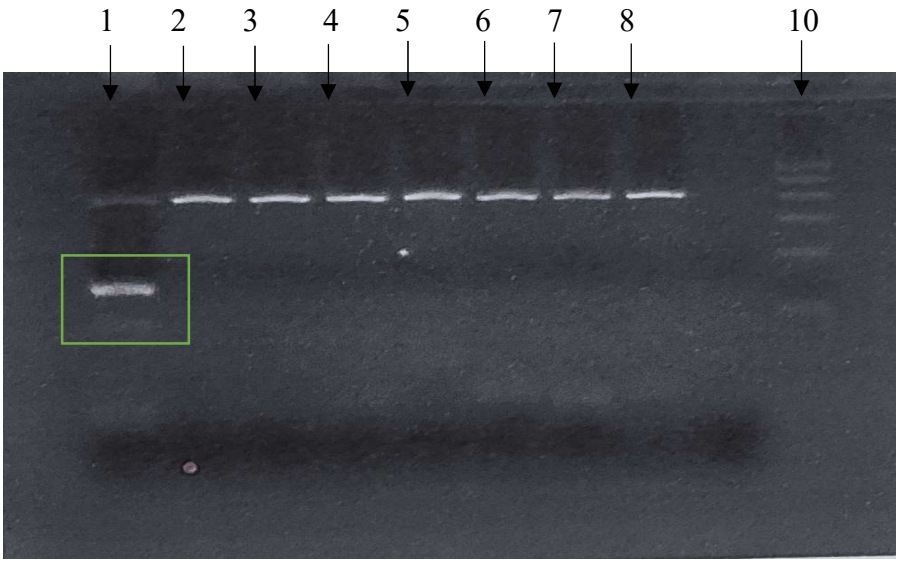
Tablica 15. Prikaz rezultata *RHD* genotipizacije DDK sa serološki slabijom ekspresijom D antigena

RHD varijanta	Broj (N)	Postotak (%)
Parcijalni D		
D kat VI	20	(7,60)
Slabi D		
tip 1	131	
tip 2	25	
tip 3	65	
tip 1/tip 3	1	
tip 14	12	
tip 18	1	
tip 28	1	
tip 64	6	
tip 4.2	1	
Slabi D ukupno	243	(92,40)
Ukupno *RHD* varijante	263	(100,00)

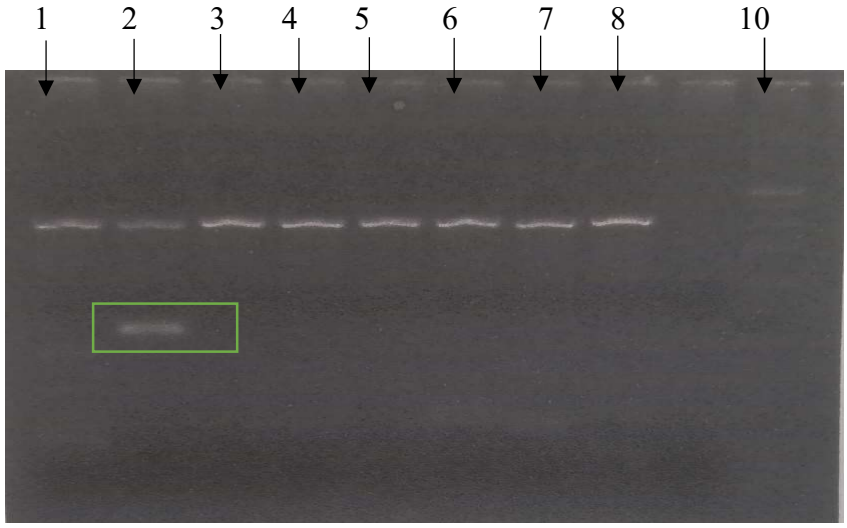


Slika 18. Udio pojedinih tipova slabih D varijanti (n-243)

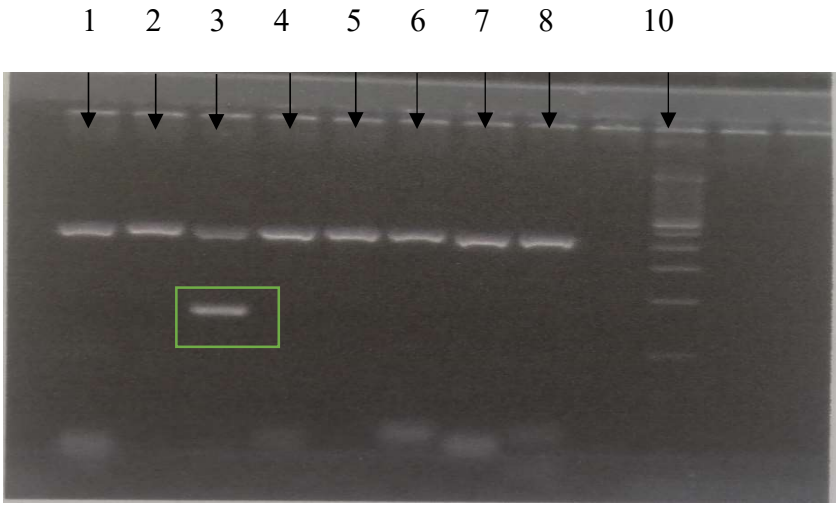
Slabi D tip 1 (*RHD*01W.1*) je određen kod 131 (49,81%) DDK, tip 3 (*RHD*01W.3*) kod 65 (24,71%), tip 2 (*RHD*01W.2*) kod 25 darivatelja (9,51%), tip 14 (*RHD*01W.14*) kod 12 (4,56%) i tip 64 (*RHD*01W.64*) kod 6 (2,28%) DDK (Slika 19-22). Kod preostalih DDK sa slabim D antigenom dokazan je slabi D tip 4.2, 28, 18 te heterozigotni slabi D tip 1/3.



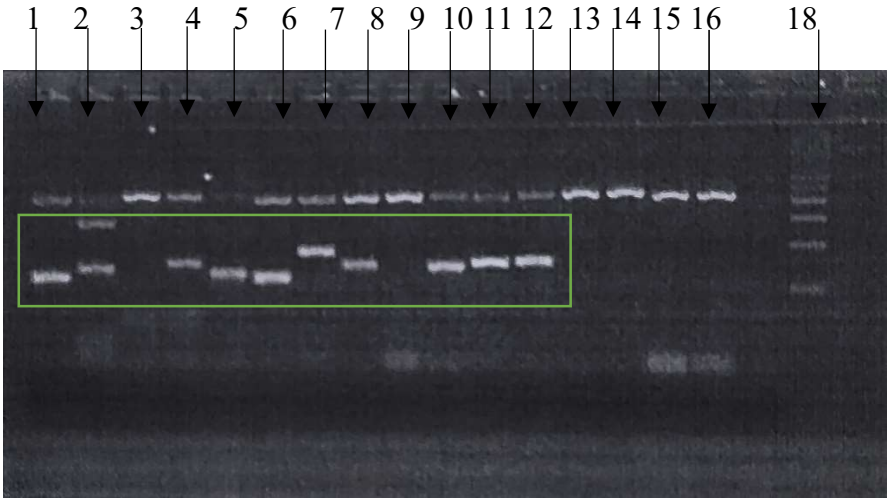
Slika 19. Elektroforeza umnoženih fragmenata (*RHD*01W.1*) pomoću kita Ready Gene D weak (Inno-Train, Njemačka). Linije: 1-151 pb. Linija 10-molekularni biljeg. Pozitivna interna kontrola 434 pb



Slika 20. Elektroforeza umnoženih fragmenata (*RHD*01W.2*) pomoću kita Ready Gene D weak (Inno-Train, Njemačka). Linije: 2-125 pb. Linija 10-molekularni biljeg. Pozitivna interna kontrola 434 pb

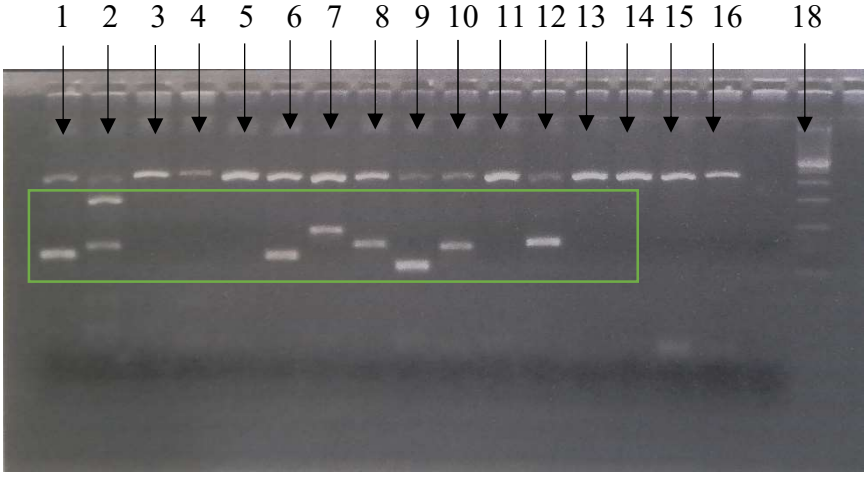


Slika 21. Elektroforeza umnoženih fragmenata (*RHD*01W.3*) pomoću kita RBC Ready Gene D weak (Inno-Train, Njemačka). Linije: 3-166 pb. Linija 10-molekularni biljeg. Pozitivna interna kontrola 434 pb



Slika 22. Elektroforeza umnoženih fragmenata (*RHD*01W.14*) pomoću kita RBC Ready Gene CDE (Inno-Train, Njemačka). Linije: 1-125 pb, 2-150pb, 305 pb, 4-150pb, 5-130pb, 6-120pb, 7-185pb, 8-145pb, 10-145pb, 11-155pb, 12-155pb. Linija 18-molekularni biljeg. Pozitivna interna kontrola 434 pb

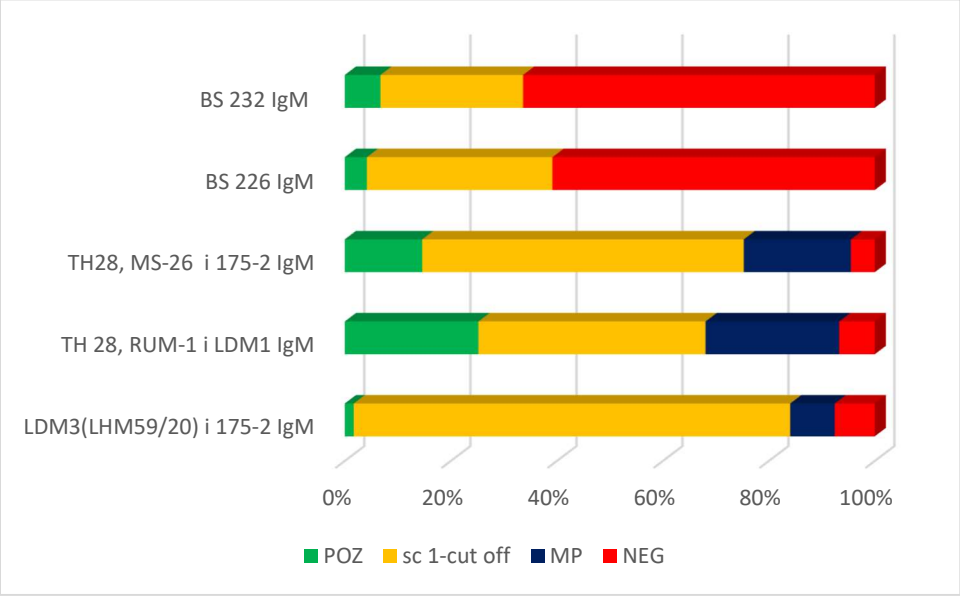
Od parcijalnih D antigena najzastupljenija varijanta je D kategorija VI tip 2 (RHD*06.02) (Slika 23.) koja je pronađena kod 15 ispitanika (5,70%), a slijede DVI tip 3 (RHD*06.03) kod 3 ispitanika i tip 1 (RHD*06.01) kod 2 ispitanika.



Slika 23. Elektroforeza umnoženih fragmenata (*RHD*06.02*) pomoću kita RBC Ready Gene CDE (Inno-Train, Njemačka). Linije: 1-125 pb, 2-150pb, 305 pb, 6-120pb, 7-185pb, 8-145pb, 9-105pb, 10-145pb, 12-155pb. Linija 18-molekularni biljeg. Pozitivna interna kontrola 434 pb

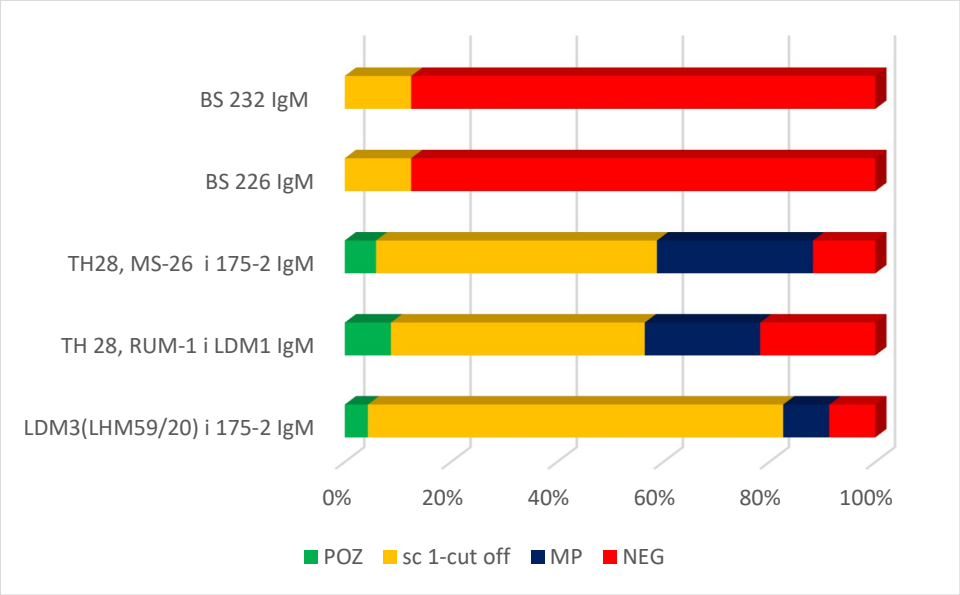
Oscilacije u jačini aglutinacije uočene su s eritrocitima DDK nositelja istih slabih alela *RHD*, kao i u DDK s parcijalnim alelima *RHD*. Osjetljivost pojedinih monoklonskih reagensa u detekciji slabih D varijanti je prikazana na Slikama 24-27. Slabi D tip 3 je dao najviše pozitivnih reakcija (score 10-12) s većinom monoklonskih reagensa (oko 60% pozitivnih reakcija sa svim monoklonskim regensima). Slabi D tip 2 je potvrdnim imunohematološkim ispitivanjima davao negativne rezultate ili jako slabu aglutinaciju (score 1 do cut-off), jer ga većina monoklonskih anti-D reagensa slabo ili uopće ne detektira. Najveći broj ispitivanih eritrocita DDK sa varijantom slabi D tip 1 je davao jačinu aglutinacije score 1 do cut-off s ispitivanim anti-D reagensima. Zajedničko svim slabim varijantama je da su davali do 20% reakcija miješanog polja (MP). Parcijalni D kategorija VI daju pozitivan rezultat s većinom korištenih monoklonskih reagensa u testiranju DDK, ali potvrdnim imunohematološkim ispitivanjima su dali negativne rezultate jer su se koristili reagensi koji ne detektiraju VI kategoriju. Najviše pozitivnih rekacija dao je anti-D stanične linije LDM3(LHM59/20) i 175-2 IgM (86,6%), a slijede anti-D stanične linije TH 28,RUM-1 i LDM1 IgM (84,5%) te TH28, MS-26 i 175-2 IgM (66,8%).

Slika 24. Jačina (score) seroloških imunohematoloških reakcija s monoklonskim reagensima -slabi D tip 1 (n-131)



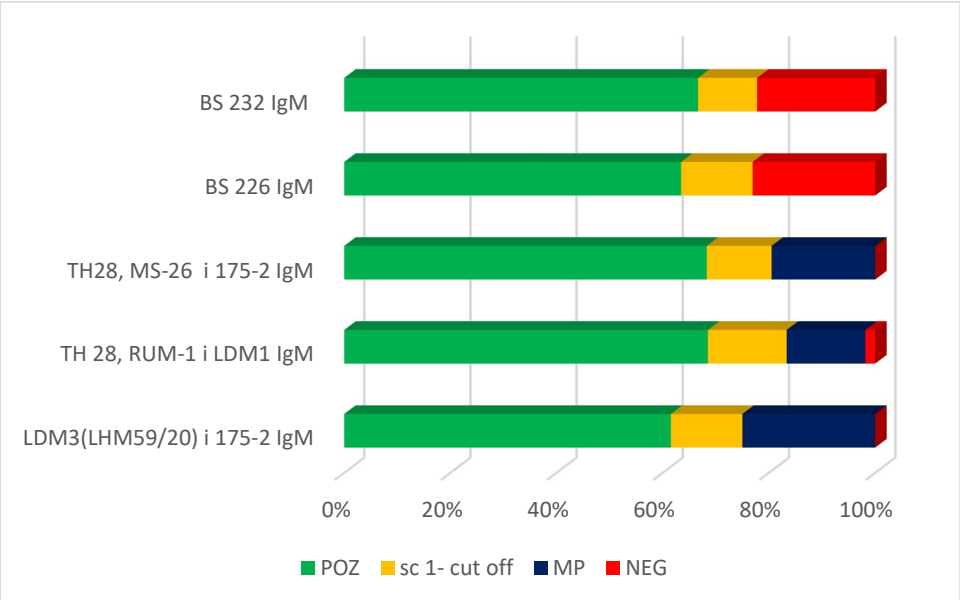
Pozitivan rezultat- score 10-12; slaba aglutinacija- score 1-cut off;
MP-miješana populacija; negativan rezultat-nema aglutinacije

Slika 25. Jačina (score) seroloških imunohematoloških reakcija s monoklonskim reagensima- slabi D tip 2 (n-25)



Pozitivan rezultat- score 10-12; slaba aglutinacija- score 1-cut off; MP-miješana populacija; negativan rezultat-nema aglutinacije

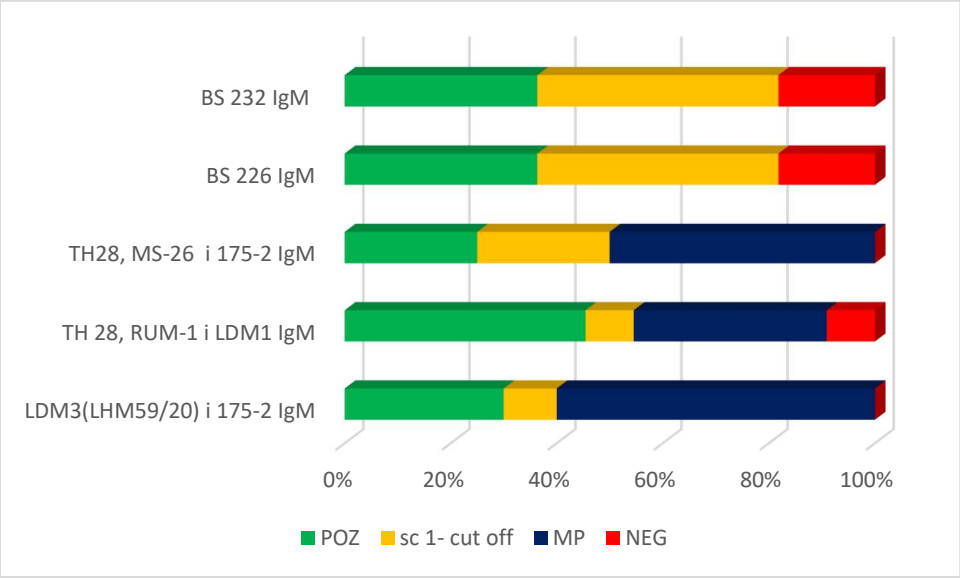
Slika 26. Jačina seroloških imunohematoloških reakcija s monoklonksim reagensima- slabi D tip 3 (n-65)



Pozitivan rezultat- score 10-12; slaba aglutinacija- score 1-cut off;

MP-miješana populacija; negativan rezultat-nema aglutinacije

Slika 27. Jačina seroloških imunohematoloških reakcija s monoklonskim regensima-slabi D tip 14 (n-14)



Pozitivan rezultat- score 10-12; slaba aglutinacija- score 1-cut off;
MP-miješana populacija; negativan rezultat-nema aglutinacije

6. RASPRAVA

Transfuzijsko liječenje krvnim pripravcima jedno je od najčešće primjenjivanih terapija u kliničkoj medicini, a određivanje D antigena sastavni je dio nalaza krvne grupe prema kojem se provodi transfuzijsko liječenje bolesnika, odnosno primjenjuje RhIg u trudnica.

Rh sustav krvnih grupa ima jedan od najpolimorfnijih genskih sustava kod ljudi i broji više od 50 različitih antigena, od kojih je 5 klinički najznačajnije u rutinskom radu: D, C, c, E i e. RhD dovodi do snažne indukcije imunog odgovora i stvaranja anti-D protutijela koja imaju ulogu u nastanku transfuzijskih reakcija i HBFN. Iskustva dokazuju kako i mala količina 0,1–1 mL RhD pozitivnog koncentrata eritrocita (KE) može inducirati nastanak anti-D aloprotutijela u RhD negativnih primatelja krvi (88, 93, 94).

Oko 0,2- 1% europske populacije ima promijenjene alele *RHD* čiji su proizvod slabi i parcijalni D antigeni (6, 55, 56). Izvješća o prevalenciji serološki slabih D fenotipova variraju ovisno o metodi (epruveta nasuprot automatizirani analizator), anti-D reagensu (polispecifični serum nasuprot monoklonskoj mješavini) i korištenju potencirajućih reagensa (bromelin) (95, 96).

Rh antigeni su produkt dva blisko povezana gena *RHD* i *RHCE*, a neposredna blizina ta dva gena omogućava izmjenu genskog materijala između dvaju gena i nastanak klinički značajnih varijanti koje se kategoriziraju kao slabi D, parcijalni D i DEL. Dokazano je da pojedine varijante mogu dovesti do aloimunizacije primatelja krvi (66). Zahvaljujući molekularnoj dijagnostici do sada je dokazano više od 275 različitih alela *RHD* koji dovode do promijenjene ekspresije D antigena (97). Postojanje mnogih alela RH rezultira različitim fenotipovima koji često otežavaju tipiranje krvi (98). Poznavanje ovih varijanti potrebno je kako bi transfuzija krvi bila sigurnija, posebno za pacijente koji zahtijevaju kronične transfuzije (99, 100).

Određivanje D antigena predstavlja stalni izazov u rutinskoj praksi. Novije britanske preporuke navode kako se određivanje D antigena mora izvesti korištenjem dva

nezavisna Rh testa kod novih DDK, te jednog testa kod višestrukih darivatelja koji se uspoređuje s podatkom o krvnoj grupi u kartonu DDK (101). Od iznimne je važnosti eritrocite darivatelja krvi koji mogu dovesti do aloimunizacije RhD negativnog pacijenta proglasiti RhD pozitivnima. Serološki imunohematološki testovi za određivanje D antigena teško mogu prepoznati D varijante sa slabo izraženim D antigenom zbog male količine antigena koji ispoljavaju, pa se često pogrešno klasificiraju kao RhD negativni što dovodi do neodgovarajuće transfuzijske terapije i moguće aloimunizacije RhD negativnog primatelja krvi. Određivanje D antigena se provodi po točno određenim algoritmima, a koji uključuju određivanje D antigena prilikom svake donacije krvi, korištenje dvije različite metode i barem dva različita monoklonska anti-D reagensa istog ili različitih proizvođača. Monoklonski reagensi imaju veću osjetljivost od ranije korištenih poliklonskih i u inicijalnom testiranju mnogi eritrociti koji imaju slabiju ekspresiju D antigena mogu biti klasificirani kao RhD pozitivni (46). Ipak, pojedine varijante D antigena, kao što je DEL fenotip, ne mogu sa sigurnošću biti dokazane čak ni metodom u IAT-u. To je pokazalo i ovo ispitivanje, te je uvođenje *RHD* genotipizacije jedini način pravilnog identificiranja takvih varijanti. U slučaju kada je u ispitivanju prisustva D antigena s monoklonskim anti-D reagensima u direktnoj aglutinaciji rezultat negativan, testiranje se nastavlja metodom u IAT-u, koji je sastavni dio rutinske prakse i u skladu je s preporukama Međunarodnog foruma za određivanje slabog D antigena. Standardi zemalja središnje Europe i većine susjednih zemalja predviđaju takav algoritam testiranja (102).

Razlike u određivanju D antigena kao rezultat razlike u jačini aglutinacije pojedinih seroloških metoda i uporabe različitih klonova anti-D reagensa dovode do problema u interpretaciji rezultata određivanja D antigena. Uočena prevalencija serološki slabih D fenotipova povećava se kada je laboratorijska metoda određivanja D antigena relativno neosjetljiva, na primjer, ručno testiranje u epruveti. U ovoj situaciji, direktna aglutinacija s anti-D reagensom može biti značajno slabije osjetljiva i aglutinacija eritrocita s varijantom D antigena može izostati, ali će eritrociti biti aglutinirani metodom u IAT-u pa rezultat određivanja D antigena tumačimo kao serološki slabi D fenotip. Suprotno tome, uočena prevalencija serološki slabih D fenotipova smanjuje se kada je metoda detekcije osjetljivija, na primjer, koristeći mješavinu potentnih rekombinantnih monoklonskih anti-D reagensa i koristeći osjetljivije mikroaglutinacijske metode. U ovoj

situaciji, vrlo osjetljiva prva faza ispitivanja D antigena aglutinirati će eritrocite koji ispoljavaju slabi D antigen, a rezultat se tumači kao RhD pozitivan. Sukladno tome, uzorak venske krvi pacijenta ili DDK sa slabom D varijantom može se protumačiti kao RhD pozitivan ako laboratorij koristi osjetljivu serološku metodu određivanja D antigena. Međutim, isti se uzorak može interpretirati kao serološki slabi D fenotip ako isti ili drugi laboratorij koristi manje osjetljivu metodu ili manje potentan anti-D reagens. Zbog toga je moguće da iste osobe budu interpretirane kao RhD pozitivne, RhD negativne ili slaba varijanta D antigena (62). Zbog problema u interpretaciji došlo je do potrebe uvođenja novih metoda i algoritama određivanja D antigena i razrješavanja nesukladnih rezultata. Napretkom molekularne tehnologije i uvođenjem osjetljive real-time PCR metode omogućeno je utvrđivanje prisustva gena *RHD* odnosno posljedično tome prisustva D antigena na eritrocitu uz smanjenje popratnog rizika transfuzijskog liječenja na minimum. Posljednja dva desetljeća objavljeni su rezultati brojnih populacijskih studija o molekularnoj pozadini D antigena. U studijama su utvrđeni nositelji D varijanti među RhD negativnim DDK, te pružena brojna saznanja o *RHD* polimorfizmu i pratećim rizicima imunizacije. Gassner i suradnici su proveli europsku multicentričnu studiju *RHD* probira 1700 RhD negativnih DDK, C/E fenotipa te detektirali nekoliko različitih alela *RHD*. Autori su prijavili značajnu raznolikost u frekvencijama pojedinih alela *RHD*, čak i između vrlo bliskih susjednih zemalja. Prikupljeno znanje implicira kako se podaci o polimorfizmu *RHD* u određenoj populaciji ne mogu generalizirati i da svaka regija mora provesti svoje istraživanje (84). Dosadašnje studije kojima su utvrđeni funkcionalni aleli *RHD* među RhD negativnim darivateljima krvi prikazane su u Tablici 16 (103).

Tablica 16. Prikaz *RHD* pozitivnih DDK u populaciji RhD negativnih DDK u svijetu

Studija	God	Veličina uzorka	Broj alela (N)	Broj RhD+ davatelja (N,%)	Države
Wagner et al.[120]	2001.	8442	17	50 (0,6)	Njemačka (SZ)
Gassner et al.[84]	2005.	1 700 (C/E+)	10	89 (5)	Austrija
Flegel et al.[66]	2009.	46133	23	96 (0,2)	Njemačka
Polin et al.[116]	2009.	23330	8	94 (0,4)	Austrija
Krog et al.[134]	2011.	5058	9	13(0,3)	Danska
Moussa et al.[111]	2012.	448	5	11 (1,1)	Tunis
Orzinska et al.[115]	2013.	31200	14	63 (0,2)	Poljska
Crottet et al.[114]	2014.	25370	33	120 (0,47)	Švicarska

Dugi niz godina vode se rasprave o imunogenosti slabih D varijanti te potrebi *RHD* probira RhD negativnih DDK i njihovom uklanjanju iz RhD negativnog „*pool*-a“ DDK (33). Sve studije koje su se bavile tom problematikom, preporučuju da se funkcionalni aleli smatraju RhD pozitivnim što bi u konačnici poboljšalo kvalitetu RhD negativnih pripravaka bez značajnog smanjenja dostupnosti i količine RhD negativne krvi.

Najučestaliji tipovi slabog D antigena u zemljama Europe su tip 1, 2, i 3 koji čine oko 90% slabog D (2, 55, 97). U hrvatskoj populaciji dosadašnja utvrđena učestalost među pacijentima sa serološki slabom ekspresijom D antigena iznosi 87,4% (57). Nositelji slabih D tipova 1, 2, 3, 4.0 i 4.1 kao primatelji RhD pozitivne krvi ne razvijaju RhD aloimunizaciju pa se nositelji takve varijante mogu tretirati kao RhD pozitivni i transfundirati RhD pozitivnim krvnim pripravcima. Procjenjeno je kako bi se na taj način moglo uštedjeti do 5% RhD negativnih krvnih pripravaka kojih je uvijek manje u zalihama (6). Prema literaturnim podacima, učestalost D varijanti varira među pripadnicima različitih etničkih skupina i rasa pa čak i unutar granica iste države. Za varijante koje su slabi D tip 1, 2 i 3 učestalost je 93% u jugozapadnoj Njemačkoj, 73% u Francuskoj, 80% u Danskoj, 81,8% u Albaniji, 67,5% u Flandriji, 61% u Kanadi i 22 % u Brazilu (10, 55, 92, 104-108). U sjevernom Londonu učestalost slabih D fenotipova među populacijom bijelaca je 0,3% i čak 17% u populaciji afričkog podrijetla (109). Prema tome, svaka zemlja mora provesti populacijsku studiju o učestalosti D varijanti i prilagoditi strategiju testiranja sukladno prevalentnim alelima *RHD* (2, 57, 84, 110-112). *RHD* genotipizacija RhD negativnih DDK se već rutinski provodi u nekoliko Europskih zemalja, a svaka ima različite algoritme testiranja (Tablica 17.) (66, 113, 114). Zavod za kliničku transfuzijsku medicinu i imunogenetiku, Ulm, Njemačka je prvi uveo rutinski molekularni probir na DEL kod darivatelja krvi 2002. godine. Slična inicijativa se provodi u Austriji od 2004., u sjevernoj Njemačkoj od 2009. te u Brazilu od 2012. (65). U Švicarskoj je molekularni probir DDK uveden 2013. godine, a u Irskoj od 2016.g. I dok je većina transfuzijskih centara molekularni probir ograničila na C/E DDK, Švicarska je odlučila raditi probir svim RhD negativnim DDK, jer je nekoliko slabih D i DEL tipova u DDK ce fenotipa (113).

Tablica 17. Rutinski *RHD* PCR probir D-negativnih DDK (preuzeto i prilagođeno iz Wagner FF, RHD PCR of D-negative Blood Donors, 2013.)

Transfuzijski centar	Strategija testiranja
Njemačka (Baden Württemberg)	Svi novi DDK; *RHD* intron 4 u pool-u
Njemačka (Sjeverna)	Svi novi DDK, *RHD* egzon 7 u pool-u
Austrija (Gornja)	Svi novi DDK; intron 4, egzon 7 i 10 RHD u poolu; IAT se ne radi
Austrija (Innsbruck)	Pojedinačno testiranje DDK s C/E+
Danska (Aarhus)	DDK C/E+; egzon 10 RHD u poolu
Švicarska (Bern)	Svi DDK; egzoni 3, 5 i 10 RHD u pool-u
Švicarska (Zurich)	Svi DDK intron 4 / egzoni 5 +7 u pool-u; pojedinačno testiranje; egzoni 5 i 7 i 3' UTR

U ovom istraživanju proveli smo probir RhD negativnih DDK, na prisutnost gena *RHD*. Kako ne bi značajno povećali troškove tipizacije, a pritom i uštedjeli na vremenu, odlučili smo napraviti mješavinu od 20 uzoraka DDK (engl. *pool*) kao i u drugim europskim zemljama. To se pokazalo praktično i primjenjivo, te smo mišljenja kako je moguće provesti probir i povećanjem broja uzoraka DDK u smjesi, a da se pri tome ne smanji osjetljivost testa, što je dokazano u literaturi (113, 115). Kako bi testiranjem obuhvatili većinu *RHD* specifičnih polimorfizama, proveli smo ispitivanje 2 regije *RHD*: egzona 7 i egzona 10, što korelira sa studijama susjednih zemalja (67, 84, 113, 116). Pretraživanjem 327 mješavina real-time PCR metodom dokazali smo 23 (0,35%) *RHD* pozitivna DDK. Ovaj broj dobro korelira s podacima iz nama bliskih europskih zemalja kao npr. Njemačka, Poljska, Danska, Austrija i Švicarska s učestalošću od 0,21%, 0,2%, 0,3%, 0,4% i 0,47% *RHD* pozitivnih u skupini serološki RhD negativnih DDK (66, 114-117). Nasuprot tome, puno veća prevalencija od 4,1% je prijavljena u Brazilu, od čega je 0,8% klinički značajnih alela te 10-33% u Japanu i Kini (118, 119).

RHD genotipizacijom pozitivnih uzoraka dobivenih probirom definirali smo alele *RHD* među DDK. Utvđeni su različiti aleli u populaciji RhD negativnih DDK koji su uključivali *RHD-CE-D* hibride s velikim segmentom *RHCE* gena, alele *RHD* s izrazito slabo izraženim D antigenom. To je posljedica različitih polimorfizama jednog nukleotida koji dovode do zamjene aminokiselina u transmembranskom ili unutarstaničnom dijelu RhD proteina što rezultira sa smanjenom gustoćom antigena na eritrocitu.

Uspoređivanjem naših rezultata s rezultatima objavljenim u literaturi možemo zaključiti kako je distribucija Rh fenotipova u populaciji *RHD* pozitivnih DDK u Hrvatskoj u skladu s distribucijom Rh fenotipova u drugim europskim populacijama: najveća učestalost za CcDee (78%), zatim CcDEe (13%) i ccDEe (9%) (32, 92, 113, 120, 121). U populaciji DDK u našoj studiji nismo pronašli prisutstvo niti jedne D varijante fenotipa ce, a tek rijetki slabi D tipovi, DEL-ovi udruženi s navedenim fenotipom su prijavljeni u Austriji (0,15%) i Švicarskoj (0,03%) (113, 116). S obzirom na naše rezultate kojima smo dokazali učestalost varijantnih alela *RHD* s C ili E antigenima, imalo bi smisla raditi probir samo RhD negativnim, C/E pozitivnim DDK.

Alel *RHD*01N.03* veliki hibrid je utvrđen u 11 (47,8%) uzoraka koji su bili pozitivni u *RHD* probiru samo na egzon 10. Egzoni 2-9 potječu od *RHCE* gena. Zbog nedostatka ekspresije RhD proteina na membrani eritrocita fenotipski su RhD negativni, dakle ne mogu uzrokovati RhD aloimunizaciju primatelja krvi, te nisu klinički značajni. Visoka učestalost takvog hibridnog alela prijavljena je i u Njemačkoj, Austriji, Sloveniji, Poljskoj, SAD-u s učestalošću od 1:4 817, 1:640, 1:1 911, 1:4 132, 1:1 835 (84, 115, 120).

*RHD*11* (*RHD* (M295I) ili slabi D tip 11/DEL) koji je utvrđen u 4 (17,4%) DDK, učestala je varijanta ne samo u Hrvatskoj, već i diljem Europe (55, 57, 115, 122). Rezultati europskih studija *RHD* genotipizacije u populaciji RhD negativnih ispitanika su prijavili učestalost od 1:3700–1:14440 za DEL fenotip povezan s *RHD**M295I alelom (7). Po nomenklaturi je uvršten i u DEL i u slabi D tip 11. *RHD* (M295I) se javlja u dva haplotipa s različitom fenotipskom ekspresijom. U CDe haplotipu gustoća antigena je manja pa je fenotipski DEL, dok je u cDe haplotipu gustoća antigena puno veća pa je fenotipski slabi tip D 11, te se lako dokaže u indirektnom testu. Prema objavljenim

podacima, od svih varijanti koje su utvrđene kao DEL, ova ima najjaču ekspresiju D antigena, i moguće ju je utvrditi genotipizacijom. Nositelji ovog DEL/slabog D mogu izazvati aloimunizaciju, te ih je potrebno klasificirati kao RhD pozitivne (123). Najveća učestalost slabog D tipa 11 primijećena je i u Bosni i Hercegovini, Transfuzijski centar Banja Luka (124), a prijavljeni su u sjevernoj i jugozapadnoj Njemačkoj, Tunisu i Kanadi (120, 125, 126).

Najmanja učestalost među DDK utvrđena je za *RHD*01W.2* (slabi D tip 2), koji čini 2 (8,7%) *RHD* pozitivna uzorka. Fenotipski se klasificira kao slabi D i javlja u sklopu cDE haplotipa. Od svih slabih D tipova, primijećeno je kako tip 2 ima najmanju gustoću D antigena. Zabilježena je učestala pojavnost u Australiji, Francuskoj, Sjevernoj Njemačkoj, Tirolu i Albaniji (7).

Preostalih 6 PCR *RHD* pozitivnih uzoraka dobivenih molekularnim probirom zbog nemogućnosti definiranja D-alela PCR-SSP metodom podvrgnuto je sekvenciranju u referentnom laboratoriju. U jednom uzorku je utvrđena nova mutacija, koja rezultira sintezom "oštećenog" proteina koji je vrlo slabo izražen na membrani eritrocita i posljedično dovodi do DEL fenotipa. Jedan uzorak je kategoriziran kao *RHD*01W.28* (slabi D tip 28), s poznatom nukleotidnom promjenom koja dovodi do modificiranog izrezivanja prekursorske RNA nakon transkripcije čime dolazi do promjene mjesta spajanja kodirajućih sekvenci i izmijenjene mRNA, a u konačnici i samog proteina, a za koji nema puno podataka u literaturi.

Za preostala 4 uzorka nije pronađena niti jedna mutacija u *RHD* genu što implicira normalan genotip *RHD*01* (normalan D). Rezultati sekvenciranja i IBGRL- (International Blood Group Reference Laboratory) nisu ponudili odgovor slabe ekspresije D antigena u navedena 4 uzorka, ali navode kako će sačuvati taj i slične uzorke u nadi da će pronaći objašnjenje pojavom novih tehnologija i mogućnosti testiranja. Ipak, utvrđeno je da kod malog postotka osoba fenotip ne reflektira genotip. Takav manjak D antigen ekspresije uz nazočnost intaktnog gena *RHD* uočen je i u multicentričnoj studiji Gassner i suradnika u Njemačkoj i jedan slučaj u Sloveniji (84, 127).

Za svih 12/6533 (0,18%) uzoraka je potvrđen DEL fenotip, tj dokazan D antigen serološkom metodom adsorpcije i elucije anti-D reagensa. Najčešći alel koji uzrokuje DEL je *RHD** (M2951), što je potvrđeno i našom studijom. Svi *RHD* pozitivni uzorci

imali su pozitivan C i/ili E antigen, što korelira s podacima iz drugih europskih zemalja (84, 115, 116). Učestalost *RHD* pozitivnih DDK u skupini serološki RhD negativnih C/E pozitivnih DDK je 3,59%, a izvješća iz središnje Europe pokazuju slične vrijednosti (66, 84, 104, 113).

Utvrđena učestalost klinički značajnih DEL alela među RhD negativnom, C/E pozitivnom populacijom DDK je 1,88%. Učestalost DEL fenotipa u europskoj populaciji RhD negativnih, C/E+ je 1-2% (64, 104, 128, 129). Dajak i suradnici su utvrdili još veću učestalost DEL-a u Splitsko-dalmatinskoj regiji od 3,5% u populaciji RhD negativnih, C/E pozitivnih DDK (129). Takva zemljopisna varijacija u razdiobi slabih D tipova u kontinentalnoj i mediteranskoj Hrvatskoj već ranije je utvrđena u radu Đogić i suradnici (57). U sjeverozapadnom dijelu susjedne Bosne i Hercegovine učestalost klinički značajnih alela *RHD* u C/E+ DDK je također visoka i iznosi 9,8% (32,124). Učestalost i raspodjela pojedinih alela *RHD* u populaciji RhD negativnih DDK varira i između pojedinih zemalja, što je pokazalo i naše istraživanje. Druge europske zemlje kao što su Austrija i Poljska su utvrdile učestalost od 0,3% i 0,09 % klinički značajnih alela (115, 116). Varijacije u učestalosti mogu biti posljedica različitih strategija testiranja i različite veličine uzorka. U svakom slučaju potrebno je prilagoditi strategiju genotipizacije prema spektru alela koji prevladavaju u pojedinoj populaciji. Tako je optimalna strategija drugačija za Europljane u odnosu na Afrikance s *RHD*Ψ genotipom ili puno nositelja DEL-a u Azijata (66).

Retrospektivnom analizom podataka iz arhive nacionalnog informatičkog sustava (eDelphyn) skupili smo podatke o dosadašnjim donacijama DEL pozitivnih DDK. Kako tek od 2011.g. imamo eDelphyn na nacionalnoj razini, od navedene godine smo popratili sljedivost za 87 njihovih dosadašnjih RhD negativnih donacija. Obzirom da su se transfuzijski centri uključivali u nacionalnu informatičku mrežu postepeno, a neki još nisu uključeni, nismo imali sve podatke u eDelphyn-u, pa smo poslali upite transfuzijskim jedinicama gdje su izdani KE. Od 40 primatelja za koje smo skupili podatke o IAT-u prije i nakon transfuzije, jedan bolesnik (2,5%) (krvne grupe O, RhD negativan) je razvio RhD imunizaciju. Bolesnik nije primao druge RhD pozitivne krvne pripravke, a imunizaciju je izazvao RhD negativan KE DDK kojem je naknadno definiran normalan *RHD,* a serološki potvrđen DEL fenotip. Učestalost RhD imunizacije od 2,5% dobivenu samo temeljem podataka prikupljenih iz transfuzijskih centara koji su

dostavili iz arhive raspoložive podatke, treba uzeti s ograničenjem obzirom na relativno malu promatranu skupinu. Treba uzeti u obzir da smo status aloimunizacije mogli analizirati samo na onim bolesnicima koji su nakon primanja navedenih krvnih pripravaka bili opetovano transfundirani ili obrađivani u tim istim transfuzijskim jedinicama. Bez aktivnog i prospektivnog praćenja anti-D immunizacija primatelja ovih krvnih pripravaka nije moguće utvrditi stvarni rizik od RhD aloimunizacije (64). Iako krvni pripravci proizvedeni od RhD negativnih DDK nose mali rizik za RhD imunizaciju što je dokazano mnogim studijama, podaci o prije navedenoj učestalosti DEL-a u Europi govore o mogućem riziku koji ne treba zanemariti. Na osnovi utvrđene prevalencije DEL varijanti u naših ispitanika, procijenili smo rizik transfundiranja RhD negativnih bolesnika s klinički značajnim DEL KE. Prema učestalosti DEL-a u ispitivanoj populaciji i broju izdanih KE godišnje (97230) možemo procijeniti da godišnje potencijalno proizvedemo oko 33 DEL KE. Ako pretpostavimo da se DEL KE transfundiraju RhD negativnim primateljima krvi i da se svi proizvedeni KE utroše transfuzijom, godišnji rizik transfuzije RhD negativnih primatelja s klinički značajnim DEL varijantama je 1: 19 642 transfuzija [1/(33 DEL × 15% RhD neg) × 97230 KE/godišnje]. Ova procjena rizika temelji se na dostupnim dokazima o imunogenosti DEL-a i prepostavci da se svi proizvedeni KE transfudiraju (130). Za najučestaliji nađen DEL alel u našoj studiji još nema dovoljno podataka o imunogenosti. Većina studija o RhD imunizacijama nakon transfuzije KE proizvedenih od DDK nositelja RhD varijanti potječe iz azijskih zemalja i odnosi se na transfuzije *RHD*DEL1 ((RHD(K409K))* KE ili azijskog DEL alela. Naime, iako je u tim zemljama mala učestalost RhD negativnih osoba u populaciji, prevalencija DEL alela unutar RhD negativne populacije doseže i do 30% (62, 64, 131,132). Autori većine studija su opisali sekundarnu imunizaciju, odnosno porast titra već postojećeg anti-D, ali su opisani slučajevi i primarne imunizacije (Tablica 18) (131).

Tablica 18. Anti-D imunizacije s DEL KE opisane u literaturi (preuzeto i prilagođeno iz Yang HS i suradnici, 2015.)

Karakteristike	Wagner i sur. (2005)	Yasuda i sur. (2005)	Kim i sur. (2009)	Yang i sur. (2015)
Dob	58	67	68	64
Spol	Ž	Ž	M	M
Zemlja	Austrija	Japan	Koreja	Rusija
Krvna grupa	A, D-	B, D-	O, D-	A, D-
Prethodne transfuzije	Ne	Da*	Ne	Ne
Broj DDK	2	59	4	2
Broj DDK s potvrđenim DEL fenotipom	1	2	1	2
Alel *RHD*	IVS5-38del4	K409K	K409K	K409K

*transfuzija KE prije 40 godina

Unatrag 15-ak godina analizira se imunogenost slabih D i DEL varijanti i minimalni broj D antigena potrebnih za pokretanje primarnog ili sekundarnog imunosnog odgovora (12, 84). Informacije o testiranju DDK na varijante D antigena i razvijenim imunizacijama su prikupljene u 17 različitih zemalja. Prijavljeno je samo 7 slučajeva RhD aloimunizacije. Broj D antigena na nekim od tih transfundiranih eritrocita bio je iznenađujuće mali, samo 10-70 antigena po eritrocitu (133). Neke studije navode kako 200 mL RhD pozitivnog KE dovodi do RhD aloimunizacije u više od 80% RhD negativnih primatelja u roku 2 do 5 mjeseci, te kako je nemoguće predvidjeti koja je najmanja količina D antigena koja može biti imunogenična (84).

Studija provedena u Danskoj u kojoj je 5058 serološki RhD negativnih DDK testirano na prisustvo gena *RHD*, utvrdila je učestalost od 0,26% DDK koji su nositelji

RHD-a, svi DEL fenotipa. Retrospektivnom analizom utvrđeno je da je od 13 DDK koji su imali gen *RHD* 136 krvnih pripravaka transfundirano RhD negativnim pacijentima, a samo jedan primatelj je stvorio anti-D protutijelo. Štoviše, smatraju kako je u navedenom slučaju uzrok imunizacije bila zapravo istodobna transfuzija RhD pozitivnog koncentrata trombocita (KT), a ne DEL varijante. Zaključuju kako je RhD imunizacija rijetka te iznosi 1,4 na 100 000 transfuzija RhD negativnih krvnih pripravaka (134). Nadalje, istraživanje rizika imunizacije DEL-*RHD(M295I)* krvnih pripravaka provedeno u Innsbruck-u u Austriji pokazalo je da niti jedan RhD negativan pacijent nije razvio anti-D (84). U literaturi je ukupno opisano nekoliko slučajeva RhD imunizacije putem KE koji su bili određeni kao RhD negativni, a naknadno je utvrđeno da se radi o DEL varijanti (12, 68, 69,126,134). Statističkom analizom nismo otkrili statistički značajnu razliku opažene učestalosti imunizacije u našoj populaciji (N-40, 2,5%) u usporedbi s prethodno objavljenima, na razini značajnosti 0,05% (Danska P=0,397, Kanada P=0,876)(126,134).

U skupini ispitanika sa serološki slabim D varijantama (n-263) utvrđeno je da je najučestaliji *RHD*01W.1*, slabi D tip 1 (49,81%), a slijede po učestalosti *RHD*01W.3*, slabi D tip 3 (24,71%) te *RHD*01W.2*, tip 2 (9,51%). Ukupan udio slabih D antigena dokazanih indirektnom metodom u populaciji DDK je bio 0,18%. Učestalost slabih D varijanti varira od zemlje do zemlje, pa je tako u Španjolskoj 0,02%, a u Danskoj 4,1% (104, 122). Učestalosti slabih i parcijalnih D tipova ovisi o populaciji i o osjetljivosti korištenih testova/reagensa. Usporedba učestalosti tri najčešća slaba D tipa u europskoj populaciji radi bolje preglednosti je prikazana u Tablici 19. Kada se uspoređuju naši podaci s podacima iz drugih europskih zemalja, tako velika prevalencija slabog D tipa 1 uočena je i u Albaniji (67%), Njemačkoj (65%) i Danskoj (67%), dok su za slabi D tip 2 i 3 zabilježene veće varijacije (92). Zanimljivo je da geografski nam bliska Austrija ima najveću učestalost tipa 3, a Portugal tipa 2 (116, 135). U sjeverozapadnoj Bosni i Hercegovini je također zabilježena najveća učestalost slabog D tipa 3 (59%), dok je u Beogradu dominantan tip 1 (53, 124). Ova zapažanja trebala bi se kritički promatrati s obzirom na to da su različiti laboratoriji koristili različite reagense i metode testiranja što može rezultirati različitim serološkim nalazima. Autori ističu različitu prevalenciju pojedinih tipova slabih D varijanti u odnosu na ostala istraživanja. Iznimno rijetki slabi

D tip 38 je relativno čest u Portugalu, dok je slabi D tip 42 najčešći slabi D u Quebecu, Kanadi (136-138).

Tablica 19. Prijavljena učestalost (%) tri najčešća slaba D tipa u europskoj populaciji (preuzeto i prilagođeno iz Xhetani i sur. Distribution of Rhesus blood group antigens and weak D alleles in the population of Albania. Blood Transfus. 2014; 12(4): 565–569)

Zemlja	n	tip1(%)	tip 2(%)	tip 3(%)	tip 1 + 3(%)	ostali(%)
Albanija	55	67,3	3,6	9,1	1,8	18,2
Njemačka (Jug)	159	59,7	27,0	4,4	0	8,9
Njemačka (Sjever)	260	65,0	16,9	17,3	0	0,8
Austrija	130	33,1	7,7	50,0	0	9,2
Portugal	99	16,1	63,6	14,1	0	6,2
Francuska	230	40,4	27,4	4,8	0	27,4
Danska	91	65,9	12,1	9,9	0	12,1
Hrvatska	221	49,8	9,5	24,7	0,4	15,6

Primijećeno je da slabi D tip 3 daje najjače reakcije u direktnoj i indirektnoj aglutinaciji, što je i očekivano jer je upravo za taj tip dokazano kako ima najveću gustoću D antigena, sa srednjom vrijednosti gustoće 1900 D antigena po eritrocitu. Za slabi D tip 1 i 2 dokazana je srednja vrijednost od 700 i 600 D antigena po eritrocitu (9). Slabi D tip 2 se kod DDK najčešće otkriva određivanjem D antigena u IAT-u. Kod trudnica i pacijenata tip 2 se rijetko nađe jer ga većina monoklonskih anti-D protutijela slabo ili uopće ne otkriva (139). Prema rezultatima ovog istraživanja nije moguće razlikovati pojedine D varijante prema jačini aglutinacije s pojedinim monoklonskim reagensima. Jedino se *RHD* genotipizacijom može točno definirati D varijanta. Neka druga istraživanja su dokazala da se i slabi D tipovi 4.2.1 (*RHD*09.01.01*) i 15 (*RHD*15*), za koje se zna da mogu dovesti do RhD imunizacije, ne mogu razlikovati od drugih slabih D tipova rutinskim serološkim metodama (46, 140). Rezultati tih studija su pokazali da

bi se anti-D reagensi trebali odabrati prema prevalenciji D varijanti u određenoj populaciji kako bi se učinkovitije mogle prepoznati klinički značajne D varijante (46).

Ovo istraživanje je potvrdilo da 84,4 % serološki slabih D tipova čine tipovi 1, 2 i 3, kako je bilo i očekivano za europsku populaciju (56). Većina studija europske populacije je pokazala da do 90% varijanti slabog D antigena čine slabi tipovi 1, 2 , 3 dok studije koje obuhvaćaju miješane etničke skupine pokazuju veliku učestalost parcijalnih tipova (97, 140, 141). Zastupljenost pojedinih fenotipova u našoj populaciji korelira s podacima iz literature prema kojima su RhD varijante sa slabijom ekspresijom vezane uz prisustvo C i/ili E antigena (53).

Detekcija nositelja slabih D tipova 1, 2, 3, 4.0 i 4.1 važan je nalaz i u DDK i u pacijenata. Nije opisano niti jedno aloanti-D protutijelo kod osoba s ovim najčešćim slabim D tipovima (9). Opisani su primjeri autoprotutijela, u 121 nositelja slabog D tipa 1 i 99 slabih D tipa 2 nađeno je 12 osoba s autoanti-D protutijelima (142). Klinički značajne D varijante s opisanim slučajevima RhD imunizacije su redom parcijalni: DII, DIII, DIVa,b, DV, DVI,DVII, DAR, DAU, DBT, DFL, DFR, DFV, DHAR, DHMI, DMH, DMI, DNAK, DNB, DOL,DWI, te slabi D tipovi 4.2, 11, 15, 21, 27 (2).

Prema velikoj američkoj studiji provedenoj u 4 ustanove, incidencija pojave anti-D protutijela u serološki slabih D varijanti nakon transfuzije RhD pozitivnih krvnih pripravaka dokazana je u 0,15% slučajeva u tri institucije i 5,1% u jednoj instituciji. Potonja je u ispitivanoj populaciji imala veći udio afroameričke populacije za koju je karakteristično da češće ima parcijalne D alele (143). To je jedna od prvih multicentričnih retrospektivnih studija koja je istraživala učestalost anti-D imunizacije kod pacijenata sa serološki slabim D fenotipom na većem broju ispitanika. Tako niska incidencija RhD imunizacije je značajno manja u odnosu na incidenciju od 20% u populaciji hospitaliziranih RhD negativnih pacijenata koji su primili RhD pozitivni krvni pripravak (48-50, 143). Ovaj nalaz govori u prilog dosadašnjih preporuka kojima je praksa transfuzije RhD pozitivnog KE medicinski prihvatljiva u određenim situacijama. Dosadašnje studije utvrdile su također mali rizik anti-D imunizacije trudnica sa slabim D varijantama nakon poroda RhD pozitivnog djeteta (143, 144).

Među manje učestalima D varijantama nađenim u ispitivanoj populaciji DDK sa serološki slabim izražajem D antigena u više od jednog DDK identificirani su

*RHD*01W.14* (slabi D tip 14), *RHD*01W.64* (slabi D tip 64) te *RHD*06* (parcijalni DVI). Nukleotidne promjene karakteristične za pojedine D varijante sa slabijom ekspresijom D antigena prikazane su u Tablici 20.

Tablica 20. Prikaz mutacija i promjena aminokiselina kod pojedinih D varijanti u odnosu na normalan RhD protein (preuzeto i prilagođeno: www.rhesusbase.info)

ISBT	*RHD* varijanta	Zamjena nukleotida*	Zamjena aminokiselina+
*RHD*01W.1*	Slabi D tip 1	809T>G	V270G
*RHD*01W.2*	Slabi D tip 2	1154 G>C	G385A
*RHD*01W.3*	Slabi D tip 3	8 C>G	S3C
*RHD*01W.14*	Slabi D tip 14	544 T>A; 594A>T; 602 C>G	S182T, K198N, T201R
*RHD*01W.18*	Slabi D tip 18	19C>T	R7W
*RHD*01W.28*	Slabi D tip 28	1152 A>C	T384T
*RHD*01W.64*	Slabi D tip 64	881 C>T	A294V
*RHD*09.01.00*	Slabi D tip 4.2	602C>G; 667T>G; 957G>A; 1025T>C	T201R F223V I342T
*RHD*06.01*	D kat VI tip 1	505 A>C; 509 T>G; 514A>T; 544 T>A; 577 G>A;594 A>T;602 C>G;667 T>G;676 G>C;697 G>C;712 G>A;733 G>C;744 C>T;787 G>A;800 A>T	M169L, M170R, I172F, S182T, E193K, K198N, T201R, F223V, A226P, E233Q, V238M, V245L, G263R, K267M
*RHD*06.02*	D kat VI tip 2	505 A>C;509 T>G;514 A>T;544 T>A;577 G>A;594 A>T;602 C>G;667 T>G;697 G>C;712 G>A;733 G>C;744 C>T;787 G>A;800 A>T;916 G>A;932 A>G	M169L, M170R, I172F, S182T, E193K, K198N, T201R, F223V, E233Q, V238M, V245L, G263R, K267M, V306I, Y311C
*RHD*06.03*	D kat VI tip 3	361 T>A;380 T>C;383 A>G;455 A>C;505 A>C;509 T>G;514 A>T;544 T>A;577 G>A;594 A>T;602 C>G;667 T>G;697 G>C;712 G>A;733 G>C;744 C>T;787 G>A;800 A>T;916 G>A;932 A>G	L121M, V127A, D128G, N152T, M169L, M170R, I172F, S182T, E193K, K198N, T201R, F223V, E233Q, V238M, V245L, G263R, K267M, V306I, Y311C

* A-adenin, T-timin, C-citozin, G-gvanin ; + A-alanin, R-arginin, N-asparagin, D-aspartanska kiselina, C-cistein, Q-glutamin, E-glutaminska kiselina, G-glicin, H-histidin, I-izoleucin, L-leucin, K-lizin, M-metionin, F-fenilalanin, P-prolin, S-serin, T-treonin, W-triptofan, Y-tirozin, V-valin

Visoka učestalost slabog D tipa 14 je osobitost hrvatske populacije (57). Kod preostalih darivatelja sa slabim D antigenom dokazan je *RHD*09.01.00* (slabi D tip 4.2), *RHD*01W.28* (slabi D tip 28), *RHD*01W.18* (slabi D tip 18) te heterozigot *RHD*01W.1/ RHD*01W.3*. Slabi D tip 4.2 (*RHD*09.01.00*), rijetko prisutan u Europi, a čest u Africi, nađen je u našoj mediteranskoj regiji što je vjerojatno rezultat migracija i miješanja stanovništva (57). Što se tiče parcijalnih varijanti D antigena kategorija DVI je otkrivena u 7,60% DDK sa slabijom ekspresijom D antigena, dok se kod pacijenata i trudnica ne otkriva budući se kod ispitivanja njihovih uzoraka krvi koriste monoklonski reagensi koji ne detektiraju kategoriju VI. Svi su imali C i/ili E u fenotipu.

Druge varijante parcijalnog D antigena nisu pronađene u ispitivanoj skupini DDK jer su oni testirani većinom s monoklonskim regencijama koje daju pozitivne reakcije kod velikog broja D varijanti. Od parcijalnih D antigena otkrivenih u ispitivanoj populaciji DDK, najzastupljenija varijanta je *RHD*06.02*, kategorija DVI tip 2 pronađena kod 15 ispitanika (5,70%). Najveća učestalost toga DVI alela pronađena je u Francuskoj te sjevernoj i zapadnoj Njemačkoj (7). Varijanta *RHD*06.03* pronađena je kod 3, a *RHD*06.01* kod 2 ispitanika. Parcijalni D antigen DVI je najčešća varijanta u Europljana povezana sa stvaranjem anti-D protutijela (53, 46). Učestalost DVI varijante u toj populaciji je između 0,02%-0,05%. Postoje četiri vrste *RHD*06*. Svi imaju hibridni gen *RHD-CE-D*, ali egzoni izvedeni iz *RHCE* su RHcE(4-5) u tipu 1, RHCE(4-6) u tipu 2, RHCE(3-6) u tipu 3 i RHCE(3-5) u tipu 4 (7). Svi kodiraju slične promjene u vanjskim petljama RhD proteina. Kodirani fenotipovi se razlikuju u jačini i ekspresiji antigena (2). Razlikovanje nositelja slabih D tipova od parcijalnih je iznimno važno jer su osobe nositelji parcijalne D varijante, kao primatelji krvi u riziku od nastanka RhD aloimunizacije, a često predstavljaju problem u rutinskom serološkom određivanju jer ne daju jednoznačne rezultate. To uvelike ovisi o korištenim reagensima i metodama (epruveta *vs* mikrokartica), jer različiti reagensi sadrže različita monoklonska protutijela, koncentracije proteina i pojačivače aglutinacije (46). Europske smjernice za određivanje D antigena preporučuju da se u trudnica i pacijenata koriste anti-D reagensi koji ne prepoznaju DVI kategoriju pa se trudnice i pacijenti s takvom varijantom proglase RhD negativni. Time se osigurava da žene prime RhIg, a pacijenti RhD negativnu krv. Za potrebe određivanja D antigena kod DDK koriste se reagensi koji prepoznaju DVI kategoriju, kako bi se odredili kao RhD pozitivni. U studiji Lukačević Krstić i suradnici

koja je ispitivala učestalost D varijanti u Splitsko-dalmatinskoj županiji, najčešća parcijalna D varijanta je bila DVa (*RHD**05.05). Zanimljivo je u njihovom istraživanju da su se parcijalne D varijante jasno mogle razlikovati od slabih D tipova rutinskom serologijom jer su parcijalne D varijante pokazivale slabe do negativne reakcije aglutinacije s jednim anti-D monoklonskim regensom, a reagirale pozitivno s drugim monoklonskim reagensom (46).

Jedan od ciljeva ove studije bio je usporedba seroloških metoda dokazivanja D antigena s molekularnim, kako bi utvrdili potencijalnu korist primjene molekularnih metoda u poboljšanju testiranja D antigena i kako bi procijenili učestalost pojedinih slabih D tipova u populaciji DDK. Svi uzorci serološki određeni kao slabi D su potvrđeni molekularnim metodama. Serološko određivanje D antigena je prepoznalo većinu slabih D varijanti, iako nije moglo razlučiti koji su aleli *RHD* uzrok oslabljenog D fenotipa, dok su eritrociti s DEL fenotipom ostali neprepoznati. Ipak, serološki testovi otkrivaju slabiju ekspresiju D antigena i usmjeravaju nas na molekulanu dijagnostiku *RHD* varijanti. Unatoč određivanju D antigena u IAT-u svim RhD negativnim DDK, 23 inicijalno serološki RhD negativna uzorka su pokazala prisutnost *RHD-a* molekularnom tipizacijom. U ta 23 uzorka, utvrđeno je i 12 DEL tipova koji unatoč osjetljivim serološkim metodama nisu bili otkriveni.

Ovo istraživanje pokazuje kako bi *RHD* genotipizacijom i u populaciji pacijenata i trudnica kod serološki nejasnih ili slabih D tipova omogućili primjenu RhD pozitivnih krvnih pripravaka u 84,4% slučajeva (slabi D tipovi 1, 2 i 3), a isto tako smanjili primjenu RhIg imunoprofilakse (74). Potencijalna ušteda RhD negativnih krvnih pripravaka koja bi se postigla integracijom *RHD* genotipizacije je izračunata putem pretpostavljenog modela „obrnute piramide“, prikazanog u studiji Sandler i suradnici (62). Prema podacima Godišnjeg izvješća o radu stacionarnih zdravstvenih ustanova u 2019.g. Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) broj liječenih bolesnika u stacionarnim zdravstvenim ustanovama je bio 715 639 (145). Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) u svojim izvješćima navodi različite postotke transfuzijskih liječenih bolesnika i prema tablicama SZO i podacima iz informatičkog programa o izdanim dozama krvi u Hrvatskoj, 10-15% bolesnika na stacionarnom liječenju primi transfuziju krvi, što čini 93 033. Od toga broja je 15% RhD negativnog fenotipa što čini 13 955 bolesnika. S obzirom na dobivene rezultate u ovoj studiji za pretpostaviti je da je u populaciji RhD

negativnih primatelja oko 0,35% onih koji će imati slabe D varijante (49/13 955). U 84,4% slučajeva pri transfuzijskom liječenju ovih bolesnika mogli bi primijeniti RhD pozitivne krvne pripravke. Tako bi mogli uštedjeti 41 RhD negativni krvni pripravak, odnosno ukupno 82 na godišnjoj razini, s obzirom da se prosječno svakom pacijentu transfundiraju po 2 KE (146). Takav pristup upravljanja RhD negativnim krvnim zalihama bio bi puno racionalniji i konzervativniji u odnosu na postojeći. Navedeni izračuni pružaju samo približno procjenu o potencijalnom dugoročnom utjecaju uvođenja *RHD* genotipizacije na zahtjeve za transfuzijom RhD negativnih krvnih pripravaka. Izračuni ne uzimaju u obzir različite zahtjeve prema zemljopisnom, etničkom podrijetlu, kao ni mnoge druge čimbenike koji određuju zahtjeve za RhD negativnim krvnim pripravcima.

Ovo istraživanje obuhvaća i ekonomski aspekt predloženog postupka *RHD* molekularnog probira DDK. Budući da molekularna analiza doprinosi ukupnim troškovima, strategija testiranja ima velik utjecaj i na konačne ukupne troškove proizvodnje krvnih pripravaka. Postoji više različitih strategija testiranja (67). Nekoliko transfuzijskih centara molekularni probir D negativnih DDK je ograničilo na nove darivatelje krvi, što je ekonomski gledano učinkovitije i takva strategija testiranja bi nakon nekoliko godina rezultirala velikim brojem RhD negativnih DDK testiranih real-time PCR-om. Nedostatak takve strategije je u činjenici da je najveći broj neprepoznatih slabih D tipova u skupini višestrukih DDK, pa se time propušta identificirati dio *RHD* pozitivnih DDK. Nadalje, u većini studija je utvrđena povezanost D varijanti sa C/E fenotipom. Primjerice, u jugozapadnoj Njemačkoj učestalost DEL fenotipa je u populaciji C/E pozitivnih DDK 1:67, dok je u populaciji ccee DDK 600 puta manja (66). Prema vlastitim populacijskim podacima zaključili su da je opravdano raditi molekularni probir samo u populaciji C/E pozitivnih DDK. U drugim zemljama kao na primjer u Egiptu, više od 80% varijanti je bilo ccee fenotipa pa se takav način probira ne može primijeniti u njihovoj populaciji (67, 110). Alternativne strategije određivanja D antigena su tzv. „*Add-on*“ pristup kojim bi se *RHD* PCR radio nakon negativnog nalaza određivanja D antigena u IAT-u, ili u potpunosti zamjena određivanja D antigena u IAT-u s *RHD* probirom nakon negativnog nalaza direktne aglutinacije s anti-D regensom (67). Potonje strategije eliminiraju rizik propusta detekcije D varijanti u populaciji RhD negativnih DDK. Uz navedene strategije određivanja D statusa, mnogi transfuzijski

centri rade *RHD* probir u mješavini uzoraka DDK, što se pokazalo isplativo, učinkovito i primjenjivo.

Guzijan i suradnici smatraju da bi uvođenje *RHD* genotipizacije za serološki slabe D tipove ili RhD negativne C/E pozitivne DDK bilo isplativije od serološkog testiranja s obzirom na potrebu samo jednokratnog određivanja, a ne prilikom svakog darivanja krvi (53). Prema Wagner-u najisplativija metoda bila bi zamjena određivanja D antigena u IAT-u s *RHD* probirom u mješavini uzoraka i koristeći sve *RHD* pozitivne krvne pripravke samo za RhD pozitivne primatelje krvi (67). Time bi trošak određivanja D antigena molekularnom analizom bio usporediv, ako ne i jeftiniji od dosadašnjeg serološkog određivanja D antigena. Flegel i suradnici u najnovijoj studiji o DEL varijantama objavljenoj 2020. godine, nakon provedbe analize koristi i rizika, zaključuju kako bi čak i mali doprinos sigurnosti transfuzijskog liječenja trebao prevagnuti u korist molekularnog DEL probira darivatelja koji su Rh-negativni rutinskom serologijom. Jasno je kako bi se uvođenjem takvog rutinskog DEL probira DDK mogao izbjeći sekundarni imunosni odgovor primjenom lažno RhD negativnih krvnih pripravaka (65).

Nedavno objavljene studije na području Europe su prikazale izračune molekularnog probira DDK. Crottet i suradnici su izračunali trošak molekularnog *RHD* probira i zaključili kako je cijena manja od 7€ (52,50 kn) po uzorku u Bernu a 10€ (75,30 kn) po uzorku u Zurichu. Cijena obuhvaća DNA izolaciju, *RHD* probir i genotipizaciju (114). Gassner i suradnici su procijenili da trošak pojedinačnog testiranja svakog RhD negativnog DDK iznosi 25 $ (153,25 kn), a sličan trošak od 21$ (128,73 kn) su prijavili Mota i suradnici, te naglasili kako bi se cijena reducirala za 50% kada bi se testiranje radilo u mješavini uzoraka darivatelja (84, 118). Flegel i suradnici 2009. g. su izračunali trošak *RHD* probira od 5$ (30,65 kn) za novog DDK. Napominju kako bi se ispitivanje moglo provesti u mješavini (npr. 20 uzoraka), smanjujući troškove na manje od jedne desetine gore navedene procjene (66). Naravno, svakog darivatelja treba testirati samo jednom i testiranje može biti centralizirano u jednoj ustanovi.

Temeljem rezultata dobivenih u ovom istraživanju, napravljena je procjena troškova molekularnog probira DDK. Postupak uključuje izolaciju genomske DNA, *RHD* probir u mješavini od 20 uzoraka te *RHD* genotipizaciju. Ukidanjem rutinskog određivanja D antigena u IAT-u serološki RhD negativnim DDK, što je sada obvezno

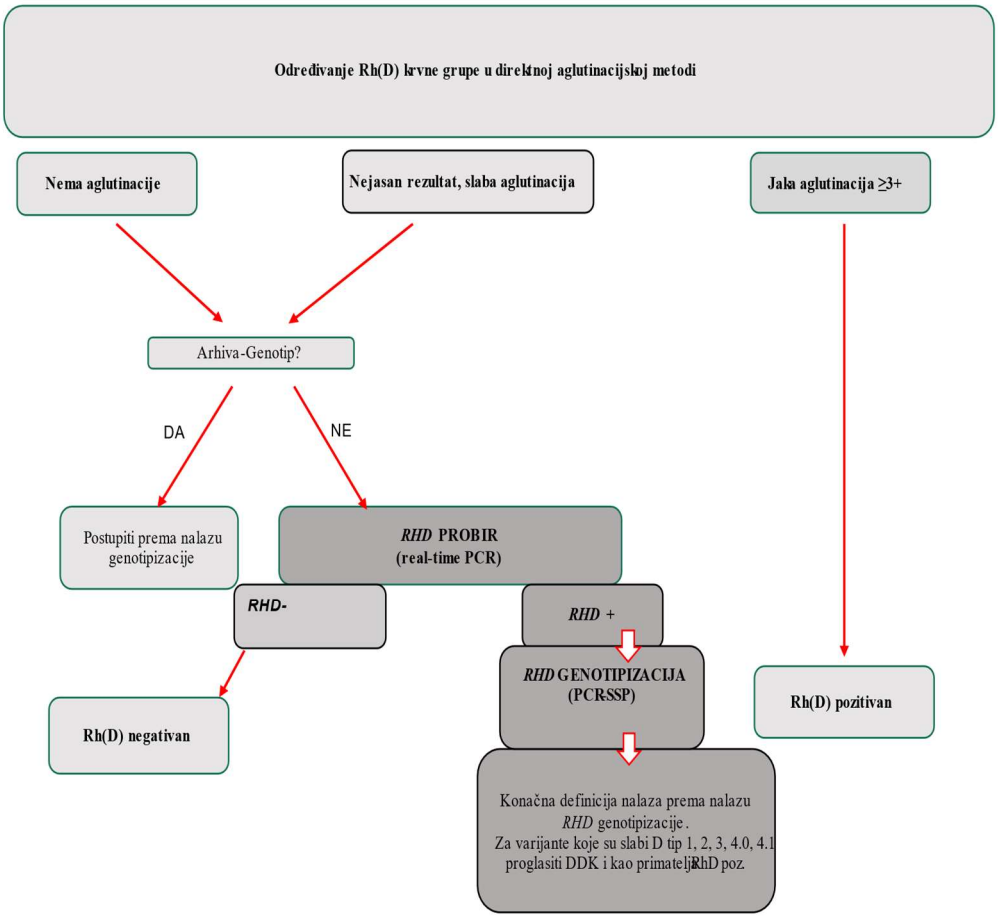
prema važećim smjernicama za otkrivanje slabih D varijanti i radi se u duplikatu kod novih DDK, i uvođenjem *RHD* probira u *pool-u*, ne bi se dodatno povećali troškovi ispitivanja RhD negativnih DDK. Samo serološki negativni nalazi dvostruko nadilaze trošak molekularnog probira u mješavini ako se rade u duplikatu. Uvođenje molekularnog probira ne bi zahtijevalo dodatno zapošljavanje osoblja, a može se odvijati u postojećem radnom prostoru s postojećom opremom. Centralizirano testiranje u jednoj ustanovi bi dodatno smanjilo troškove. U ovoj studiji 6/6533 (0,09%) uzoraka je poslano na sekvenciranje u referentni međunarodni IBGRL laboratorij gdje je dodatno razriješen *RHD* status za 2 DDK. To bi mogao biti dodatni trošak testiranja.

Uz moguću odluku o uvođenju *RHD* probira za DDK treba razmotriti čimbenik vremena jer je serološki nalaz relativno brz i gotov odmah dok bi se genotipizacija radila u mješavini više uzoraka koji bi se morali prikupljati određeno vrijeme. Svi ti postupci mogli bi značajno produžiti vrijeme izdavanja nalaza. S druge strane, jednom napravljena genotipizacija ne bi zahtijevala dodatna testiranja i uštedjela bi vrijeme i troškove u budućnosti. Zbog toga predlažemo molekularni probir koji je brza i isplativa strategija za dobivanje sigurnijih krvnih pripravaka koji ne bi mogli imunizirati primatelja. Nulti rizik teško se može postići, ali u usporedbi s određivanjem D antigena u IAT-u, sigurnost krvnih pripravaka bi se povećala.

Kako bi olakšali implementaciju *RHD* genotipizacije, u ovom radu je predložen algoritam rješavanja serološki slabih D varijanti. Svi diskrepantni nalazi određivanja D antigena kao i RhD negativni uzorci bili bi upućeni na *RHD* genotipizaciju. Nositelje slabih D tipova i DEL fenotipa bi proglasili RhD pozitivnima, dok bi velike hibride *RHD-CE* (2-9) *D-CE* zbog manjka ekspresije D antigena proglasili RhD negativnima (Slika 28.).

Podaci o učestalosti i razdiobi D varijanti u populaciji RhD negativnih darivatelja od iznimne su važnosti ne samo kao dokaz o postojanju slabo izraženih D varijanti koje nisu prepoznate standardnim rutinskim serološkim testovima, nego i doprinose smanjenju rizika aloimunizacije RhD negativnih primatelja krvi. *RHD* genotipizacija je opravdana i u populaciji pacijenata i trudnica. Osobe sa slabim D tipovima 1, 2, 3, 4.0 i 4.1 mogu biti proglašeni RhD pozitivnima kao primatelji krvi i na taj način štedimo ionako male zalihe RhD negativnih krvnih pripravaka, a značaj o dodatnoj skrbi za

trudnice glede racionalne primjene RhD imunoglobulina apsolutno je razvidan i opravdan (147).



Slika 28. Prijedlog integracije algoritma *RHD* genotipizacije u rutinsko testiranje DDK

7. ZAKLJUČAK

- Postotak otkrivanja RhD pozitivnih uzoraka se razlikovao između seroloških i molekularnih metoda (postotak dijagnostičke točnosti serološkog testiranja je 99,82%). Serološke metode određivanja D antigena imaju ograničenja pa je moguće dobiti lažno negativni rezultat, dok *RHD* genotipizacija nadilazi ta ograničenja i povećava sigurnost krvnih pripravaka smanjujući rizik imunizacije primatelja krvi.
- Od ukupno 6533 RhD negativna DDK, kod 23 (0,35%) darivatelja krvi je potvrđena prisutnost gena *RHD*, te u 52 % *RHD* PCR pozitivnih uzoraka potvrđen je i D antigen na membrani eritrocita. Većinu tih D varijanti čine DEL fenotipovi, koji se ne mogu otkriti standardnim serološkim testovima. *RHD* probir u mješavini od 20 uzoraka je moguća učinkovita i isplativa strategija za testiranje velikog broja uzoraka DDK.
- Potvrđena imunizacija (2,5%) kod primatelja DEL pozitivnog KE dokazuje da i mala količina D antigena na transfundiranim eritrocitima može potaknuti RhD imunizaciju primatelja krvi, a nije detektirana statistički značajna razlika u usporedbi s dosada prijavljenom učestalosti imunizacije.
- Rezultati učestalosti D varijanti u našoj populaciji su u korelaciji s rezultatima studija na populaciji središnje Europe i tek su male razlike u razdiobi pojedinih alela pa je opravdano da svaka zemlja provede populacijsku studiju i na osnovi prevalencije alela izabere optimalnu strategiju testiranja.
- U populaciji 263 darivatelja krvi kojima je serološki dokazan slabi oblik D antigena, najčešći tip varijante je slabi D tip 1, a slijede ga tip 3 i tip 2 (84,4% nositelja slabih D tipova 1, 2, i 3 u RH). Podaci koreliraju s većinom drugih europskih zemalja.
- Osjetljivost pojedinih monoklonskih reagensa u detekciji slabih D varijanti je varijabilna. Rezultati su pokazali kako je serološkim metodama moguće otkriti većinu slabih D varijanti, zahvaljujući osjetljivim reagensima, metodama

testiranja i automatiziranoj opremi, ali nije moguće razlikovati pojedine D varijante prema jačini aglutinacije s pojedinim monoklonskim reagensima.

- Uvođenje rutinskog *RHD* probira u „*pool-u"* i genotipizacije RhD negativnih DDK ne bi dovelo do povećanja financijskih sredstava koja se trenutno izdvajaju za serološko testiranje. Predloženi algoritam molekularnog ispitivanja D antigena kod DDK uključivao bi zamjenu određivanja D antigena u IAT-u s *RHD* probirom te u slučaju pozitivnog nalaza *RHD* genotipizaciju s definiranjem alela.

8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

Naslov: Važnost genotipizacije u RhD negativnih darivatelja krvi

Autor: Hana Safić Stanić, 2021.

Cilj: *RHD* genotipizacijom odrediti vrstu i učestalost alela *RHD* koji uzrokuju serološki slabe D varijante u populaciji dobrovoljnih darivatelja krvi (DDK) u Hrvatskoj. Procijeniti osjetljivost seroloških metoda u otkrivanju slabog i/ili parcijalnog D antigena u skupini DDK kojima je D antigen dokazan indirektnom metodom, te razdiobu pojedinih varijantnih D alela u toj skupini. **Metode**: Ukupno je obrađeno 6533 RhD negativnih DDK. Nakon izolacije genomske DNA u mješavini od 20 uzoraka, učinjen je RHD probir lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu. Uslijedila je genotipizacija pomoću PCR-SSP metode korištenjem komercijalnih kitova (Inno-Train, Njemačka), te DNA sekvenciranje 6 uzoraka. U studiju je bilo uključeno i 263 DDK kojima je dokazan D antigen samo indirektnom metodom kojima je učinjena *RHD* genotipizacija i definiranje *RHD* polimorfizma.

Rezultati: Od 6533 RhD negativnih DDK, 23 nositelja gena *RHD* su potvrđena (0,35%), svi C/E pozitivni. Dvanaest uzoraka je reklasificirano kao RhD pozitivni. Izračunata frekvencija klinički značajnih D alela je bila 1: 543 (0,18%) u populaciji RhD negativnih DDK, ili 1:53(1,89%) kod C/E pozitivnih DDK. U populaciji DDK sa slabijom ekspresijom D antigena utvrđeno je 84,4% nositelja slabih D tipova 1, 2, 3, a najveća je učestalost slabog D tipa 1.

Zaključak: Istraživanje je otkrilo značajan broj D varijantnih alela u populaciji RhD negativnih DDK. Darivatelji krvi koji su ranije bili tipirani kao RhD negativni su reklasificirani kao RhD pozitivni i time je povećana sigurnost transfuzijskog liječenja.

9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU - SUMMARY

Title: *RHD* genotyping relevance in RhD negative blood donors

Author: Hana Safić Stanić, 2021.

Aims: Determine the presence of *RHD* genes as well as the distribution of *RHD* alleles among RhD negative blood donors. Examine serologic accuracy in the detection of a weak and / or partial D antigen in donors with weak D antigen expression. **Methods**: A total of 6,533 samples obtained from D-negative Croatian donors were screened for the presence of *RHD* by RT- PCR method. PCR-SSP was performed for D variants genotyping by using commercial genotyping kits (Inno-Train, Kronberg, Germany). The study also included 263 voluntary blood donors with weaker expression of D antigen confirmed by indirect method, who underwent *RHD* genotyping. **Results**: 23 (0.35%) carriers of RHD alleles were identified. Twelve of them were redefined as RhD positive. The calculated frequency of clinically significant D alleles in RhD negative blood donors was 1:543(0.18%), or 1:53(1.89%) in C/E blood donors. Weak D type 1 was the most prevalent in the population of donors with weak D test positive. **Conclusion**: The study revealed a significant number of D variant alleles in a population of RhD negative blood donors. Those once typed as RhD negative were reclassified as RhD positive, increasing the safety of transfusion therapy.

10. POPIS LITERATURE

1. Westhoff C. The Rh Blood group system. U: Quinley ED, ur.Immunohematology: Principles and Practice. 3.Izd. Cambridge: Jones & Bartlett Learning; 2011. Str.139-149.
2. Daniels G. Variants of RhD- current testing and clinical consequences. Br J Haematol. 2013;161:461-470.
3. Storry JR, Castilho L, Chen Q, Daniels G, Denomme G, Flegel WA i sur. International society of blood transfusion working party on red cell immunogenetics and terminology: report of the Seoul and London meetings. ISBT Sci Ser. 2016;11(2):118-122.
4. Daniels G, Poole G, Poole J. Partial D and weak D: can they be distinguished? Transfusion medicine.2006;17(2);145–146.
5. Lai M, Grasso C, Boschi I, D´Onoforio G, Pascali V, Leone G. Characterization of anti-D monoclonal antibody reagents based on their reactivity with the weak D phenotype. Transfusion.2009;49:937-942.
6. Garratty G. Do we need to be more concerned about weak D antigens? Transfusion. 2005;45(10):1547-1551.
7. Rhesus Base web stranica [Internet]. (Pristupljeno 25.06. 2020.). Dostupno na: http://www.rhesusbase.info/ .
8. Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for *RH*. Transfusion and Apheresis Science. 2011;44:81–91.
9. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Müller TH, i sur. Weak D alleles express distinct phenotypes. Blood. 2000;95(8):2699–2708.
10. Noizat-Pirenne F, Verdier M, Lejealle A, Mercadier A, Bonin P, Peltier-Pujol F i sur. Weak D phenotypes and transfusion safety: where do we stand in daily practice? Transfusion. 2007;47(9):1616-20.

11. Denomme GA, Dake LR, Vilensky D, Tramyar L, Judd WJ. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. Transfusion. 2008;48:473-478.
12. Wagner T, Körmöczi GF, Buchta C, Vadon M, Lanzer G, Mayr WR i sur. Anti-D immunization by DEL red blood cells. Transfusion 2005;45:520-560.
13. Landsteiner K. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. Centralblatt f. Bakteriologie, Parasitenkunde u Infektionskrankheiten. 1900:27;357–362.
14. Levine P, Stetson RE. An unusual case of intra-group agglutination. JAMA 1939; 113(2):126-127.
15. Pierce SR, Reid ME. Bloddy Brilliant. Bethesda Maryland: AABB Press; 2016.
16. Hecimovic A. Povijest bolesti: Hemolitička bolest novorođenčeta. Transfuziološki Vjesnik. 2019;(61).
17. Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. Proc Soc Exp Biol.1940;43:223.
18. Levine P, Newark NJ, Burnham L, Englewood NJ, Katzin EM, Vogel P i sur.The Role of Iso-Immunization in the Pathogenesis of Erythroblastosis Fetalis. American Journal of Obstetrics and Gynecology.1941:42;925-937.
19. Stratton F. A new Rh allelomorph. Nature.1946;158:25.
20. Argall CI, Ball JM, Trentelman E. Presence of anti-D antibody in the serum of a Du patient. J Lab Clin Med. 1953;41(6):895-898.
21. Simmons RT, Krieger VI. Anti-Rh (D) antibodies produced by isoimmunization in an Rh positive woman of the unusual genotype (CDue/CdE) Medical Journal of Australia.1960;2:1021–1022.
22. Ostgård P, Fevang F, Kornstad L. Anti-D in a 'D positive' mother giving rise to severe haemolytic disease of the newborn. A dilemma in antenatal immunohaematological testing. Acta Paediatr Scand. 1986;75(1):175-8.
23. Daniels G, Poole J, De Silva M, Callaghan T, MacLennan S, Smith N. The clinical significance of blood group antibodies. Transfusion medicine. 2002;12:287-295.
24. Flegel WA. The genetics of the Rhesus blood group system. Blood Transfusion. 2007;5(2):50-57.

25. Le van Kim C, Mouro I, Chérif-Zahar B, Raynal V, Cherrier C, Cartron JP i sur. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. Proc Natl Acad Sci U S A.1992;89(22):10925-10929.
26. Wagner FF, Flegel WA. RHCE represents the ancestral RH position, while RHD is the duplicated gene. Blood. 2002;99:2272-2273.
27. Okuda H, Kajii E. The evolution and formation of RH genes. Leg Med. 2002;4(3):139-155.
28. Dohmen SE. The human immune response to Rh antigens [disertacija]. Sveučilište u Amsterdamu, Medicinski fakultet; 2008.
29. Daniels G. Rh and RHAG blood group systems. U: Human Blood groups. 3. izd. Oxford: Blackwell Science; 2013. Str. 182-258.
30. Choate JD. ABO and Rh Blood Group in Clinical Principles of Transfusion Medicine. Elsevier; 2018: str.15-24.
31. Van Kim CL, Colin Y, Cartron JP. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. Blood Rev. 2006;20:93-110.
32. Guzijan G. Molekularna dijagnostika varijanti slabijeg oblika antigena D u populaciji davalaca krvi Republike Srpske [disertacija]. Banja Luka: Sveučilište u Banja Luci, Medicinski fakultet; 2017.
33. Westhoff CM. The Structure and Function of the Rh antigen Complex. Semin Hematol. 2007:44;42-50.
34. Marini AM, Matassi G, Raynal V, Andre B, Cartron JP, Cherif-Zahar B. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. Nat Genet. 2000;26:341–344.
35. Westhoff CM, Ferreri-Jacobia M, Mak D-OD, Foskett JK. Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter. J Biol Chem. 2002;277:12499–12502.
36. Khademi S, O'Connell J, Remis J, Robles-Colmenares Y, Miercke LJ, Stroud RM. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 A. Science. 2004;305:1587–1594.
37. Conroy MJ, Bullough PA, Merrick M, Avent ND. Modelling the human rhesus proteins: implications for structure and function. Br J Haematol. 2005;131:543–551.

38. Liu Z, Chen Y, Mo R, Hui C, Cheng JF, Mohandas N i sur. Characterization of human RhCG and mouse Rhcg as novel nonerythroid Rh glycoprotein homologues predominantly expressed in kidney and testis. J Biol Chem. 2000;275:25641–25651.
39. Liu Z, Peng J, Mo R, Hui CC, Huang CH. Rh type B glycoprotein is a new member of the Rh superfamily and a putative ammonia transporter in mammals. J Biol Chem.2001;276:1424–1433.
40. Weiner ID, Verlander JW. Renal and hepatic expression of the ammonium transporter proteins, Rh B Glycoprotein and Rh C Glycoprotein. Acta Physiol Scand.2003;179:331–338.
41. Weiner ID, Miller RT, Verlander JW. Localization of the ammonium transporters, Rh B glycoprotein and Rh C glycoprotein, in the mouse liver. Gastroenterology. 2003;124:1432–1440.
42. Dean L. The Rh blood group u: Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. [pristupljeno 16.11.2020.]. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2269/
43. Beckers EA, Faas BH, Ligthart P, Overbeeke MA, von dem Borne AE, van der Schoot CE i sur. Lower antigen site density and weak D immunogenicity cannot be explained by structural genomic abnormalities or regulatory defects of the RHD gene.Transfusion. 1997;37(6):616-623.
44. Gu J, Sun AY, Wang XD, Shao CP, Li Z, Huang LH i sur. Analysis of density and epitopes of D antigen on the surface of erythrocytes from DEL phenotypic individuals carrying the RHD1227A allele. Blood Transfus. 2014;12(2):244-9.
45. Wagner FF, Eicher N, Jørgensen JR, Lonicer CB, Flegel WA. DNB: a partial D with anti-D frequent in Central Europe. Blood 2002;100:2253-2256.
46. Lukacevic Krstic J, Dajak S, Bingulac-Popovic J, Dogic V, Mratinovic-Mikulandra J. Anti-D reagents should be chosen accordingly to the prevalence of D variants in the obstetric population. JCLA. 2018;32(3):1-7.
47. Klein HK, Anstee DJ. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 11. Izd. Oxford; Blackwell Publishing:2005.

48. Frohn C, Dumbgen L,Husse Brand JM i sur. Probability of anti-D development in D- patients receiving D+ RBCs. Transfusion. 2003;43:893–898.
49. Yazer MH, Triulzi DJ. Detection of anti-D in D– recipients transfused with D+ red blood cells. Transfusion 2007;47:2197–2201.
50. Gonzalez-Porras JR, Graciani IF, Perez-Simon JA, Martin-Sanchez J, Encinas C, Conde MP, Nieto MJ, Corral M. Prospective evaluation of a transfusion policy of D+ red blood cells into D− patients. Transfusion 2008;48:1318–1324.
51. Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. Blood. 1991;78:2747–2752.
52. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A i sur. 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;95:12-18.
53. Guzijan G, Milosavić M, Radojković Sredić D, Lilić M, Jukić B. Molecular typing of RhD-negative blood donors with C and/or E antigen. Scr Med. 2019;50(2):98-102.
54. Agre PC, Davies DM, Issitt PD, Lamy BM, Schmidt PJ, Treacy M, Vengelen-Tyler V. A proposal to standardize terminology for weak D antigen.Transfusion.1992;32(1):86-87.
55. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. Blood. 1999;93:385-393.
56. Müller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schönitzer D, Schunter F, Gassner C. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. Transfusion. 2001;41(1):45-52.
57. Dogic V, Bingulac-Popovic J, Babic I, Hundric-Haspl Z, Jurakovic-Loncar N, Mratinovic-Mikulandra J, Vuk T, Balija M, Jukic I. Distribution of weak D types in the Croatian population. Transfus Med. 2011;21:278 –279.
58. Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Le Pennec PY, Roussel M, Patereau C. RHD variants in whites: consequences for checking clinically relevant alleles. Transfusion 2004;44:1282-1286.

59. Legler TJ, Maas JH, Kohler M, Wagner T, Daniels GL, Perco P, Panzer S. RHD sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. Transfus. Med. 2001;11:383-388.
60. Hundric-Haspl Ž. Prijedlog novih algoritama za određivanje D antigena dobrovoljnim davateljima krvi, bolesnicima, trudnicama i novorođenčadi. Transfuziološki vjesnik. 2007;(44).
61. Argall CI, Ball JM, Trentelman E. Presence of anti-D antibody in the serum of a DU patient. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 1953;41:895–898.
62. 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(1):10-19.
63. Nuchnoi P, Thongbus J, Srisarin A, Kerdpin U, Prachayasittikul V. Clinical and Laboratory Update on the DEL Variant. Laboratory Medicine. 2014;45(4):285-290.
64. Kwon DH, Sandler SG, Flegel WA. DEL phenotype. Immunohematology 2017;33:125-132.
65. Flegel WA, Wagner FF. DEL. Blood Transfus. 2020;18(3):159-162.
66. Flegel WA, von Zabern I, Wagner FE. Six years´ experience performing RHD genotyping to confirm D- red blood cell units in Germany for preventing anti D-immunizations. Transfusion. 2009;49:465-471.
67. Wagner FF. RHD PCR of D-Negative Blood Donors. Transfus Med Hemother. 2013; 40(3):172-81.
68. Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. Transfusion. 2005;45:1581-1584.
69. 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;29:361-365.
70. Shao CP, Wang BJ, Ye SH, Zhang WL, Xu H, Zhuang NB i sur. DEL RBC transfusion should be avoided in particular blood recipient in East Asia due to allosensitization and ineffectiveness. J Zhejiang Univ Sci B. 2012;13:913-918.
71. Yang HS, Lee MJ, Park TS, Cho SY, Lee HJ, Lim G i sur. Primary anti-D alloimmunization induced by "Asian type" RHD (c.1227G>A) DEL red cell transfusion. Ann Lab Med. 2015;35:554-556.

72. Shao CP, Xu H, Xu Q, Sun GD, Li JP, Zhang BW, i sur. Antenatal Rh prophylaxis is unnecessary for "Asia type" DEL women. Transfus Clin Biol. 2010;17:260-266.
73. Wang M, Wang BL, Xu W, Fan DD, Peng ML, Pan J, i sur. Anti-D alloimmunisation in pregnant women with DEL phenotype in China. Transfus Med. 2015;25:163-169.
74. Flegel WA. Modern Rhesus (Rh) typing in transfusion and pregnancy. *CMAJ*. 2021;193(4):E124.
75. Flegel WA . Blood group genotyping in Germany. Transfusion. 2007;47:47–53.
76. Kumpel B. Are weak D RBCs really immunogenic? Transfusion. 2006;46(6):1062-1066.
77. Schmidt PJ. Are weak D red blood cells really immunogenic? Transfusion. 2006; 46(11):2029-2030.
78. Snhmidt PJ, Morrison EG, Shohl J. The antigenicity of the Rh-o (Du) blood factor. Blood. 1962;20:196-202.
79. Hussein E, Teruya J. Weak D Types in the Egyptian Population, American Journal of Clinical Pathology. 2013;139(6):806–811.
80. Williams M . Monoclonal reagents for rhesus-D typing of Irish patients and donors: a review. Br J Biomed Sci. 2000;57:142–149.
81. Gorick B, McDougall DC, Ouwehand WH, Overbeeke MA, Tippett P, Hughes-Jones NC, van Rhenen DJ. Quantitation of D sites on selected 'weak D' and 'partial D' red cells. Vox Sang. 1993;65(2):136-40.
82. Flegel WA, Khull SR, Wagner FF. Primary anti-D immunization by weak D type 2 RBCs. Transfusion. 2000;40(4):428-34.
83. Mota M, Fonseca NL, Rodrigues A, Kutner JM, Castilho L. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. Vox Sang. 2005;88(2):130-5.
84. Gassner C, Doescher A, Drnovsek TD, Rozman P, Eicher NI, Legler TJ, i sur. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. Transfusion. 2005;45(4):527-538.
85. Wagner FF, Flegel WA. The Rhesus site. Transfus Med Hemother. 2014;41:357-363.

86. Tounsi WA, Madgett TE, Avent ND. Complete *RHD* next-generation sequencing: establishment of reference *RHD* alleles. Blood Adv. 2018;2(20):2713-2723.
87. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. Blood 2000;95(2):375-387.
88. Westhoff CM. Blood group genotyping. Blood 2019;133(17):1814–1820.
89. Jurakovic Loncar N, Stojić Vidović M. Preporuke za imunohematološko testiranje davatelja krvi u transfuzijskoj djelatnosti RH [Internet]. Hrvatski Zavod za transfuzijsku medicinu [pristupljeno 25.06.2020].
90. https://hr.wikipedia.org/wiki/Sekvenciranje [Internet]. Pristupljeno 2.1.2021.
91. Safic Stanic H, Dogic V, Herceg I, Jagnjic S, Bingulac-Popovic J, Babic I, i sur. D variants in the population of D-negative blood donors in the north-eastern region of Croatia. Transfus Med. 2020 (E-izdanje objavljeno prije printanja).
92. Xhetani M, Seferi I, Férec C, Zoraqi G, Fichou Y. Distribution of Rhesus blood group antigens and weak D alleles in the population of Albania. Blood Transfus. 2014; 12(4): 565–569.
93. Kim TY, Hong YJ, Kim MJ, Kim H, Kim TS, Park JS, i sur. Recommendations Regarding Practical DEL Typing Strategies for Serologically D-Negative Asian Donors. Transfus Med Hemother. 2020;47(1):88-93.
94. Basu S, Kaur R, Kaur G. Hemolytic disease of the fetus and newborn: Current trends and perspectives. Asian J Transfus Sci. 2011;5(1):3-7.
95. Westhoff CM. Review: The Rh blood group D antigen -dominant, diverse, difficult. Immunohematology. 2005;21:155–163.
96. Jenkins CM, Johnson ST, Bellissimo DB, Gottschall JL. Incidence of weak D in blood donors typed as D positive by the Olympus PK 7200. Immunohematology. 2005;21(4):152-154.
97. Castillo B, Dasgupta A, Klein K, Tint H, Wahed A. Red cell antigens and antibody. U: Transfusion Medicine for Pathologists. Elsevier: 2018. Str. 69-112.
98. Souza Silva TC, Cruz BR, Costa SS, Chiba AK, Barros MMO, Langhi DM, i sur. RHD and RHCE molecular analysis in weak D blood donors and in patients with Rh antibodies against their own corresponding Rh antigen. Blood Transfus. 2020;18(4):295-303.

99. Campbell-Lee SA, Gvozdjan K, Choi KM, et al. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: assessment of transfusion protocols during two time periods. Transfusion. 2018;58:1588–96.
100. Moreira-Júnior G, Bordin JO, Kuroda A, Kerbauy J. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: the influence of racial and antigenic pattern differences between donors and recipients in Brazil. Am J Hematol. 1996;52:197–200.
101. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM). Blood group testing of blood donors and donations [Internet]. 20.Izd. The Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components ;2020. [Pristupljeno 11.11.2020.].
102. Engelfriet CP, Reesink HW, Fontao-Wendel R, Kormoczi GF, Mayr WR, Panzer S. Testing for weak D. Vox Sang. 2006;90(2):140–153.
103. Denomme GA. Prospects for the provision of genotyped blood for transfusion. Br J Haematol. 2013;163(1):3-9.
104. Christiansen M, Samuelsen B, Christiansen L, Morbjerg T, Conny B, Niels G. Correlation between serology and genetics of weak D types in Denmark. Transfusion. 2008;48:187-93.
105. Van Sandt VS, Gassner C, Emonds MP, Legler TJ, Mahieu S, Körmöczi GF. RHD variants in Flanders, Belgium. Transfusion. 2015;55:1411-1417.
106. Clarke G, Hannon J, Berardi P, Barr G, Cote J, Fallis R, i sur. Resolving variable maternal D typing using serology and genotyping in selected prenatal patients. Transfusion. 2016;56(12):2980-2985.
107. Denomme GA, Wagner FF, Fernandez BJ, Wei L, Flegel WA. Partial D, weak D types, and novel *RHD* alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. Transfusion. 2005;45:1554–1560.
108. Bub CB, Aravechia MG, Costa TH, Kutner JM, Castilho L. RHD alleles among pregnant women with serologic discrepant weak D phenotypes from a multiethnic population and risk of alloimmunization. J Clin Lab Anal. 2018;32(1):e22221.
109. Contreras M, Knight RC. Controversies in transfusion medicine. Testing for Du. Transfusion. 1991;31(3):270-272.

110. Hussein E, Teruya J. Serologic findings of RhD alleles in Egyptians and their clinical implications. Transfus and Apheres Sci 2014;51:184-7.
111. Moussa H, Tsochandaridis M, Chakroun T,Jridi S, Abdelneji B, Hmida S, i sur. Molecular background of D-negative phenotype in the Tunisian population. Transfus Med. 2012;22:192-198.
112. Perez-Alvarez I, Hayes C, Hailemariam T, Shin E, Hutchinson T, Klapper E. RHD genotyping of serologic RhD-negative blood donors in a hospital-based blood donor center. Transfusion 2019;59:2422-28.
113. Gowland P, Gassner C, Hustinx H, Stolz M, Gottschalk J, Tissot JD. Molecular RHD screening of RhD negative donors can replace standard serological testing for RhD negative donors. Transfus and Apheres Sci. 2014;50:163-168.
114. Crottet SL, Henny C, Meyer S, Still F, Stolz M, Gottschalk J, i sur. Implementation of a mandatory donor RHD screening in Switzerland. Transfus and Apheres Sci 2014;50:169-174.
115. Orzinska A, Guz K, Polin H, Pelc-Klopotowska M, Bednarz J, Gielezynska A i sur. RHD variants in Polish blood donors routinely typed as D-. Transfusion 2013;53:2945-2953.
116. Polin H, Danzer M, Gaszner W, Broda D, St-Louis M, Proll J i sur. Identification of RHD alleles with the potential of anti-D immunization among seemingly D-blood donors in Upper Austria. Transfusion 2009;49:676–681.
117. Christiansen M, Sorensen BS, Grunnet N. RHD positive among C/E+ and D-blood donors in Denmark. Transfusion 2010;50:1460–1464.
118. Mota M, Dezan M, Valgueiro MC, Sakashita AM, Kutner JM, Castilho L. RHD allelic identification among D-Brazilian blood donors as a routine test using pools of DNA. J Clin Lab Anal. 2012;26(2):104-108.
119. Qun X, Grootkerk-TaxM GHM, Maaskant-van Wijk PA, van der Schoot C E. Systemic analysis and zigosity determination of the *RHD* gene in a D negative Chinese Han population reveals a novel D- negative *RHD* gene. Vox Sang 2005;88:35–40.
120. Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. BMC Genet. 2001;2:10.

121. Wagner FF, Kasulke D, Kerowgan M, Flegel WA. Frequencies of the blood groups ABO, Rhesus, D category VI, Kell, and of clinically relevant high-frequency antigens in south-western Germany. Infusionsther Transfusionsmed. 1995;22:285-290.
122. Garcia F, Rodriquez MA, Viedma M, Navarro T, Quesada S, Sierra M, i sur. D negative red blood cell units genotyping: variants encountered in Madrid (Spain) compared to Those in Germany. Vox Sang. 2010;99:350.
123. Körmöczi GF, Gassner C, Shao CP, Uchikawa M, Legler TJ. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. Transfusion 2005;45(10):1561-1567.
124. Guzijan G, Jovanovic Srzentic S, Pavlovic Jankovic N, Djilas I, Lilić M. Implementation of Molecular RHD Typing at Two Blood Transfusion Institutes from Southeastern Europe. Transfus Med Hemother 2019;46:114-120.
125. Wagner FF, Mardt I, Bittner R, Döscher A. Single adsorption/elution with anti-D may be insufficient to determine the D antigen status of very weak DEL al-leles Transfusion. 2012;52(suppl S3):35.
126. St-Louis R. DEL blood donors alloimmunised patients: the Canadian experience. Vox Sang. 2012;103(suppl 1):14.
127. Rupreht RR, Hartman KP, Galvani V, Rožman P, Šerbec VČ. Weak D and partial D in Slovenian population through serology and genotyping. Pflugers Arch. 2000;440(Suppl 1):195-196.
128. Scott SA, Nagl L, Tilley L, Liew YW, Condon J, Flower R, i sur. The RHD(1227G>A) DEL-associated allele is the most prevalent DEL allele in Australian D- blood donors with C+ and/or E+ phenotypes. Transfusion. 2014;54:2931-40.
129. Dajak S, Dogic V, Mratinović-Mikulandra J. DEL phenotype is more common in some parts of European population than initially thought. Transfus Clin Biol. 2016;23(2):110-111.
130. Flegel WA. Homing in on D antigen immunogenicity.Transfusion. 2005;45:466 - 468.
131. Sandler SG, Flegel WA. Does transfusion of Asian-type DEL red blood cells to D-recipients cause D alloimmunization? Transfusion. 2019;59(7):2455-2458.

132. Chen Q, Liu Z. Retrospective analysis of transfusion Del blood to RhD-negative recipients. Transfusion 2012;52 (Suppl):36.
133. International Forum: Testing for weak D. Vox Sanguinis. 2006;90:140–153.
134. Krog GR, Clausen FB, Berkowicz A, Jorgensen N, Rieneck L, Nielsen LK, i sur. Is current serologic RhD typing of blood donors sufficient for avoiding immunization of recipient? Transfusion 2011;51:2278-2285.
135. Araújo F, Rodrigues MJ, Monteiro F, Chabert T, Tavares G, Sousa G i sur. Weak D type 2 is the most prevalent weak D type in Portugal. Transfus Med. 2006;16:63-67.
136. Rodrigues MJ, Rodrigues F, Tilley L, Poole J, Chabert T, Souza G. Several new examples of weak D type 38 in the Portuguese population. Transfusion. 2006;46(Suppl.):141A–142A.
137. Costa S, Martin F, Chiba A, Langhi D, Jr, Chiattone C, Bordin J. RHD alleles and D antigen density among serologically D− C+ Brazilian blood donors. Transfus Med. 2014;24(1):60–61.
138. St-Louis M, Richard M, Côté M, Ethier C, Long A. Weak D type 42 cases found in individuals of European descent. Immunohematology. 2011;27(1):20-24.
139. Jagnjić S. Iskustva Hrvatskog Zavoda za transfuzijsku medicinu u određivanju serološki slabih D fenotipova u: RhD-izrada novih smjernica testiranja bolesnika i trudnica;2018: str. 59-68.
140. Abdelrazik AM, Elshafie SM, Ezzat Ahmed GM, Abdelaziz HM. Combining serology and molecular typing of weak D role in improving D typing strategy in Egypt. Transfusion. 2013;53(11 suppl 2):2940-2944.
141. Dezan MR, Guardalini LGO, Pessoa E, Ribeiro IH, Oliveira VB, Luz F, i sur. Evaluation of the applicability and effectiveness of a molecular strategy for identifying weak D and DEL phenotype among D- blood donors of mixed origin exhibiting high frequency of RHD*Ψ. Transfusion. 2018;58(2):317-322.
142. Pham BN, Roussel M, Peyrard T, Beolet M, Jan-LAssere V, Gien D i sur. Anti-D investigations in individuals expressing weak D Type 1 or Weak D Type 2: Allo- or autoantibodies? Transfusion. 2011;51:2679–2685.

143. Yazer MH, Brunker PA, Bakdash S, Tobian AA, Triulzi DJ, Earnest V, Harris S, Delaney M. Low incidence of D alloimmunization among patients with a serologic weak D phenotype after D+ transfusion. Transfusion. 2016;56(10):2502-2509.
144. Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, Denomme GA, Delaney M, Keller MA, i sur. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. Transfusion. 2015;55(3):680-9.
145. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Godišnje izvješće o radu stacionarnih zdravstvenih ustanova u 2019.godini [Internet] Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2019 [Pristupljeno 02.Studeni,2020.]. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2020/09/Rad-bolnica-u-Hrvatskoj-2019.pdf .
146. Blood safety and donation, Fact sheet. World Health Organization. [Internet]. Dostupno na: https://www.who.int [Pristupljeno 10.09.2020].
147. Flegel WA, Denomme GA, Queenan JT, Johnson ST, Keller MA, Westhoff CM, i sur. It's time to phase out "serologic weak D phenotype" and resolve D types with RHD genotyping including weak D type 4. Transfusion. 2020;60(4):855-859.

11. KRATKA BIOGRAFIJA

Rođena je 8. veljače 1985. godine u Livnu. Osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje završila je u Visu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu je upisala 2003.g. a diplomirala u predviđenom roku na Medicinskom fakultetu 2009.g. Pripravnički staž odradila je u KB *Sveti Duh*. Nakon završetka staža 2011.g. zaposlila se u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, kao liječnik na Odjelu za davalaštvo krvi. Godine 2016. započinje specijalizaciju iz transfuzijske medicine. Iste godine upisuje poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.
Godine 2019. upisuje i završava poslijediplomski specijalistički studij Transfuzijska medicina pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Član je Hrvatske liječničke komore. Od 2012. godine aktivno sudjeluje na kongresima Hrvatskoga transfuziološkog društva. Do sada je objavila devet stručnih radova u međunarodno citiranim časopisima i više kongresnih sažetaka.

Udata je i majka jednog djeteta.

PRILOZI

Prilog 1

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET
ETIČKO POVJERENSTVO

Obavijest za ispitanike

Poštovana/poštovani,

pozivamo Vas da u svojstvu ispitanika sudjelujete u znanstvenom istraživanju, čiji je glavni cilj istražiti učestalost i značaj pojedinih alela gena RHD u populaciji dobrovoljnih darivatelja krvi. Istraživanje se provodi u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, koji će ujedno i financirati ovo istraživanje, a voditelj istraživanja je Hana Safić Stanić, dr.med.

Molimo Vas da pažljivo pročitate ovu obavijest jer su u njoj sadržani podaci koji ce Vam pomoći da odlučite želite li sudjelovati u ovom znanstvenom istraživanju, te zašto i kako se ono provodi. U slučaju da neke dijelove sadržaja ne razumijete, molimo Vas da se s pitanjima obratite liječniku koji vodi ovo znanstveno istraživanje ili prisutnom liječniku na terenu.

RhD krvna grupa je, uz ABO krvnu grupu, klinički najznačajnija, te se obavezno prilikom svakog darivanja krvi potvrđuje svakom darivatelju krvi. D antigen može kod nepodudarnosti snažno potaknuti imuni odgovor i dovesti do stvaranje anti-D protutijela, te izazvati poslijetransfuzijske hemolitičke reakcije i hemolitičku bolest novorođenčeta. Više od 85% europske populacije je RhD pozitivno, dok oko 14% bijelaca nema D antigena na svojim eritrocitima (RhD negativno). Oko 1% bijelaca ima promijenjenu strukturu D antigena (slabi ili parcijalni D antigen). Osobe sa slabim D antigenom imaju smanjenu gustoću D antigena na eritrocitima bez promjene u površinskoj strukturi antigena, zbog čega ne razvijaju anti-D protutijela, pa stoga mogu biti transfundirani D pozitivnim krvnim pripravcima, a trudnice ne moraju primiti hiperimuni anti-D imunoglobulin (zaštitnu injekciju). Kod osoba nositelja parcijalnog D antigena nedostaje dio površinske strukture antigena na eritrocitima, zbog čega se može razviti anti-D imunizacija nakon transfuzije D pozitivne krvi ili tijekom trudnoće. Ove osobe, zbog

toga, ne smiju biti transfundirane s D pozitivnim krvnim pripravcima, a kao trudnice moraju biti obuhvaćene zaštitom hiperimunim anti-D imunoglobulinom.

U svakodnevnom rutinskom određivanju krvnih grupa koriste se serološke dijagnostičke metode.

Zbog iznimno malih razlika, serološkim rutinskim metodama je vrlo teško razlikovati pojedine tipove promijenjenog D antigena, te ih je moguće ustanoviti jedino molekularnim metodama. Nakon molekularnog ispitivanja moći će se donijeti jasna odluka o načinu transfuzijskog liječenja i o potrebi primjene zaštitne injekcije kod trudnica, odnosno racionalnije ćemo trošiti zalihe D negativne krvi, te smanjiti nepotrebnu potrošnju hiperimunog anti-D imunoglobulina i ujedno smanjiti rizike njegove primjene.

Ekstremni oblik slabog D antigena je DEL fenotip, kod kojeg je D antigen toliko slabo izražen na površini eritrocita, da se može otkriti samo metodom adsorpcije i elucije, te molekularnim metodama. Takve osobe budu redovito proglašene RhD negativnima, a transfuzija njihove krvi može uzrokovati imunizaciju i razvoj anti-D protutijela kod RhD negativnog bolesnika, zbog čega sve veći broj razvijenih zemalja uvodi molekularni probir na prisutnost DEL-a u skupini RhD negativnih darivatelja krvi.

Cilj istraživanja

Ovim bismo istraživanjem dokazali da se novim, molekularnim metodama određivanja RhD krvne grupe može smanjiti nepotrebna potrošnja RhD negativne krvi i hiperimunog anti-D imunoglobulina.

Drugi cilj ovog istraživanja je, prema dobivenim rezultatima, procijeniti potrebu uvođenja obaveznog molekularnog probira na prisustvo DEL fenotipa u skupini RhD negativnih darivatelja krvi, čime bi se spriječila imunizacija RhD negativnih bolesnika nakon transfuzije.

Zato je potrebno na uzorcima istodobno napraviti uobičajene pretrage kao do sada, ali i one nove, molekularne na nivou nukleinske kiseline (DNA).

Vaša uloga u ovom znanstvenom istraživanju

Ako se složite sa sudjelovanjem u istraživanju bit će Vam jednokratno uzet dodatni uzorak krvi na EDTA (6 mL) iz kojeg ćemo izolirati Vašu DNA. Iz uzorka DNA, koji će biti korišten samo u ovom istraživanju i neće se koristiti u druge svrhe, će se utvrditi prisutnost gena *RHD* odnosno njegov genotip. Uzorci izolirane DNA će se čuvati do završetka istraživanja, a najduže do 3 godine, nakon čega će biti uništeni sukladno važećim zakonskim propisima u RH.

Vaš identitet biti će zaštićen na način da se uzorci obilježe isključivo identifikacijskim brojem donacije (numeričkim i linijskim kodom), sve podatke prikuplja voditelj studije kojemu su podaci o Vama dostupni unosom broja donacije u kompjuterski program HZTM. Vaši podaci ce se obrađivati elektronički i pri tome će se koristiti broj donacije, a ne Vaše ime i prezime (ili drugi identifikacijski podaci). Vašu dokumentaciju moći će pregledati samo medicinski djelatnici koji sudjeluju u istraživanju, predstavnici Etičkog povjerenstva u našoj ustanovi i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta.

Podaci dobiveni istraživanjem mogu imati znanstvenu vrijednost, te će u tom slučaju biti objavljeni u znanstvenim publikacijama, pri čemu će Vaš identitet ostati anoniman.

Ovo istraživanje pregledalo je i odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta

Sveučilišta u Zagrebu, kao i Etičko povjerenstvo Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu. Istraživanje se provodi u skladu sa svim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju uključujući Osnove dobre laboratorijske prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske

Vaše sudjelovanje u ovom istraživanju je dobrovoljno. Ovo istraživanje ne uključuje nikakav rizik osim uobičajenog svakodnevnog rizika u svezi s vađenjem krvi, a moguće neizravne koristi su unapređenje kvalitete transfuzijske terapije. Ako odlučite

sudjelovati, potrebno je potpisati suglasnost o sudjelovanju čiji jedan primjerak ostaje kod Vas. U bilo koje vrijeme možete slobodno, bez navođenja razloga i bez posljedica prekinuti sudjelovanje u istraživanju. Ako odlučite prekinuti sudjelovanje, molimo Vas da o tome na vrijeme obavijestite liječnika koji vodi ovo znanstveno istraživanje. Nepristanak na sudjelovanje u ovom istraživanju neće utjecati na vaše daljnje darivanje krvi, kao niti na odnos medicinskog osoblja prema Vama.

Liječnik - istraživač koji provodi ovo istraživanje neće primiti nikakvu financijsku naknadu.

Za dodatne podatke slobodno se obratite liječniku koji vodi istraživanje:

Dr. Hana Safić Stanić

HRVATSKI ZAVOD ZA TRANSFUZIJSKU MEDICINU

Odjel za davalaštvo krvi

Petrova 3, Zagreb

Tel: 46 00 328

e-mail: hsafic@gmail.com

Prilog 2

Hvala Vam što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju.

Ako ste odlučili sudjelovati, molimo Vas da potpišete Suglasnost za sudjelovanje.

SUGLASNOST ZA SUDJELOVANJE

Upoznat sam sa svim detaljima i koristima, te eventualnim mogućim rizicima ovog istraživanja od strane liječnika, te pristajem da se isto provede.

IME I PREZIME ISPITANIKA:_____

POTPIS:_____

DATUM:_____

Voditelj istraživanja: Hana Safić Stanić, dr.med.
