



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI

MEDICINSKI FAKULTET

GORDANA GUZIJAN

**MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA
VARIJANTI SLABIJEG OBLIKA
ANTIGENA D U POPULACIJI DAVALACA
KRVI REPUBLIKE SRPSKE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2017.



UNIVERSITY OF BANJA LUKA

FACULTY OF MEDICINE

GORDANA GUZIJAN

**MOLECULAR DIAGNOSTIC OF WEAK D
VARIANTS AMONG THE BLOOD DONORS
POPULATION OF REPUBLIC OF SRPSKA**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2017.

KOMISIJA ZA OCJENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

MENTOR

Prof. dr Dragomir Marisavljević, redovni profesor
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE

Prof. dr Predrag Grubor, redovni profesor
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci

Prof. dr Milan Skrobić, vanredni profesor
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci

Datum odbrane:

Zahvaljujem se mentoru, prof. dr Dragomiru Marisavljeviću na nesobičnoj pomoći pri izboru i izradi doktorske disertacije.

Zahvaljujem se radnim kolegama i saradnicima koji su mi na bilo koji način pomogli u ovom radu.

Rad posvećujem svojoj porodici

Mentor: Prof.dr Dragomir Marisavljević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Molekularna dijagnostika varijanti slabijeg oblika antiga D u populaciji davalaca krvi Republike Srpske

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se molekularnom metodom utvrde učestalost i najčešći tipovi slabog i parcijalnog D antiga u ispitivanoj populaciji davalaca; da se dokaže učestalost i prisustvo slabih D varijanti u ispitivanoj grupi serološki D-negativnih, C+/E+ davalaca krvi. Uzorci krvi od 85 davalaca krvi sa serološki slabim RhD antigenom, kao i od 92 RhD-negativna davaoca krvi, C+/E+ pozitivna, ispitivana su PCR-SSP metodom, uz fluorescentnu detekciju (inno-train Diagnostik GmbH). Monoklonski anti-D IgG-ćelijске linije ESD1 korišćen je za potvrdu slabog D u indirektnom antiglobulinskom testu, kao i set za kiselu eluciju antitijela (BioRad). Statistička analiza rađena je statističkim paketom SPSS 22 za Windows, deskriptivnim statističkim metodama. Svi serološki dokazani slabi oblici D antiga kod 85 ispitanih davalaca krvi potvrđeni su molekularnim testiranjem: tip 1 je dokazan kod 30/85 (35,3%), tip 3 kod 50/85 (58,8%) davalaca krvi, parcijalni oblik DNB kod 1/85 (1,2%) i kod 4/85 (4,7%) tip slabog oblika D ostao je nepotvrđen; u grupi od 92 serološki dokazana D-negativna, C+/E+ davaoca krvi, molekularno testiranje pokazalo je slabi D tip 11 kod 4 (44,4%), slabi D tip 1 kod 4 (44,4%), slabi D tip 3 kod 1 (11,1%) i kod 2 (22,2%) davaoca krvi tip varijante D antiga ostao je nepotvrđen. Najčešći oblik slabog D antiga u ispitivanoj populaciji je slabi D tip 3, koga slijedi slabi D tip 1. Klinički značaj ovog ispitivanja je u tome što se kao primaoci krvi, osobe sa slabim oblicima RhD antiga tipa 3 i 1, koje su najprisutnije u ispitanoj populaciji, smatraju RhD-pozitivnima i mogu da dobiju RhD-pozitivnu krv, čime se čuvaju rezerve RhD-negativne krvi, a trudnice sa ovim RhD varijantama ne treba da dobijaju RhD imunoprofilaksu. Neki od slabih oblika D varijanti mogu se dokazati samo molekularnim metodama.

Ključne reči: slabi D antigen, varijante antiga D, serološko testiranje, molekularni metod

Naučna oblast: Medicina / Hirurgija

Naučno polje: Ortopedija sa traumatologijom

Klasifikaciona oznaka za naučnu oblast prema CERIF šifarniku: B 600

Tip odabrane licence Kreativne zajednice (Creative Commons): 4. (CC BY-NC-SA)

Mentor: Prof. dr Dragomir Marisavljević, professor at the University of Belgrade, University Medical School

Molecular diagnostic of weak D variants among the blood donors population of Republic of Srpska

The aim of this doctoral dissertation was to determine the incidence and the most frequent types of weak D and partial D variants in the investigated population of weak RhD-positive blood donors; to detect the existence and the incidence of weak D variants in the investigated population of serologically D-negative, C+/E+ blood donors. Blood samples of 85 previously serologically determined weak D-positive and 92 of previously serologically determined D-negative, C+/E+ blood donors were molecularly tested for the confirmation of RhD status and determination of the type of weak D and Rh phenotype, by SSP-PCR, with the endpoint fluorescence detection (inno-train Diagnostik GmbH). Monoclonal anti-D IgG, cell line ESD1, was used for the verification of weak D in indirect antiglobulin test, as well as the set for acid elution (BioRad). Statistic analysis was performed in statistic package SPSS 22 for Windows, by descriptive statistic methods. All serologically detected weak D antigens in 85 investigated blood donors are confirmed by molecular typing: type 1 was found in 30/85 (35,3%), type 3 in 50/85 (58,8%), variant DNB in 1/85 (1,2%) and in 4/85 (4,7%) the weak D type remained undetermined; in the group of 92 serologically determined D-negative, C+/E+ blood donors, molecular typing showed weak D type 11 in 4 (44,4%), weak D type 1 in 4 (44,4%), weak D type 3 in 1 (11,1%) and in 2 (22,2%) blood donors type of D variant remain undetermined. The most frequent weak D type in the investigated population is weak D type 3, followed by weak D type 1. The clinical importance of this investigation is that weak D types 3 and 1 are regarded as D-positive and the blood transfusion service could save the unnecessary waste of RhD-negative blood and RhD immunoglobulin for the patients and pregnant women with these phenotypes; there are some of D variants which can be determined only by some of the molecular methods.

Key words: weak D antigen, D variants, serological testing, molecular method

Scientific area: Medicine/Surgery

Scientific field: Orthopedics and Traumatology

Classification code for the scientific field according to the CERIF code book: B 600

Type of selected license of the Creative Commons: 4. (CC BY-NC-SA)

Sadržaj:

1.0 Uvod.....	1
1.1 Savremena terminologija i klasifikacija krvnih grupa eritrocita	1
1.2 Sistem Rh - uvodne napomene	9
1.3 Terminologija sistema Rh	11
1.4 Molekularna osnova gena RH	11
1.5 Povezanost sistema Rh, RhAg i LW	15
1.6 Antigeni sistema Rh	16
1.6.1 Antigeni Rh fenotipa	19
1.7 Molekularna klasifikacija RhD fenotipa	20
1.8 Parcijalni antigen D	21
1.9 Slabi (weak) antigen D	22
1.10 DEL	23
1.11 RhD-negativan fenotip	24
1.12 Rhnull	25
1.13 Filogenetske osobenosti alela <i>RHD</i>	25
1.14 Populacione studije	26
1.15 Klinički značaj slabog D, parcijalnog D i fenotipa DEL	27
1.16 RhD epitopi na proteinima Rhce (DHAR, csCF, ceRT, ceSL)	29
1.17 Potencijalne prednosti određivanja <i>RHD</i> genotipa davaocima, pacijentima i trudnicama	30
1.18 Značaj molekularnog testiranja u predviđanju <i>RHD</i> alela	32
1.19 Opis aktuelnih tehnika za genotipizaciju <i>RHD</i> alela	34
1.20 Određivanje velikog broja <i>RH</i> genotipova	37
1.21 Određivanje <i>RHD</i> zigotnosti	37
1.22 Prenatalna dijagnostika	38
1.23 Ispitivanje slobodne DNK u plazmi majke	38
1.24 Rhesus sajt	38
2.0 Ciljevi istraživanja.....	40
3.0 Radna hipoteza.....	41
4.0 Ispitanici, materijali i metode.....	42

4.1 Ispitanici.....	42
4.2 Uzorci krvi za ispitivanja	42
4.3 Imunohematoške metode za određivanje RhD antiga, Rh fenotipa i skrining antitijela ..	43
4.3.1 Aglutinacija u tečnoj sredini	43
4.3.2 Aglutinacija u gelu	45
4.3.3 Metode čvrste faze	47
4.3.4 Aglutinacija u mikrotitarskim pločama.....	49
4.4 Test reagensi za određivanje krvnih grupa sistema ABO, RhD antiga, Rh fenotipa i skrining i identifikaciju antitijela davaocima krvi u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci.....	50
4.4.1 Test reagensi za određivanje antiga D i Rh fenotipa korišteni u studiji.....	50
4.4.2 Test eritrociti za određivanje krvnih grupa sistema ABO davaocima krvi u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci	52
4.4.3 Test eritrociti za skrining i identifikaciju antitijela davaocima krvi	52
4.4.4 Određivanje krvne grupe ABO i RhD antiga davaocima krvi u Zavodu za transfuzijsku medicinu Republike Srpske.....	53
4.4.5 Određivanje slabog (weak) D antiga.....	55
4.4.6 Skrining antitijela	58
4.4.7 Identifikacija antitijela	60
4.4.8 Kombinovana procedura adsorpcije i elucije	62
4.4.9 Potvrđni test za negativne i/ili slabo pozitivne reakcije sa anti-D metodom u gelu	64
4.4.10 Monoklonski test reagensi za određivanje ABO/RhD krvne grupe na mikropločama ..	67
4.4.11 Određivanje ABO/RhD krvnih grupa na mikropločama sa liofilizovanim monoklonskim antitijelima, spremnim za upotrebu	69
4.4.12 Određivanje fenotipova Rh i Kell na mikropločama sa antitijelima u suvom stanju, spremnim za upotrebu.....	70
4.4.13 Test za kiselu eluciju antiteritroцитnih antitijela	70
4.4.14 Imunohematoška ispitivanja u automatizovanom sistemu-osnovni princip	71
4.4.15 Određivanje jačine reakcije i interpretacija rezultata seroloških testiranja	73
4.5 Molekularna tipizacija <i>RHD</i> i <i>RHCE</i> antiga korištena u ovoj studiji	76
4.5.1 Detekcija signala kod uobičajenih PCR-SSP sistema.....	76
4.5.2 Detekcija signala Fluogene metodom.....	77

4.5.3 RBC-Fluogene test sistemi	79
4.5.4 RBC-FluoGene D-Screen	80
4.5.5 RBC-FluoGene CDE	81
4.5.6 RBC-FluoGene D weak/variant	81
4.6 Algoritam određivanja varijanti antiga D primjenjen u Zavodu za transfuzijsku medicinu Republike Srpske u Banjoj Luci.....	82
5.0 Rezultati	83
5.1 Statistička obrada podataka	83
5.2 Socio-epidemiološke karakteristike ispitivane grupe sa slabije izraženim D (Dweak)	83
5.2.1 Karakteristike grupe ispitanika sa serološki i molekularno dokazanim varijantama RhD antiga	83
5.3 Karakteristike grupe ispitanika koji su serološki RhD-negativni, Rh fenotipa D-neg(-), C/E-poz.(+), molekularno tipiziranih na <i>RHD</i> i <i>RHCE</i>	102
5.3.1 Socio-epidemiološke karakteristike grupe ispitanika koji su serološki RhD negativni .	102
5.4 Rezultati skrininga antitijela.....	107
5.5 Strategija transfuziološkog liječenja RhD-negativnih pacijenata	107
6.0 Diskusija.....	108
7.0 Zaključci.....	123
8.0 Literatura.....	125
9.0 Prilozi.....	140

1.0 Uvod

1.1 Savremena terminologija i klasifikacija krvnih grupa eritrocita

Osnovno pitanje koje većina ljudi postavi kada se započne razgovor o krvnim grupama je šta se pod tim terminom podrazumijeva. Podjela krvnih grupa eritrocita na sisteme, kolekcije i serije zavisi od količine dostupnih informacija o nekom eritrocitnom antigenu. Krvnogrupni sistem može da se definiše na više načina: a) kao nasljeđeni polimorfizam eritrocita; b) polimorfizmi čiji geni se nalaze na istom mjestu na hromozomu; c) antigeni koji proističu djelovanjem jednog ili više gena nalaze se na istom molekulu koji je njihov nosač; d) antigen koji može da uzrokuje imuni odgovor; e) postoji jasno definisan antiserum koji određuje neki antigen. Molekularna osnova definisana je za većinu do sada poznatih antigena, na osnovu koje su oni svrstani u jedan od 36 krvnogrupnih sistema. Za preostale antigene još uvijek nema dovoljno informacija o njihovom potencijalnom nosaču na eritrocitu, pa klasifikacija ovih antigena u sisteme za sada nije moguća. U posljednjih nekoliko godina primjećuje se očigledan napredak u razvoju novih metoda koje su omogućile definisanje novih krvnogrupnih sistema, pa se očekuje da će u skoroj budućnosti i drugi eritrocitni antigeni naći svoje odgovarajuće mjesto. Klasifikacija eritrocitnih antigena često podsjeća na istraživački posao detektiva, koji započinje zanimljivim prikazom slučaja bolesnika, ali se oruđe mijenja, a napredak se postiže upotrebom sve savremenijih molekularnih metoda, kao što je slučaj u dokazivanju Jr^a, krvnogrupnih sistema Lan i Vel [1].

Krvne grupe eritrocita su nasljedni polimorfizmi koji su smješteni na proteinima, glikoproteinima i glikolipidima eritrocita. Radna grupa za imunogenetiku eritrocita i terminologiju krvnih grupa Međunarodnog udruženja za transfuziju krvi (ISBT) za sada je registrovala preko 340 antigena [1-2]. Dok polimorfizmi rijetko imaju bilo kakvog uticaja na funkciju organizma, krvne grupe eritrocita su imunogene, jer dovode do stvaranja antitijela kod antigen-negativnih osoba. Imunizacijski događaji su, prije svega, terapijske transfuzije eritrocita i/ili trudnoća. Podaci ukazuju da između 1-3% primalaca krvi stvara antieritrocitna antitijela protiv antigena koje ne posjeduju na svojim eritrocitima. Ovi parametri imaju konstantnu vrijednost tokom mnogih decenija praćenja imunizacija primalaca krvi na eritrocitne antigene [3-5]. Imunizacija zavisi od količine primjenjenih eritrocita, a među pacijentima čiji život zavisi od kontinuirane primjene transfuzija eritrocita, kao što su hemoglobinopatije, talasemije i anemija srpastih ćelija, učestalost aloimunizacije kreće se i do

30% [6-12]. Od momenta kada se u cirkulaciji potencijalnog primaoca eritrocita dokaže aloantitijelo, postaje veoma važno da se za transfuziono liječenje pacijenta obezbijedi antigen-negativna krv. Zato je neophodno pronaći eritrocite odgovarajućeg davaoca, imunohematoškim testitranjima, upotrebom test seruma, ili, u skorije vrijeme, genetskim DNK analizama kodirajućeg alela. U nekim slučajevima, kada test serumi nisu dostupni, ispitivanje DNK je jedini način da se obezbijede kompatibilni eritrociti. Laboratorije za imunogenetiku su u prethodnom periodu pokazale da je molekularna fenotipizacija tehnikama PCR potpuno zadovoljavajući način u pronalaženju antigen-negativnih jedinica krvi [13-17]. Na osnovu iznijetog, može se zaključiti da je utvrđivanje imunohematoških i imunogenetskih svojstava eritrocitnih antigena važno ne samo sa biohemijskog i funkcionalnog aspekta, već i zbog neophodnosti da se pronađe bezbjedna krv za pacijenta.

Priključivanje novih eritrocitnih antigena postojećim krvnogrupnim sistemima je relativno jednostavan proces, kada je njihova serološka pripadnost već utvrđena. Često se u očekivanom genu otkriju nove mutacije (Tabela 1).

Ukoliko se takve mutacije utvrde, u najvećem broju slučajeva je moguće dokazati ekspresiju mutiranog proteina u imortalizovanoj ćelijskoj liniji, kao i dokazivanjem prisustva ili odsustva antiga uz pomoć protočne citometrije, u zavisnosti od toga da li se radi o antigu male ili velike učestalosti. Ako se kod propositusa ne može dokazati ekspresija antiga, ispituju se članovi porodice.

Tabela 1. Krvnogrupni antigeni

Preuzeto i adaptirano sa: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/Updates/Table_of_blood_group_antigens_within_systems_v5_151222.pdf

14									G		E							
015	CO	Co ^a	Co ^b	Co3	Co4													
016	LW					LW ^a	LW _{ab}	LW ^b										
017	CH/RG	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6	WH			Rg1	Rg2						
018	H	H																
019	XK	Kx																
020	GE		Ge2	Ge3	Ge4	Wb	Ls ^a	An ^a	Dh ^a	GEIS	GEPL	GEAT	GETI					
021	CROM	Cr ^a	Tc ^a	Tc ^b	Tc ^c	Dr ^a	Es ^a	IFC	WES ^a	WES _b	UMC	GUTI	SERF	ZENA	CROV	CRAM	CROZ	CRUE
022	KN	Kn ^a	Kn ^b	McC ^a	SI1	Yk ^a	McC ^b	SI2	SI3	KCAM								

Ovaj pristup je dugo predstavljao zlatni standard u dokazivanju novih eritrocitnih antigena, a može da bude od koristi u utvrđivanju mutacije koja je u korelaciji sa ekspresijom antiga.

Postoje eritrocitni antigeni koji još uvijek ne mogu da budu pridruženi nekom krvnogrupnom sistemu, zbog toga što za njih još uvijek nije utvrđen genetski lokus. Ovo su takozvani "siročad" antigeni i u njih spadaju antigeni velike i male učestalosti. Radna grupa za imunogenetiku eritrocita i terminologiju krvnih grupa Međunarodnog udruženja za transfuziju krvi rasporedila je ove antigene u: a) kolekcije (serija 200), gdje 2 ili više antigena dijeli iste serološke karakteristike (Tabela 2); b) antigene velike učestalosti (serija 901) (Tabela 3); i c) antigene male učestalosti (serija 700) (Tabela 4).

Tabela 2. Kolekcije krvnih grupa

http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immuno genetics_and/Updates/Table_of_blood_group_antigens_within_systems_v5_151222.pdf

Kolekcija			Antigen		
Broj	Naziv	Oznaka	Broj	Oznaka	Incidenca
205	Cost	COST	205001	Cs ^a	95
			205002	Cs ^b	34
207	Ii	I		I	niska
208	Er	ER	208001	Er ^a	> 99
			208002	Er ^b	<1
			208003	Er3	> 99
209		GLOB		LKE	98
210			210001	Le ^c	1
			210002	Le ^d	6
213		MN CHO	213001	Hu	
			213002	M1	
			213003	Tm	
			213004	Can	
			213005	Sext	
			213006	Sj	

Stare kolekcije:

201-Gerbich, **202**-Cromer, **203**-Indian, **204**-Auberge, **206**-Gregory, **211**-Wright, **212**-Vel.

Tabela 3. Antigeni visoke učestalosti (serija 901)

http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/Updates/Table_of_blood_group_antigens_within_systems_v5_151222.pdf

Broj	Naziv	Oznaka
901003	August	At ^a
901008	Anton	Emm
901009	-	AnWj
901012	Sid	Sd ^a
901014	-	PEL
901015	-	ABTI
901016	-	MAM

Tabela 4. Antigeni male učestalosti (serija 700)

http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/Updates/Table_of_blood_group_antigens_within_systems_v5_151222.pdf

Broj	Naziv	Oznaka
700002	Batty	By
700003	Christiansen	Chr ^a
700005	Biles	Bi
700006	Box	Bx ^a
700017	Torkildsen	To ^a
700018	Peters	Pt ^a
700019	Reid	Re ^a
700021	Jensen	Je ^a
700028	Livesay	Li ^a
700039	Milne	-
700040	Rasmussen	RASM
700044	-	JFV
700045	Katagiri	Kg
700047	Jones	JONES
700049	-	HJK
700050	-	HOFM
700054	-	REIT

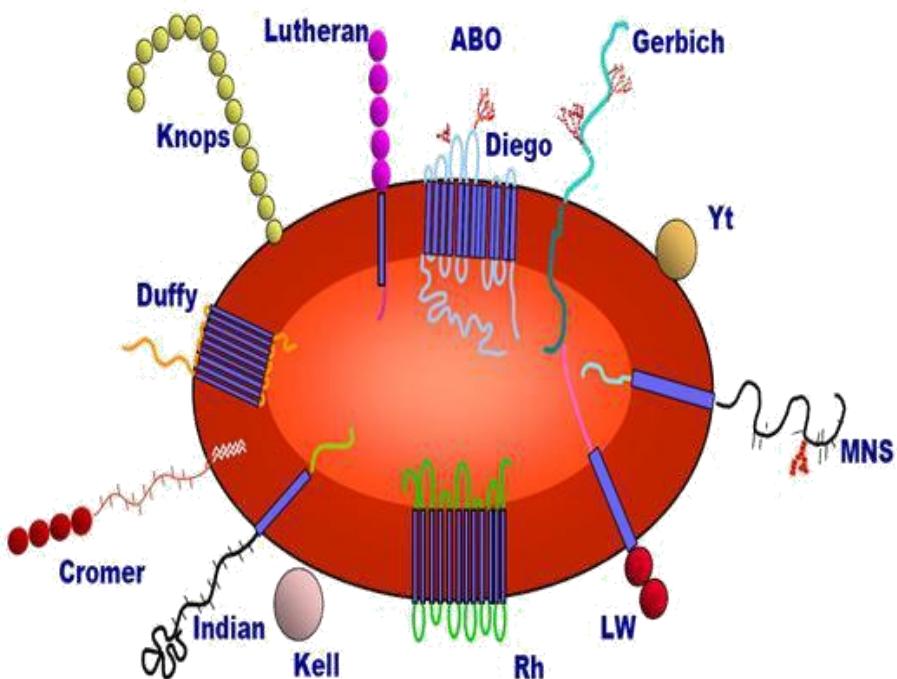
Nešto manje od 40 antigena čeka da dobije jasno definisanu konačnu lokalizaciju na proteinu, glikoproteinu ili glikolipidu na površini eritrocita, što predstavlja dugotrajan proces, koji može da traje godinama. Dobri primjeri ostvarenih rezultata ovog skoro detektivskog rada ogledaju se u identifikaciji proteina koji nose antigene Jr^a, Lan i Vel.

Većina struktura koje nose različite antigene krvnih grupa ima jasno definisanu fiziološku ulogu, oni nisu samo u funkciji eritrocitnih antigena (Tabela 5, Slika 1) [2].

Tabela 5. Uloga krvnogrupnih sistema

Preuzeto i adaptirano iz *Knight R. Transfusion and Transplantation Science. Transfusion Science Consultant Oxford, University Press, 2013.*

Krvno grupni sistem	Uloga
ABO	Nepoznata
MNS	receptori za komplement, bakterije i virusе
P	receptor za <i>Escherichia coli</i>
Rh	strukturna, preko ankirina i proteina 4.2
Lutheran	adhezija i intracelularni transport
Kell	cink endopeptidaza
Lewis	ligand za E-selektine
Duffy	receptor za proinflamatorne hemokine
Kidd	transport uree
Diego	strukturna i transport anjona
Yt (Cartwright)	uključeni u neurotransmisiju
Xg	adhezija
Scianna	adhezija/receptorni protein
Dombrock	modifikacija protein
Colton	transport vode
LW	intracelularna adhezija
Chido/Rodgers	inhibicija imune precipitacije
H	ligand u čelijskoj adheziji
Kx	održavanje integriteta čelijske membrane
Gerbich	održavanje integriteta čelijske membrane preko proteina 4.1
Cromer	regulacija komplementa
Knops	regulacija komplementa
Indian	čelijska adhezija i čelijski transport
Ok	vjerovatno metastaze tumora
RAPH	nepoznata, ali može biti uključen u funkciju bubrega
JMH	nepoznata
I	nepoznata
Globoside	pretvara P ^k u P
GIL	transport malih nejonskih molekula
RHAG	membranski transport neutralnih jona



Slika 1. Shematski prikaz klinički značajnih eritrocitnih antigena.

Preuzeto i adaptirano iz: Wester, E.S., J.R. Storry, and M.L. Olsson, *Characterization of Jk(a+)(weak)): a newblood group phenotype associated with an altered JK*01 allele*. Transfusion, 2011.51(2): p. 380-92.

1.2 Sistem Rh - uvodne napomene

Izučavanje sistema Rh počinje 1941. godine, uočavanjem da on predstavlja uzrok teškog oblika žutice i smrti fetusa, kao i da dovodi do nastanka sindroma nazvanog erythroblastosis fetalis. Ovaj sindrom je dugo godina izučavan kao komplikacija u trudnoći. Činjenica da nastaje kao posljedica imune reakcije majke na antigen oca koji je naslijedilo dijete, dugo se potvrđivalo isključivo poslije rođenja mrtvorodenog djeteta, kojoj je prethodila neželjena reakcija kod majke koja je dobila transfuziju krvi od oca djeteta [18]. Sindrom je nazvan hemolizna bolest novorođenčeta (HBN) i prevashodno je nastajao senzibilizacijom majke na RhD antigen. HBN koju uzrokuje inkompatibilnost partnera u odnosu na antigen D, preovladavala je u populaciji ljudi bijele rase, kod kojih je najveća učestalost D-negativnog fenotipa (15-17%), dok se u drugim etničkim grupama rijetko sreće.

Rh-negativni fenotip je rjeđi u Africi (5%) i Australiji, dok se u nekim dijelovima Azije smatra rijetkom krvnom grupom (1%) i ne određuje se rutinski. Od 1960. godine, skoro 20 godina poslije otkrića Rh inkompatibilije, HBN uzrokovana anti-D antitijelom, mogla je efikasno da se spriječi primjenom RhD imunoglobulina [19-20].

Već dugo se zna da je sistem Rh jedan od najsloženijih krvnogrupnih sistema. Pored prisustva i odsustva antiga D, drugi uobičajeni Rh fenotipovi podrazumijevaju alelne C i c, i E i e antigene. Međutim, ispitivanjem sa specifičnim antitijelima nastalim poslije inkompatibilnih transfuzija krvi ili trudnoća, dokazano je preko pedeset različitih Rh antiga. Najveći napredak u razumijevanju sistema Rh doprinijelo je kloniranje gena. Promjene u organizaciji i konfiguraciji *RH* lokusa dovode do konverzije gena i nastanka hibridnih proteina, koji predstavljaju dodatne Rh antigene. Važno je napomenuti da genetsko testiranje za gene *RH* danas može da se upotrijebi u prenatalnoj i kliničkoj transfuzionoj medicini, kako bi se dokazalo prisustvo recessivnog D-negativnog alela ili za utvrđivanje načina nasljeđivanja *RH* gena koji nose mutacije odgovorne za nastanak izmjenjenog Rh proteina.

Kompleks Rh je suštinski značajan za strukturu eritrocitne membrane. Rh_{null} eritrociti, koji nemaju Rh protein, imaju oblik stomatocita i sferocita, a osobe sa ovim fenotipom često pokazuju simptome hemolizne anemije [21]. Skorašnja istraživanja ukazuju da Rh protein ima ključnu ulogu u održanju citoskeletona ćelije, preko proteina 4.2 i ankirina [22-24].

Rh antigeni eritrocita veoma su dobro poznati zbog svog značaja u transfuziji krvi, mada su nedavno sprovedene funkcionalne studije i analize strukturnih modela ukazali da su Rh proteini članovi jedne porodice proteina, koja je uključena u transport amonijuma [25-28]. Non-eritroidni Rh proteini pronađeni su i u drugim tkivima uključujući bubreg, jetru, mozak i kožu, na mjestima gdje dolazi do proizvodnje i eliminacije amonijuma [29-32].

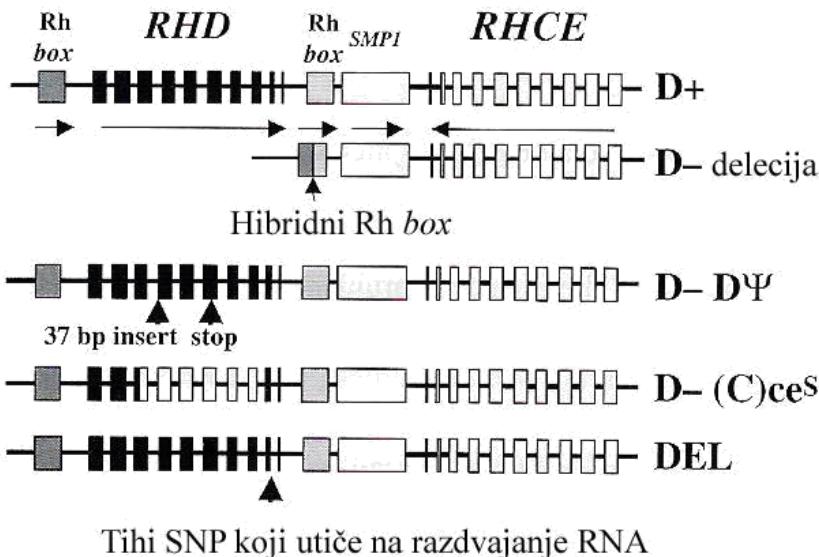
1.3 Terminologija sistema Rh

Rh terminologija se razlikuje između antiga, gena i proteina. Antigeni se obilježavaju slovima abecede, D, C, c, E, e, itd. *RH* geni se označavaju velikim slovima, sa ili bez upotrebe italičnih slova, a podrazumijevaju eritroidne gene *RHD*, *RHCE* i *RHAG*, kao i non-eritroidne homologe, koji se nalaze na drugim tkivima, *RHBG* i *RHCG*. Različiti aleli gena *RHCE* obilježavaju se kao *RHce*, *RHcE*, *RHcE*, u zavisnosti od toga koji antigen kodiraju. Proteini se obilježavaju kao RhD, RhCE (ili u zavisnosti od toga koji specifični antigen nose (Rhce, RhCe, ili RhcE), a uključuju i eritroidni RhAG i one dokazane u drugim tkivima, RhBG i RhCG [33].

1.4 Molekularna osnova gena RH

Lokus RH podrazumijeva dva gena, RHD i RHCE, koji su svojim završnim dijelovima (orijentacija rep ka repu) okrenuti prema kraju kratkog kraka hromozoma 1 (p34–36). Drugi gen, *SMP1*, je utkan između oba gena *RH* i u neposrednoj je blizini 3' kraja gena *RHCE* (Slika 2.) [34].

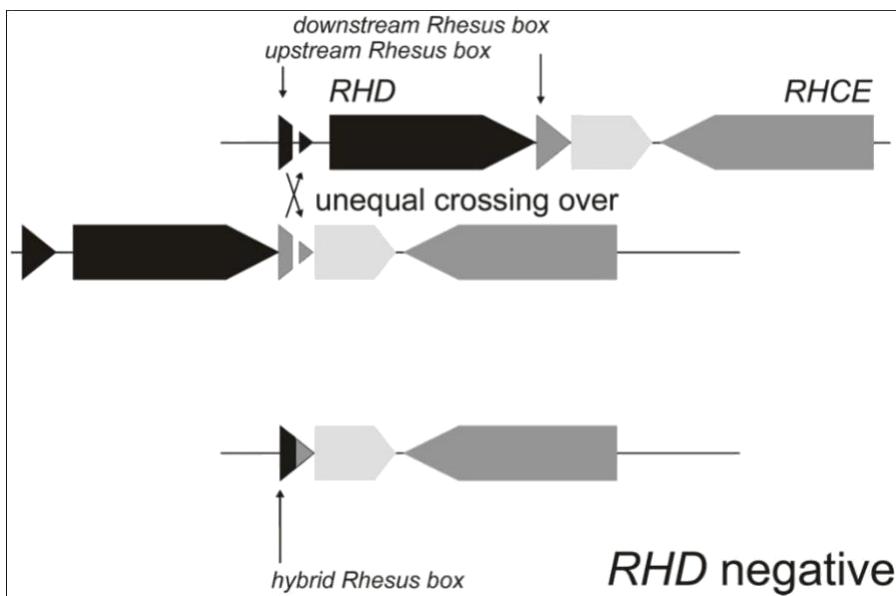
Ova precizna tehnička karakteristika doprinijela je razumijevanju fizičke strukture *RH* genskog lokusa [35]. Otkrivanje jednog mišijeg genskog ekvivalenta u projektnom modelu genoma miša obezbijedilo je dokaz (na osnovu pozicije i orijentacije mišijeg gena u regionu) da je gen *RHCE* nastao iz ancestralnog gena *RH*. Tako je gen *RHD* nastao iz duplikacionog događaja, koji je prethodio nastanku savremenih ljudskih bića [36].



Slika 2. Shematski prikaz gena *RHD*, *RHCE*, *SMP1* i regioni nazvani Rh boxes, kao i genetske promjene na njima koje dovode do D-negativnog i parcijalnog D fenotipa.

Preuzeto i adaptirano iz Jovanović Srzentić S, Veljković D. Imunobiološki i klinički značaj krvnih grupa. Intra.Net Communication. Beograd, 2009. prema adaptaciji iz: Daniels G. Rh blood group system. In: Daniels G. Human Blood Groups, Oxford, Blackwell Science 2002; p. 195-225.

U genomu čovjeka su za vrijeme duplikacionog događaja i vjerovatno u vrijeme njegovog nastanka, stvorene dvije homologne ponovljene sekvene, dužine oko 9,000 baznih parova, nazvane *Rhesus boxes*, a pridružene bočno genu *RH*. Gen *RHD* se izgubio iz genoma za vrijeme nejednakog crossing over-a, u događaju koji je obuhvatio i uzvodni *Rhesus box*-u i nizvodni *Rhesus box*-u (Slika 3), a ponovio se vjerovatno više puta.



Slika 3. Nejednak crossing over između uzvodnog *Rhesus box-a* i nizvodnog *Rhesus box-a* dovodi do delecije gena *RH*. Ukoliko se jedan od dva crossing over-om pogodjena hromozomska lanca oporavi, lokus gena *RH* neće imati kompletan gen *RHD* i nosiće hibridni *Rhesus box*.

Preuzeto i adaptirano iz: Flegel W. Molecular genetics and clinical applications for RH. Edited form as: Transfus Apher Sci. 2011 Feb; 44(1): 81–91. Published online 2011 Jan 28. doi: [10.1016/j.transci.2010.12.013](https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.12.013).

Geni *RHD* i *RHCE* imaju dovoljno homolognih sekvenci, tako da eritrociti mogu da obavljaju normalnu funkciju i kada gen *RHD* nije naslijeden. Zbog čega su genomi koji imaju deleciju gena *RHD* opstali do današnjih dana i zašto im je sa vremenom povećana učestalost, ostaje i dalje predmet debate, a katkada i teorijske spekulacije [37-38].

Do sada je otkriveno više od 200 *RHD* alela, koji mogu da se podijele na osnovu seroloških i molekularnih karakteristika (Tabela 6 i Prilog 1). Većina alela nosi ili pojedinačne polimorfizme nukleotida (SNP) ili su prisutni kao hibridni aleli *RHD/RHCE*. Orientacija rep-ka-repu vjerovatno olakšava nastanak velikog broja alela, a identifikacija odgovarajućih nukleotida u oba gena ukazuje da većina hibridnih alela nastaje konverzijom gena. Doprinos molekularne karakterizacije lokusa *RH* kliničkoj praksi vidi se u tome što *RHD*

zigotnost može da se odredi sa potpunom sigurnošću. U prošlosti su se tablice Rh haplotipova, napravljene na osnovu dobijenih seroloških analiza, koristile u predviđanju "najvjerovatnijih genotipova", a na taj način i *RHD* zigotnosti, osobama bijele rase kao i Amerikancima afričkog porijekla [39].

Tabela 6. Učestalost ekspresije slabog D antiga

Preuzeto i adaptirano iz *Johnson S. Partial D & Weak D Picking up the Rhesus pieces. Heart of America Association of Blood Banks, 2012.*

Autor	Područje	Godina	Učestalost (%)
<i>Hopkins</i>	Škotska	1967	0.56
<i>Garrreta</i>	Francuska	1974	0.66
<i>Beck</i>	SAD	1990	0.20
<i>Jenkins</i>	SAD	2004	0.40
<i>Flegel</i>	Njemačka	2006	0.40

Otkriveno je takođe da *RHAG* gen smješten na hromozomu 6 (6p11-p21), dijeli identičnu strukturu eksona kao i identične sekvene u velikim regijama sa genima *RHD/RHCE*. Pored toga, RhAG je neophodan za ekspresiju Rh polipeptida, a identifikovan je 2008. godine, kao krvnogrupni sistem pod brojem 30.

Kloniranje gena *RHCE* i *RHD* imalo je za posljedicu nastanak tri velika klinička otkrića: 1) definisana je molekularna osnova uobičajenih Rh-negativnih haplotipova i nukleotidnih polimorfizama, koji su povezani sa najčešćim antigenima Rh. To saznanje je primijenjeno u predviđanju rizika za nastanak hemolizne bolesti novorođenčeta (HBN); 2) razjašnjena je molekularna različitost koja karakteriše parcijalne D i slabe D alele, *DEL*, *RHD*-pseudogene i genome sa delecijom *RHD*; 3) utvrđena je molekularna osnova epitopa D antiga koji su izraženi na polipeptidu RhCE [39].

1.5 Povezanost sistema Rh, RhAg i LW

Poslije krvnogrupnog sistema ABO, sistem Rh je najvažniji za kliničku praksu. Sigurno je da se o njemu zna mnogo više nego o svim ostalima zajedno, mada je ostalo još dosta nepoznanica koje bi trebalo da dobiju naučno objašnjenje.

Prvi originalni opis ovog sistema predstavlja predmet izvjesnih kontraverzi, zbog toga što su dvije grupe naučnika kasnih tridesetih i ranih četrdesetih godina prošlog vijeka (Landsteiner i Wiener sa jedne i Levine i Stetson sa druge strane) podjednako prisvajale sebi pravo prvenstva u njegovom otkriću. Na osnovu dostupnih podataka, može se zaključiti da su Levine i Stetson opisali nastanak anti-D antitijela u humanoj populaciji. Landsteiner i Wiener opisali su LW antigen na životinjskom modelu otkrićem anti-LW antitijela kod gvineja svinja, pošto su ih imunizovali eritrocitima majmuna vrste rhesus, što je dovelo generacije naučnika i ljudi cijelog svijeta u zabludu da se ovaj sistem pogrešno nazove Rh krvno grupni sistem, "Rhesus" ili "rhesus" [5].

U početku se mislilo da postoje tri gena koja kodiraju antigene sistema Rh: D (d), Cc i Ee i mnogi udžbenici još uvijek koriste ovu terminologiju. Danas znamo da su dva gena odgovorna za nastanak Rh proteina, *RHD* i *RHCE*. Oba su mapirana na hromozomu 1p36.13-p34.3. Da bi došlo do ekspresivnosti Rh proteina na membrani eritrocita, neophodan je još jedan gen, *RHAG*, koji je mapiran na hromozomu 6p11-21. Još jedan protein koji je kodiran genom *LW* u vezi je sa nastankom Rh kompleksa na površini membrane eritrocita, a mapiran je na hromozomu 19p13.3 [40-41].

1.6 Antigeni sistema Rh

Rh proteini pripadaju superfamiliji amonijum transport (*E. coli* AmtB) /metilamonijum permeaza. U početku su molekularni modeli oba Rh proteina i RhAG proteina na kristalnoj strukturi *E.coli* AmpB ukazivali da Rh proteini i RhAG formiraju trimere na membrani eritrocita, pa tako imaju ulogu proteina u transportu amonijuma [42]. Međutim, pokazalo se da RhD i RhCE ne učestvuju u transportu amonijuma i ugljen dioksida kroz membranu eritrocita, jer ključne supstitucije aminokiselina u transmembranskom kanalu ne omogućavaju ovaj transport [40-42].

Kritični dijelovi strukture proteina RhD i RhCE su aminokiseline koje se nalaze u ekstracelularnom, vestibularnom dijelu Rh proteina i dio su transmembranskog polipeptida koji stvara istoimeni kanal. Nekoliko studija je pokazalo da zamjena aminokiselina u vestibularnom dijelu proteina mijenja molekularnu strukturu antiga u dovoljnoj mjeri da ove osobe mogu da stvore anti-D antitijelo, bez obzira na činjenicu da su RhD-pozitivne [43-44]. Tako su molekularne studije ubjedljivo dokazale hipotezu P. Tippett i saradnika, da neke varijante antiga D nemaju ekspresiju određenih epitopa antiga D, pa mogu da stvore anti-D antitijelo na dijelove koji im nedostaju (Slika 2, Slika 3, Slika 4) [45].

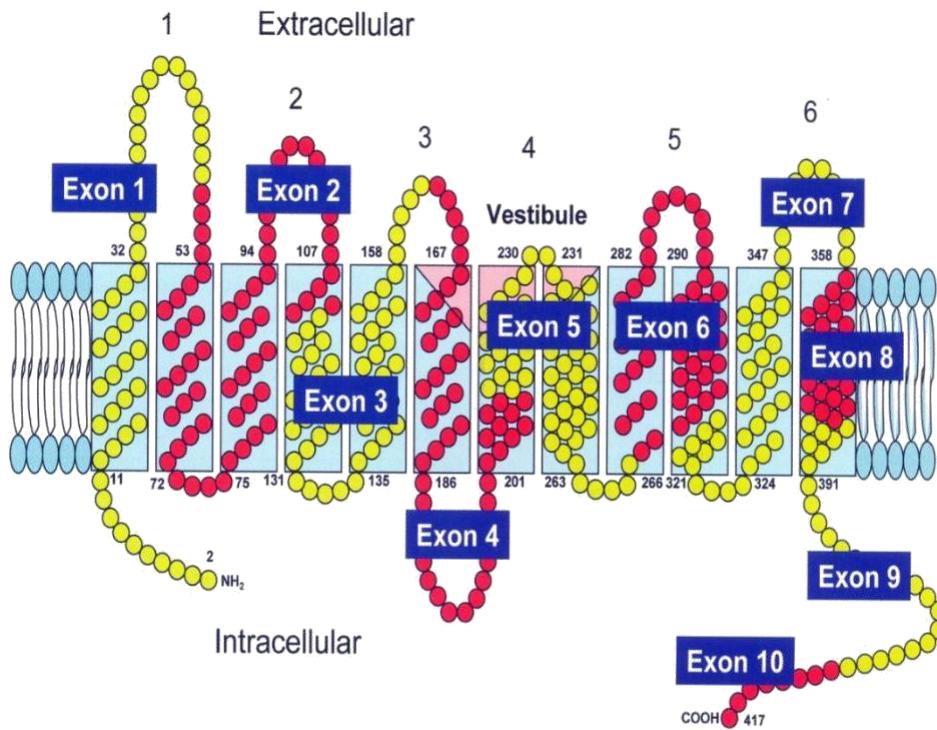


Figure 5.4 Model of the RhD and RhCE polypeptides in the membrane showing the regions encoded by the 10 exons.

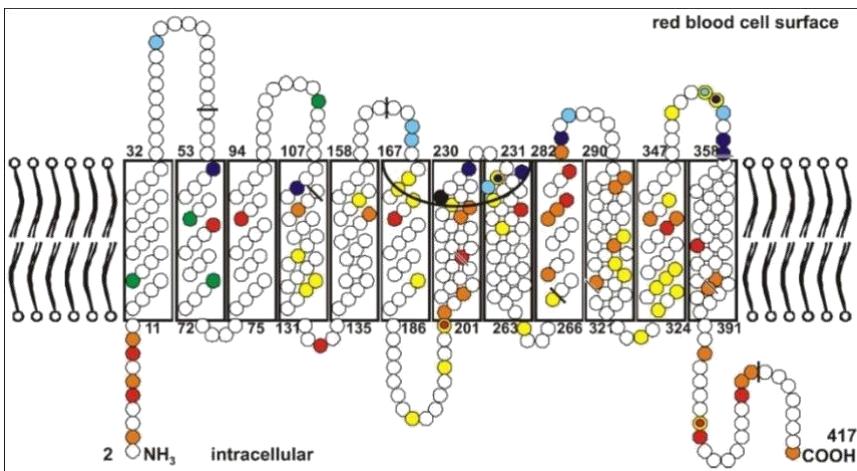
Slika 4. Model RhD i RhCE polipeptida u membrani, sa regionima koje kodiraju 10 eksona.

Preuzeto i adaptirano iz: Daniel G. Human Blood Groups. Third edition Wiley-Blackwell, 2012.

Dva gena (*RHD* i *RHCE*), koji se nalaze u neposrednoj blizini jedan drugom na hromozomu 1, kodiraju Rh proteine na membrani eritrocita; jedan protein nosi antigen D, a drugi ostale CE antigene u različitim kombinacijama (ce, Ce, cE, ili CE) (Slika 2) [46-48]. Svaki gen se sastoji od 10 eksona, koji su identični u 97%, a nastaju duplikacijom gena [12]. Proteini RhD i RhCE međusobno se razlikuju za 32-35 od ukupno 416 aminokiselinskih rezidua i dvanaest puta prolaze membranu eritrocita, a prave šest ekstracelularnih petlji. Oba završetka Rh polipeptida (i NH₂ i COOH) nalaze se u intracelularnom dijelu.

Geni *RHD* i *RHCE* imaju skoro identičnu organizaciju genoma, a svaki se sastoji od 10 eksona. Eksoni 1 do 7 kodiraju po 50 do 60 aminokiselina, dok eksoni 8 do 10 kodiraju preostalih 58 aminokiselina [47-49]. Ovi geni dijele u 93,8% homologiju u građi introna i kodirajućih eksona. Najznačajnija razlika je u intronu 4, gdje postoji delecija gena *RHD* od oko 600 baznih parova (bp) u odnosu na gen *RHCE*. U intronima su dokazane i četiri druge insercije ili delecije od oko 100 bp (Slika 5). Na Slici 5. vide se zamjene aminokiselina po kojima se razlikuju protein RhCE od proteina RhD - obilježene su žutom bojom, sa četiri aminokiseline koje su karakteristične za antigen C obilježene zelenom bojom i jednom karakterističnom za antigen E, obojenom crnom bojom. Pojedinačne zelene aminokiseline koje dovode do nastanka parcijanih oblika antiga D obilježene su plavom bojom, a one koje uzrokuju nastanak slabih oblika antiga D su obojene crvenom bojom. Mutacije koje su identifikovane u Institutu Ulm od 1999. obilježene su svjetlo plavom i narandžastom bojom. Ekstracelularni vestibularni dio Rh proteina obilježen je uvrnutim crnim lukom i djelimično ograničen aminokiselinama iz ekstracelularnih petlji 3 i 4.

RHCE i *RHD* geni sastoje se od 57295 i 37831 bp, a rastojanje između njih iznosi oko 30 kilobaza (kb), koliko ih ima gen *TMEM501* (prethodno nazvan gen *SMP1*) [39].



Slika 5. Model Rhesus proteina na membrani eritrocita

Preuzeto iz: Flegel W. Molecular genetics and clinical applications for RH. Edited form as: Transfus Apher Sci. 2011 Feb; 44(1): 81–91. Published online 2011 Jan 28. doi: [10.1016/j.transci.2010.12.013](https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.12.013).

1.6.1 Antigeni Rh fenotipa

Prema rezultatima ispitivanja u Velikoj Britaniji, najrasprostranjeniji Rh fenotip u populaciji bijele rase je CcDee, sa učestalošću od oko 35%; slijedi ga Rh fenotip CCDee, sa učestalošću od približno 19%, a onda za njim Rh fenotipovi ccDEe i CcDEe sa podjednakom zastupljenosti od oko 12% i 14% (Tabela 1). Ostali Rh fenotipovi kod RhD-pozitivnih osoba bijele rase imaju znatno manju učestalost.

Učestalost različitih Rh fenotipova kod RhD-negativnih osoba bijele rase kreće se na sljedeći način: fenotip ccddee zastupljen je kod 15% ispitivanih osoba, Ccddee i ccddEe kod oko 1% osoba, CCddee i ccddEE kod oko 0,01%, dok su ostali RhD fenotipovi D-negativnih osoba daleko slabije zastupljeni (Slika 6) [7,12].

Antigeni D C c E e	Fenotip	Verovatni genotip	GENOTIP		Učestalost
++θθ+	DCe/DCe	R ₁ R ₁	DCe/DCe DCe/dCe	R ¹ R ¹ R ¹ r'	17.68 0.82
+θ++θ	DcE/DcE	R ₂ R ₂	DcE/DcE DcE/dcE	R ² R ² R ² r''	1.99 0.34
+θ+θ+	Dce/dce	R ₀ r	Dce/dce Dce/Dce	R ⁰ r R ⁰ R ⁰	2.00 0.07
++θ+θ	DCE/DCE	R _z R _z	DCE/DCE DCE/dCE	R ^z R ^z R ^z r''	<0.01 <0.01†
+++θ+	DCe/dce	R ₁ r	DCe/dce DCe/Dce Dce/dCe	R ¹ r R ¹ R ⁰ R ⁰ r'	32.68 2.16 0.05
+θ+++	DcE/dce	R ₂ r	DcE/dce DcE/Dce Dce/dcE	R ² r R ² R ⁰ R ⁰ r''	10.97 0.73 0.06
++θ++	DCe/DCE	R ₁ R _z	DCe/DCE DCE/dC _e DCe/dCE	R ¹ R ^z R ¹ r' R ¹ r''	0.20 <0.01 <0.01†
+++-θ	DcE/DCE	R ₂ R _z	DcE/DCE DCE/dcE DcE/dCE	R ² R ^z R ² r'' R ² r''	0.07 <0.01 <0.01†
++++	DCe/DcE	R ₁ R ₂	DCe/DcE DCe/dcE DcE/dCe DCE/dce Dce/DCE Dce/dCE	R ¹ R ² R ¹ r'' R ² r' R ² r R ⁰ R ^z R ⁰ r''	11.87 1.00 0.28 0.19 0.01 <0.01†
θ+θθ+	dCe/dCe	r'r'	dCe/dCe	r'r'	0.01
θθ++θ	dcE/dcE	r''r''	dcE/dcE	r''r''	0.01
θθ+θ+	dce/dce	rr	dce/dce	rr	15.10
θ+θ+θ	dCE/dCE	r _y r _y	dCE/dCE	r ^y r ^y	<0.01†
θ++θ+	dCe/dce	r'r	dCe/dce	r'r	0.76
θθ++	dcE/dce	r''r	dcE/dce	r''r	0.92
θ+θ++	dCe/dCE	r'r _y	dCe/dCE	r'r ^y	<0.01†
θ++θ	dcE/dCE	r''r _y	dcE/dCE	r''r ^y	<0.01†
θ+++	dCe/dcE	r'r''	dCe/dcE dCE/dce	r'r'' r _y r	0.02 <0.01†

† ekstremno redak genotip

Slika 6. Rh fenotipovi i genotipovi u populaciji Engleske

preuzeto i adaptirano iz: Jovanović Srzentić S, Veljković D. Imunobiološki i klinički značaj krvnih grupa. Intra.Net Communication. Beograd, 2009.; Daniels G. Human Blood Groups, 2nd ed. Willey Blackwell, 2002.

1.7 Molekularna klasifikacija RhD fenotipa

Istorijski, serološke studije su klasifikovale antigen D u šest velikih kategorija (DII do DVII, a kategorija DI je izbačena). Predložena tri modela sastavljena od epitopa obuhvataju model od 9 epitopa, model od 37 epitopa ili 20

kombinaciju ova dva modela, baziranu na serološkim reakcijama sa više od 80 monoklonskih anti-D test reagenasa [39]. Mnoge varijante imaju izmjenjen antigen D, mada ne postoji apsolutna korelacija između fenotipske ekspresije i kliničkog značaja alela *RHD* [39]. Na osnovu svoje fenotipske povezanosti sa molekularnim varijacijama, RHD alele su klasifikovane na: slabi antigen D (weak D), parcijalni antigen D, fenotip DEL (Del) i nefunkcionalne allele [39,47-49].

1.8 Parcijalni antigen D

Klasifikacija parcijalnih oblika antiga D zasnovana je na prenisi da određene zamjene aminokiselina na ekstracelularnoj petlji zahvataju linearne D epitope ili, još češće, trodimenzionalnu konformaciju te petlje (Slika 5). Mnogi parcijalni oblici D antiga identifikovani su upotrebom monoklonskih antitijela koja se vezuju na specifične domene ili petlje na površini eritrocita [49]. Kategorije antiga D (od DII do DVII) predstavljaju skup svih parcijalnih oblika antiga D. DII i DVII uzrokovani su pojedinačnim zamjenama aminokiselina, dok su DIII, DIV, DV i DVI nastali od hibridnih *RHD-CE-D* alela, a svaki od njih kodira nastanak nekoliko podtipova [50]. Klasifikacija na parcijalne oblike antiga D ima klinički značaj, jer osobe sa ovim oblicima antiga D često stvaraju anti-D antitijelo poslije izlaganja normalnom antigenu D (Slika 5) [51].

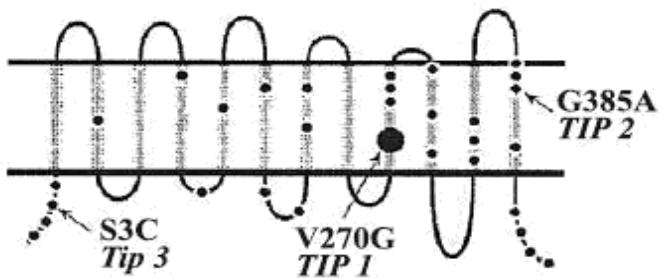
Eritrociti sa parcijalnim oblikom antiga D u serološkim testiranjima bivaju određeni kao RhD-pozitivni (neki u direktnoj aglutinaciji, a drugi sa tehnikom indirektnog antiglobulinskog testa-IAT), kada osobe sa ovim oblikom antiga D često stvaraju anti-D antitijelo poslije transfuzije krvi ili trudnoće. Neki oblici parcijalnog antiga D, slično slabom antigenu D, rezultat su point mutacije u genu *RHD*, koja dovodi do pojedinačne zamjene aminokiselina. Međutim, za razliku od slabog antiga D, ove promjene se nalaze na ekstracelularnom dijelu proteina, što dovodi do nastanka izmjenjenog ili novog epitopa. Mnogi oblici parcijalnog antiga D nastaju od hibridnih gena, kod kojih su dijelovi gena *RHD* zamjenjeni odgovarajućim regionima 21

RHCE. Ove zamjene obuhvataju male regije koje obuhvataju nekoliko kodona, cijele eksone, ili velike regije gena, kao i nove sekvene aminokiselina, koje nastaju kao rezultat nastanka hibridnih proteina (nastalih od dijelova RhD i RhCE), koji predstavljaju nove Rh antigene (npr. DAK, Go^a, Evans, D^W, BARC, FPTT, Rh32) [33].

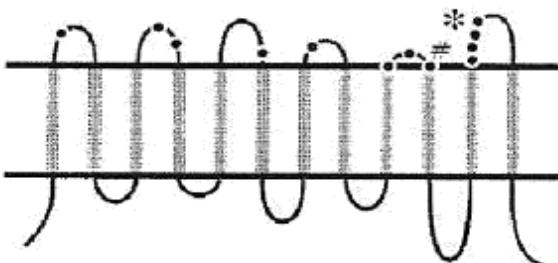
1.9 Slabi (weak) antigen D

Slabi oblik antiga D (Slika 7) je varijanta RhD proteina koja podrazumijeva zamjenu aminokiseline u njegovom transmembranskom ili intracelularnom dijelu, a predstavlja smanjeni broj D antiga (generalno uvezši, manje od 5000 D antiga po eritrocitu) [52]. Prvobitno je opisano 16 različitih slabih tipova antiga D, ali je ukupan broj ovih oblika, zajedno sa njihovim podtipovima, do danas premašio 80. Ove zamjene izgleda da dovode do ometanja integracije proteina u membranu eritrocita, zaustavljanjem palmitilacije i onemogućavanjem ugradnje polipeptida u citoskeleton [53]. Tako je broj antiga D na površini membrane kvantitativno smanjen, mada antigen D ostaje kvalitativno nepromijenjen. Iz tih razloga slabi oblik antiga D nije imunogen kao normalan antigen D [54-60]. Imunizacija osoba sa slabim oblikom antiga D nije uobičajena pojava, ali izuzeci obuhvataju osobe sa weak D tip 15, weak D tip 4.2, poznatog i pod nazivom DAR, kao i weak D tip 7 [61-63]. Slabi oblici D tipova 1, 2, 3 i 4.0/4.1, koji imaju najveću učestalost u svim populacijama bijele rase, predstavljaju više od 95% svih weak D tipova. Do današnjeg dana, poslije više od deset godina od kako je dat opis molekularne karakterizacije varijanti antiga D, u literaturi ne postoji ni jedan podatak da je bilo koji nosilac slabih D tipova od 1 do 4.1 bio imunizovan ili je stvorio alo anti-D. Posmatrane grupe stvarale su autoantitijela u niskom titru (Prilog 1, Tabela 6) [39].

A. Slabiji D



B. Parcijalni D



DMH - L54P # Slabiji D tip 15 - G2820

DVII - L110P D^{HMI} - T2834

DFW - H166P DIM - C285Y

DHR - R229K DNU - G353R

DH0 - K235T D^H - A354R

DWI - M254R

*DNB - G355S - češće u Evropi

Slika 7. Slabiji D (weak D) fenotipovi i B. Parcijalni D fenotipovi.

Preuzeto, modifikovano i prevedeno iz: Westhoff CM. Review. Rh blood group antigen... dominant, div.

Preuzeto i adaptirano iz: Jovanović Srzentić S, Veljković D. Imunobiološki i klinički značaj krvnih grupa. IntraNet communication, Beograd, 2009.
erse and difficult. Immunohematology 2005.; 2;4: p.155-164.

1.10 DEL

Veoma slabo izražen oblik antiga D nazvan je DEL (prethodni naziv bio je Del) zato što je prvi put dokazan isključivo adsorpcijom anti-D antitijela na ispitivane eritrocite, a potom elucijom sa ispitivanih eritrocita, što znači da se D antigen dokazuje isključivo postupkom elucije (DEL). Eritrociti fenotipa DEL na membrani obično imaju 200 i manje epitopa antiga D [63]. Najčešći oblik fenotipa DEL nastaje zamjenom nukleotida nukleotidom C1225A u eksonu 9 alele *RHD* (K409K) [64]. Pošto ima veliku prevalenciju kod osoba

azijskog porijekla, označen je kao “azijski tip” fenotipa DEL [59]. Ova zamjena predstavlja tiki pojedinačni nukleotidni polimorfizam (SNP), jer aminokiselina lizin (K) na poziciji 409 ostaje nepromjenjena.

Na drugim DEL alelima zapažaju se potporne molekularne promjene koje uzrokuju izraženije fenotipske efekte nego kod slabih D fenotipova i snažno ometaju, ali ne sprečavaju u potpunosti integraciju membrane [65-68]. Čak i u kombinaciji, fenotipovi DEL imaju malu učestalost kod ljudi evropskog porijekla. Oko 30% naizgled D-negativnih stanovnika istočne Azije nosi DEL *RHD* (K409K), mada su i druge molekularne promjene češće u Aziji nego u Evropi.

Fenotip DEL je zanimljiv za izučavanje u cijelom svijetu, zbog svog potencijala da uzrokuje nastanak anti-D antitijela, kada se DEL-pozitivni davaoci krvi netačno obilježe kao D-negativni [69]. Dodatno, *DEL* aleli mogu da uzrokuju neusaglašenosti u tumačenju genotipa, odnosno fenotipa, a o njima treba misliti kada genotipske metode određivanja krvnih grupa fetusa zavise od etničke pripadnosti roditelja [54,56, 69-70]. Fenotip DEL kod fetusa nije rizik za nastanak hemolizne bolesti fetusa i novorođenčeta.

1.11 RhD-negativan fenotip

Najčešći D-negativan haplotip u svim populacijama nastaje delecijom cijelog *RHD* gena, uz istovremeno prisustvo hibridnog *Rhesus box-a* (Slika 4). Međutim, postoje i drugi D-negativni haplotipovi [71-72]. Neke D-negativne osobe mogu da budu nosioci nefunkcionalnog *RHD* alela. Jedan od prvih nefunkcionalnih *RHD* alela nazvan je *RHD* pseudogen (*RHD ψ*). Od tada je opisano nekoliko hibridnih *RHD-CE-D* alela, uključujući i *Cde^s*, sa njegovim karakterističnim hibridnim *RHD/CE* eksonom 3. Oba nefunkcionalna alela češće se zapažaju u populaciji Afrike. Rjeđi oblici D-negativnih alela posljedica su različitih hibridnih *RHD-CE-D* alela, ili kada su ove osobe nosioci nonsense i frame shift mutacija [65,73]. Važno je napomenuti da razdvajanje D-negativnog fenotipa od fenotipa DEL u serološkom radu može da izgleda neosnovano. Međutim, u kliničkoj praksi to nije slučaj: transfuzija

DEL eritrocita D-negativnom primaocu može da bude imunogeni događaj, a uobičajeni “azijski DEL tip” nije sklon da stvara anti-D antitijelo poslije primjene normalnih, D-pozitivnih eritrocita. Tako u azijskoj populaciji, gdje je D-negativan fenotip rijedak, utvrđivanje DEL fenotipova među primoacima (oko 1/3 svih serološki D-negativnih) može značajno da smanji potrebe za Rh-negativnim eritrocitima [74-77].

1.12 Rh_{null}

Nedostatak RhD i RhCE proteina može da nastane zbog nasljeđivanja dva nefunkcionalna *RHCE* alela udružena sa delecijom *RHD* alela. Ova konstelacija pogoduje nastanku amorfognog Rh_{null} fenotipa (potpuni nedostatak Rh proteina), kod koga nisu izraženi ni D, niti C i E antigeni [78-79]. Alternativno, defekt u aleli *RHAG* može da dovede do nedostatka i RhD i RhCE proteina. Ovaj biološki osnov daje objašnjenje zbog čega defekti u *RHAG* aleli dovode do nastanka regulatornog Rh_{null} fenotipa (nedostatak ekspresije Rh proteina), kod koga ni D niti CE antigeni ne mogu da se dokažu na eritrocitima, iako principijelno jesu izraženi na njihovoj membrani [80].

Aloimunizacija Rh_{null} osoba u trudnoći može da bude veoma dramatična i teška za transfuziološko zbrinjavanje, zbog nedostatka kompatibilne alogene krvi. Za potrebe transfuzije fetusu i novorođenčetu uzima se krv majke [81].

1.13 Filogenetske osobenosti alela *RHD*

Filogenetska ispitivanja alela *RHD* opisala su četiri klastera: evroazijski D klaster sa konsenzus aleлом *RHD* (Genbank mRNA NM016124.3) najčešćim aleлом kod ljudi, kao i tri afrička klastera, obilježena kao DIVa, DAU i slabi (weak) D tip 4. Klasteri se definišu kao grupe alela koji se razlikuju od konsenzus alela *RHD* i obuhvataju mnoge alele kod kojih su nastale dodatne zamjene aminokiselina [82]. Kada se u potpunosti otkriju genetske karakteristike o alelima *RHCE* (Genbank mRNA NM 020485.3) i

kada dobijemo više informacija o njihovoj povezanosti sa specifičnim *RHD* alelima u haplotipovima, postojeće filogenetsko stablo biće potpunije i bolje definisano [83].

1.14 Populacione studije

Na osnovu sistematskih ispitivanja u afričkoj populaciji i sporadičnih observacija kod aloimunizovanih pacijenata i bolesnika sa anemijom srpastih ćelija, očigledno je da su varijacije alela kod ljudi Afrike mnogo veće i raznovrsnije, nego u bilo kojoj drugoj populaciji. Razlog za postojanje tolikog broja *RH* alela u Africi ostaje i dalje nepoznat. Otkrivanje potencijalnog selektivnog pritiska ili selektivne prednosti mogu da osvijetle funkciju sistema Rhesus. Prevalencija određenih alela u južnoj i zapadnoj Africi takođe se razlikuje, ali još uvijek nije sasvim proučena, dok ispitivanja u istočnoj Africi nedostaju u velikoj mjeri.

Narodi Evrope i istočne Azije dijele male i preklapajuće podsetove afričkih alela, koji se nazivaju evroazijski D klasteri. Osnovni aleli ovih klastera su afričkog porijekla i više nego uobičajeno preovladavaju u populaciji Afrike. Evroazijski D klaster možda ima više poznatih alela u odnosu na druga tri klastera u kombinaciji, ali je ovo još uvijek na nivou observacije, jer mnogi aleli i dalje čekaju da budu istraženi. Narodi arapskog i indijskog porijekla predstavljaju najveću populaciju u kojoj polimorfizmi *Rhesus* gena još uvijek nisu ni istraženi.

Mnogi klasteri danas mogu da se okarakterišu, zato što su poznata dva takozvana "siročad" alela, koji možda predstavljaju primordijalne alele za dva nova D klastera. Druga tema za istraživanja je raznovrsnost nukleotidnih sekvenci u okviru kodirajućeg regiona *RH* alela i povezanost alela *RHCE* sa alelima *RHD* (Prilog 1, Tabela 7).

Tabela 7. Preporuke za nomenklaturu *RH* alela

(Preuzeto i adaptirano sa http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/redcells/blood group allele terminology/allele tables/weak an Del Alleles v2.01 10914. pdf)

Fenotip	Oznaka	Primjer
RHD	<i>RHD</i>*01	
RHD-null	<i>RHD</i> *01N+alel na kome je null mutacija	<i>RHD</i> *01N.01 <i>RHD</i> *01N.02
D-partial	Broj alela povezan sa fenotipom ili oznakom kategorije	<i>RHD</i> *06.01 <i>RHD</i> *01.02 *
D-weak	<i>RHD</i> *01W+tip ili od broja 100	<i>RHD</i> *01W.01 <i>RHCE</i> *01 (ce) <i>RHCE</i> *02 (Ce) <i>RHCE</i> *03 (cE) <i>RHCE</i> *04 (CE)

Prevalencija alela među evroazijskim D klasterima [84] znatno se razlikuje između naroda Europe i Istočne Azije. Na primjer, slabi D tipovi 15 i 17 česti su u istočnoj Aziji, a rijetki u Evropi, dok se "evropski" slabi D tipovi od 1 do 4.1 rijetko mogu naći u istočnoj Aziji. Ispitivanje vršeno metodom slučajnog uzorka otkrilo je dodatne raznolikosti u eksonu 5 gena *RHD*, koji se smatra regionom sa najvećim varijacijama alela, mada ovo može da bude još jedna predrasuda nastala tokom observacija [39].

1.15 Klinički značaj slabog D, parcijalnog D i fenotipa DEL

Tokom prethodne decenije dobijene su genetske informacije o lokusu RH, a stečena su i saznanja o značajnim varijacijama ovog gena. Sve je to pomoglo da se objasne pojave neusaglašenih rezultata prilikom određivanja RhD antiga, kao i neke nejasne serološke observacije. Nadalje, serološko određivanje RhD antiga uvek je predstavljalo izazov zbog varijacije u

proizvodnji anti-D test reagenasa tokom godina. Iako su monoklonski test reagensi senzitivniji, poznato je da svi anti-D test serumi ne mogu da dokažu određene oblike parcijalnog i slabog antiga D [78]. Osobe koje imaju neku od varijanti antiga D koja se razlikuje u odnosu na normalno izražen D antigen mogu da imaju problem, jer anti-D reagensi dobijeni iz različitih izvora pokazuju različite jačine aglutinacije sa ispitivanim eritrocitima. Upotreba različitih anti-D test reagenasa može da dovede do neusaglašenosti u postupku utvrđivanja neke od varijanti antiga D. Klinički značaj određivanja RhD statusa ženi u reproduktivnom periodu ogleda se u razdvajanju parcijalnog od slabog oblika antiga D. Komercijalnim serološkim test reagensima nije moguće napraviti razliku između ova dva oblika. Ekstenzivno ispitivanje pacijenata koji imaju slabi D antigen, a transfundovani su RhD-pozitivnim eritrocitima pokazalo je da osobe sa slabim D antigenom tipova 1, 2 i 3, koji čine 90% svih ispitanih sa slabim D antigenom, ne stvaraju anti-D antitijelo i mogu bezbjedno da dobiju RhD-pozitivnu krv. Nasuprot njima, osobe sa parcijalnim oblikom antiga D često stvaraju anti-D antitijelo i trebalo bi da dobijaju RhD-negativnu krv, dok su trudnice i porodilje sa ovim oblikom antiga D kandidati za RhD imunoglobulin. Na osnovu ovih zapažanja donijet je stav da se za određivanje antiga D u prenatalnoj i transfuziološkoj praksi koristi samo test direktnе aglutinacije. Značajno je napomenuti da su, prema aktuelnim preporukama Savezne direkcije za lijekove Sjedinjenih Američkih Država (FDA) licencirani monoklonski anti-D test reagensi formulisani i proizvedeni tako da ne daju direktnu aglutinaciju sa parcijalnim oblicima DVI. DVI je najčešći oblik parcijalnog antiga D u bijeloj populaciji [79], a anti-D koje stvaraju osobe sa fenotipom DVI može da dovede do fatalnih oblika HBN [80]. Eliminacijom tehnike IAT u serološkom testiranju trudnice sa parcijalnim DVI se klasificuju kao RhD-negativne za transfuziju krvi i RhD imunoprofilaksu.

Određivanje *RHD* genotipa davaocima krvi ima veći značaj nego za primaocce transfuzija, zato što može da isključi osobe sa slabim D ili fenotipom Del, u grupi naizgled D-negativnih davalaca krvi [81]. Kao davaoci krvi,

eritrociti osoba sa slabim i parcijalnim oblicima antiga D mogu da stimulišu

stvaranje anti-D antitijela kod D-negativnih primalaca. Postalo je očigledno da su određivanje fenotipa i genotipa davaocu mnogo snažnije kvalitativno oruđe od dva ili više serološka testa. Bez utvrđenih algoritama za dokazivanje fenotipa i genotipa davaocima krvi, RhD-negativni pacijenti koji su u riziku da prime krv fenotipa slabi D ili Del su u stalnom riziku da budu imunizovani [81-87]. Drugi potencijalno ozbiljan rizik potiče od serološki RhD-negativnih davalaca krvi, koji su u stvari D pozitivne/D negativne himere. Ove osobe imaju mali broj D-pozitivnih eritrocita sa normalnom ekspresijom D antiga, tako da jedna jedinica eritrocita ovih davalaca sadrži oko 10 ml "normalnih" D-pozitivnih eritrocita [81]. Njihovom transfuzijom može da se podstakne imuni odgovor kod RhD-negativnog primaoca, iako se RhD-pozitivni eritrociti ne mogu dokazati rutinskim serološkim tehnikama [81]. U eri molekularne genetike, sa potencijalom za prospektivnu brigu o zdravlju stanovništva i liječenju zasnovanom na mogućnostima genetskog polimorfizma, *RHD* polimorfizmi koji dovode do nastanka izmjenjene ekspresije antiga D trebalo bi da budu dio medicinske dokumentacije svake osobe.

1.16 RhD epitopi na proteinima Rhce (DHAR, csCF, ceRT, ceSL)

Saznanje da neki Rhce proteini nose D-specifične aminokiseline kao i da se na njima nalaze epitopi slični epitopima antiga D i da oni reaguju sa nekim monoklonskim anti-D test reagensima, dodatno otežava serološko određivanje antiga D. Dva slučaja DHAR, dokazana kod osoba njemačkog porijekla, kao i Crawford, ceCF, dokazan kod Amerikanaca afričkog porijekla, često dovode do problema u serološkom utvrđivanju antiga D u Sjedinjenima Američkim Državama [41]. Oni su posebno zapaženi, jer sa nekim od monoklonskih test reagenasa daju jake reakcije aglutinacije (3+ do 4+), dok sa drugima aglutinacija izostaje. Manje izražene su neusaglašenosti uzrokovane zamjenama aminokiselina koje imitiraju strukturu D-epitopa (epD6), kada dolazi do slabe reakcije ovih eritrocita sa nekim monoklonskim anti-D (ceRT and ceSL) [88-91].

Budući da eritrociti ovih osoba na svojoj membrani nemaju RhD antigen, one mogu da budu senzibilisane, ukoliko se ne klasifikuju kao RhD-negativne [88-91].

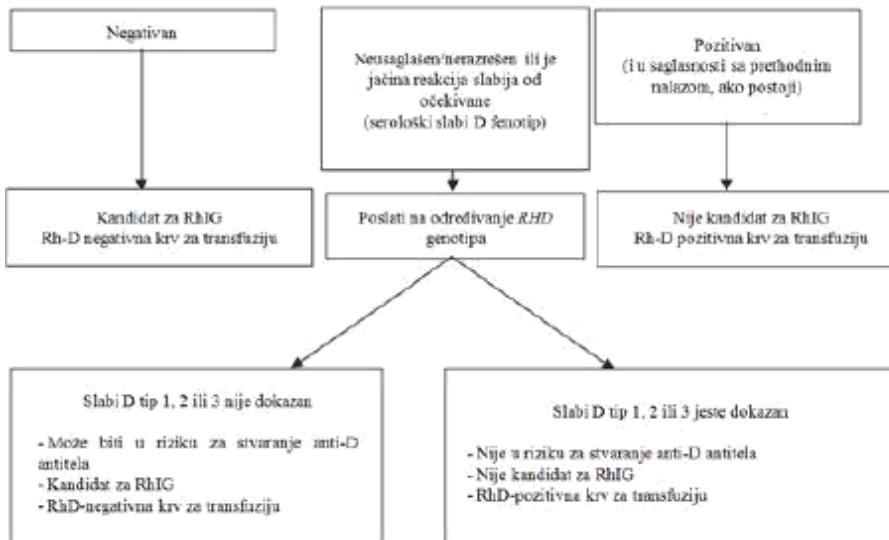
1.17 Potencijalne prednosti određivanja *RHD* genotipa davaocima, pacijentima i trudnicama

Slabi D antigen dokazan serološkim tehnikama ili serološki slabi D fenotip, definiše se kao oblik koji sa anti-D reagensom koji u direktnoj aglutinaciji ne daje reakciju ili daje slabo pozitivnu reakciju, $\leq 2+$, dok je reakcija sa antihuman- globulin reagensom umjerena ili jaka. Pojava neusaglašenih rezultata kod serološkog utvrđivanja parcijalnih ili slabih oblika antiga D je česta u rutinskoj praksi, a može da se prevaziđe određivanjem *RHD* genotipa, kojim se obezbjeđuje preciznija analiza [92].

U 2014. godini, Komitet za transfuzionu medicinu američkih patologa objavio je rezultate ispitivanja više od 3100 laboratorija u namjeri da utvrdi njihovu strategiju i procedure za testiranje serološki slabih D fenotipova i primjenu RhD imunoglobulina [92]. Jedan od zaključaka je zapažanje da u Sjedinjenim Američkim Državama ne postoji standardna praksa za interpretaciju rezultata ispitivanja RhD antiga, kada se dokaže serološki slab D antigen.

U nekim laboratorijama, osoba sa serološki slabo izraženim D antigenom, posebno ukoliko je davalac krvi, označava se kao RhD-pozitivna. Ako se serološki slab D fenotip dokaže kod osoba ženskog pola u generativnom periodu, one se tretiraju kao RhD-negativne u situacijama kada je potrebno primijeniti transfuzije krvi ili RhD imunoprofilaksu. Primjećeno je takođe da postoje varijacije u karakteristikama izvođenja seroloških metoda za ispitivanje RhD antiga. Za pacijente, kao i za trudnice, većina laboratorijsa u razvijenim zemljama svijeta koristi test procedure koje ne podrazumijevaju korišćenje indirektnog antiglobulinskog testa za dokazivanje slabog D antiga, pa se na taj način rezultati testiranja ovih osoba interpretiraju kao RhD-negativni. Postoje laboratorijske koje koriste indirektni antiglobuliski test za

dokazivanje slabog D antiga za istu kategoriju pacijenata. Za davaoce krvi i novorođenčad, standardna praksa u većini laboratorijskih je da se dokažu serološki slabi D fenotipovi i da se interpretiraju kao RhD-pozitivni [88]. Cilj ovih laboratorijskih procedura je da se RhD-negativne osobe zaštite od nesmotrene aloimunizacije D antigenom poslije transfuzije RhD-pozitivnih eritrocita, uključujući eritrocite koji imaju slabo izražen antigen D. Iako u Sjedinjenim Američkim Državama u skorije vrijeme nije sprovedena prospektivna studija, procjenjuje se da je sadašnja praksa za određivanje RhD antiga, zajedno sa aktuelnom ginekološkom praksom u primjeni antinatalne i postpartalne imunoprofilakse, uspješna u 98,4 do 99% slučajeva u sprečavanju RhD aloimunizacije i RhD hemolizne bolesti fetusa i novorođenčeta [88]. Međutim, evidentne su neopravdane posljedice koje nastaju zbog prakse da se osobama sa serološki slabim D fenotipom ne određuje *RHD* genotip, u koje spadaju nepotrebna primjena RhD imunoglobulina i transfuzija RhD-negativnih eritrocita (čije su rezerve uvijek ograničene), umjesto potpuno bezbjedne transfuzije RhD-pozitivnih eritrocita [92-93]. Pomenuta radna grupa je revidirala sadašnja znanja i iskustva u *RHD* genotipizaciji i predložila selektivnu integraciju ove metode u laboratorijsku praksu radi povećanja sigurnosti u testiranju i obezbjeđenja veće pouzdanosti rezultata prilikom određivanja RhD statusa, smanjenja nepotrebne primjene RhD imunoglobulina kod žena sa serološki slabo izraženim D antigenom i očuvanja RhD-negativnih jedinica krvi, koje bi se primjenile osobama sa weak D tipovima 1, 2, i 3. (Slika 8) [54, 92-95].



Slika 8. Algoritam za rješavanje seroloških rezultata slabih D fenotipova određivanjem *RHD* genotipa

Preuzeto i adaptirano iz: Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, Denomme GA, Delaney M, Keller MA, et al. *It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype*. *Transfusion* 2015; 55(3): 680–9).

1.18 Značaj molekularnog testiranja u predviđanju *RHD* alela

Jačina reaktivnosti raznovrsnih anti-D test reagenasa i različite metode za dokazivanje RhD antigena mogu da dovedu do neusaglašenih rezultata između prethodnih i aktuelnih rezultata ispitivanja. Problemi u testiranju antigena D mogu da se prevaziđu kombinacijom seroloških ispitivanja i molekularnih tehnika. Metode PCR su korisne u određivanju antigenog profila davaoca krvi kada antitijelo iz test reagensa reaguje slabo ili reagens nije dostupan. Ispitivanje ovih antigena metodom PCR (PCR-reakcija lančane polimeraze) moguće je bez nabavke specijalnih reagenasa koji sadrže antitijela i predstavljaju primjer u kome su metode zasnovane na tehnologiji PCR u prednosti u odnosu na testove hemaglutinacije. Ispitivanje davalaca analizom DNK korisno je kod utvrđivanja varijanti Rh antigena. DNK analize nisu pogodne za rutinsko utvrđivanje ABO i RhD krvnih grupa iz sljedećih razloga:

a) potentna, dobro standardizovana monoklonska antitijela visokog afiniteta za određivanje D antiga su dostupna; b) hemaglutinacija je relativno jednostavna i brza tehnika; c) postoje automatizovani sistemi za efikasno ispitivanje i očitavanje D antiga kod davalaca krvi. Postoji jedan antigen D, ali je preko 200 poznatih *RHD* alela. Sasvim je sigurno da taj broj nije konačan i da još mnogi aleli čekaju da budu otkriveni. Eritrociti sa slabo izraženim antigenom D skoro su uvek C+ ili E+. Bojan od transfuzije eritrocita Rh fenotipa Ccddee ili ccddEe koji imaju serološki nedetektabilan antigen D osobama koje su RhD-negativne, može se prevazići transfuzijom D- C- E- eritrocita (koji su, uglavnom, zaista D-negativni), umjesto prekomjerne upotrebe metoda zasnovanih na tehnologiji PCR za dokazivanje varijanti antiga D. Ovaj pristup ima oponente, koji, kao Flegel, zagovaraju DNK testiranje svim davaocima krvi [96]. Za rutinsko određivanje D antiga davaocima krvi DNK ispitivanje zahtijeva više vremena, novca, postoji mogućnost pogrešne interpretacije i zbog svega toga, ne predstavlja napredak u odnosu na testove hemaglutinacije. DNK ispitivanja Rh antiga imaju značaja u rezoluciji anomalija antiga D, dokazivanjem da je neusaglašenost u ispitivanjima posljedica genetskih varijanti (bez izvođenja zamašnih ispitivanja krvnih srodnika), a ne greške u radu tehničara ili neodgovarajućeg kvaliteta test reagenasa. Mnogi Rh fenotipovi ne bi mogli da se definišu samo na osnovu testova hemaglutinacije, bilo zbog nedostatka odgovarajućih panela monoklonskih antitijela ili njihovog neadekvatnog aviditeta, titra ili količine. Testovi bazirani na metodi PCR mogu da budu korisni u definisanju nekih varijanti antiga Rh kao i u preciznom određivanju D-statusa davaoca i pacijenta. Od posebnog su značaja hr^S i hr^B antigeni, čije odsustvo je kodirano od strane nekoliko zasebnih alela [33].

1.19 Opis aktuelnih tehnika za genotipizaciju *RHD* alela

Trenutno je širom svijeta u upotrebi više tehnika za određivanje varijanti gena *RHD* kod serološki RhD-negativnih ili slabo pozitivnih davalaca krvi. Tehnike koje se uobičajeno koriste su:

a) **konzervativna PCR-SSP tehnika**- tehnika lančane polimeraze uz upotrebu prajmera specifičnih za sekvenu ima široku primjenu i podrazumijeva amplifikaciju ciljne sekvene DNK uz polimerazu koja je stabilna na toploti (obično Taq polimeraza), koja enzymski spaja novu dvolančanu DNK, korištenjem slobodnih nukleotida. Ovo se postiže u termosajkleru, u kome se dvolančani model grijе do tačke ključanja, kako bi se razdvojili senzitivni i nesenzitivni lanci, poslije čega se temperatura polako i sporo snižava i dugo održava na onoj jačini koja omogućava jednolančanim DNK oligonukleotidnim sekvencama (prajmerima) da se zakače na model i započnu amplifikaciju. Proces se ponavlja kroz ponovljene brojeve ciklusa, a produkt može da se vizuelizuje elektroforezom na agarozu gelu [96-97].

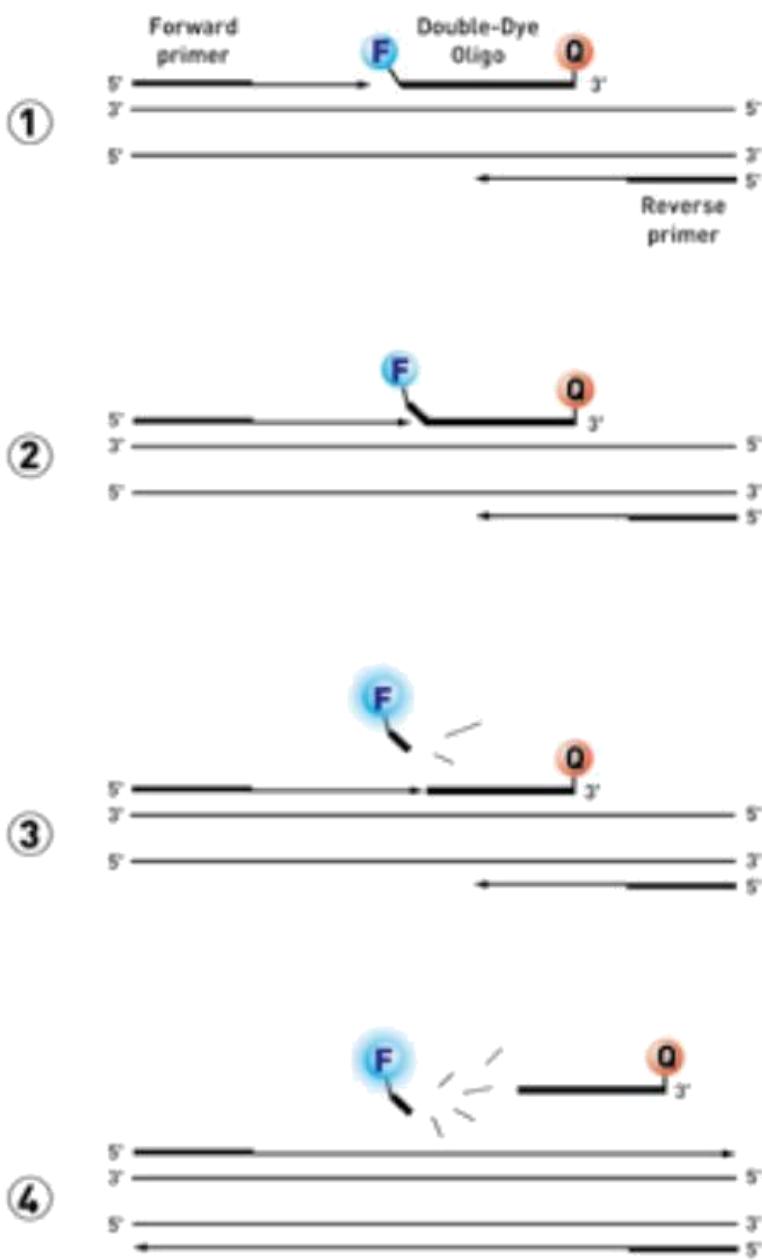
b) **kvantitativna PCR tehnika (qPCR)**- qPCR ili kvantitativna PCR tehnika je druga generacija metode PCR, koja se zasniva na istom principu kao i konvencionalna PCR, ali dozvoljava istovremenu detekciju i kvantifikaciju DNK, upotrebom još jedne ili dvije metode: 1) nespecifičnih fluorescentnih boja, koje se inkorporiraju u prisustvu bilo koje dvolančane DNK, ili 2) fluorescentno obilježenog oligonukleotida specifičnog za sekvenu.

Obje metode podrazumijevaju specifične prve i poslednje prajmere, polimerazu stabilnu na toploti i slobodne nukleotide. Međutim, termosajkler koji se koristi u ovoj tehnici ima sposobnost da emituje svjetlost i da nadraži fluohrom ili fluorescent boju, što dovodi do emitovanja fluorescencije na relativnoj talasnoj dužini. Ovo emitovanje se potom, kako reakcija napreduje, detektuje kao vizuelizacija DNK amplifikacije (odnosno predstavlja "reakciju u stvarnom vremenu"). Prvi pomenuti metod koristi boju koja se vezuje za DNK (SYBR zeleno), prisutna je u testu, ali emituje fluorescenciju poslije vezivanja za dvolančanu DNK. Količina fluorescencije se određuje poslije svakog

ciklusa, što omogućava mjerjenje koncentracije amplifikovane DNK. Ovaj

metod ima ograničenja, zato što će svaka dvolančana DNK davati fluorescenciju u reakciji, što može da dovede do interferencije sa nespecifičnim PCR produktima. Ona nema mogućnost multiplih reakcija, jer ne može da razdvoji različite produkte amplifikacije. Drugi pomenuti qPCR metod podrazumijeva dvostruko obilježeni oligonukleotid (probu), koji se konjuguje sa fluohromom na 5' kraju oligonukleotida i ukršta sa unutrašnjim regionom PCR produkta. Prigušivač na 3' kraju oligonukleotida inhibira emisiju preko energetskog transfera fluorescentne rezonance (FRET), zahvaljujući tjesnoj blizini sa fluohromom. Kada se proba veže za jednolančani model DNK, a potom je polimeraza otcijepi, dolazi do pojave emisije, koja se detektuje u stvarnom vremenu (Slika 9.) [97].

c) U posljednje vrijeme dizajnirani su automatizovani sistemi za male serije uzoraka, koji koriste sofisticirane metode genotipizacije uz primjenu fluorescentne tehnologije.



Slika 9. Mehanizam fluorescencije u dvostruko obilježenim qPCR probama (prajmerima).

Prilagođeno i adaptirano prema: Nagl L. IMPROVING THE DETECTION OF DONATIONS WITHIN THE RHD NEGATIVE BLOOD DONOR PANEL WHICH WEAKLY EXPRESS THE RHD ANTIGEN. School of Biomedical Sciences Queensland University of Technology. Institute of Health and Biomedical Innovation, QUT Research and Development Division, Australian Red Cross Blood Service Submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Master of Applied Science (Research), 2014.

1.20 Određivanje velikog broja *RH* genotipova

Ne postoji nijedan krvnogrupni sistem sa tako složenom genetskom osnovom, kao što je to *RH*. Veliki broj i kompleksnost *RH* alela među različitim populacijama predstavljaju izazov za razvijanje sveobuhvatnog oruđa za identifikaciju svih onih koji imaju klinički značaj. Postojanje tehnologije za određivanje velikog broja genotipova može da bude odgovarajuće rješenje za njenu široku upotrebu u kliničkoj praksi [98-99], a razvijeno je nekoliko aparata za tu namjenu [100-103]. Modifikacija aktuelnih statičkih visoko propusnih tehnologija omogućuje genotipizaciju velike grupe davalaca i primalaca, kao i testiranje genotipiziranih jedinica davalaca i primalaca na osnovu podataka u informacionom sistemu, takozvano "suvo testiranje" [104-107]. Dodatno, kompjuterski sistemi za pohranjivanje informacija o davaocima i pacijentima trebalo bi da budu modifikovani tako da daju odgovarajuće informacije o alelu, jer sadašnji komercijalni klinički sistemi za bazu podataka u kojima se čuvaju serološke informacije, ne odgovaraju toj namjeni.

1.21 Određivanje *RHD* zigotnosti

Određivanjem ekspresije antiga D, C/c, i E/e serološkim tehnikama na membrani eritrocita može samo da se prepostavi da li je osoba homozigot (D/D) ili heterozigot (D/–). Međutim, zigotnost gena *RHD* danas može da se utvrdi dokazivanjem recessivnog D-negativnog alela. U prenatalnoj zaštiti, ispitivanje *RHD* zigotnosti oca značajno je za predviđanje fetalnog RhD statusa, kada majka ima anti-D antitijelo. Etničko porijeklo roditelja ima značaja u funkcionalnosti samog testa, zato što su različiti genetski događaji odgovorni za nastanak D- negativnih fenotipova. Dopunski testovi zigotnosti za dokazivanje odsustva gena *RHD* podrazumijevaju dokazivanje regiona koji nastaje delecijom gena RHD, 37-bp insert *RHD* pseudogen, D-negativan *RHD-CE-D* hibridni gen [104-105].

1.22 Prenatalna dijagnostika

Određivanje *RHD* genotipa fetusa dio je rutinske procedure koja se izvodi u okviru praćenja hemolizne bolesti fetusa i novorođenčeta. Mnogi od ovih slučajeva još uvijek su uzrokovani anti-D antitijelom koje stvara D-negativna žena, mada ih mogu stvarati i trudnice sa parcijalnim oblikom antiga D [108-110]. Upotreba DNK iz amnionske tečnosti za određivanje fetalnog RhD i drugih krvnogrupnih antiga predstavlja pouzdanu metodu izbora već više od deset godina [111]. Uzimanje fetalnog uzorka iz amnionske tečnosti izbjegava se procedura velikog rizika, kakva je uzimanje krvi fetusa iz pupčanika, za testiranje krvnih grupa. Međutim, amniocenteza će najvjerojatnije biti napuštena, u korist sigurnije procedure, kakva je ispitivanje DNK fetusa iz periferne krvi majke [112-113].

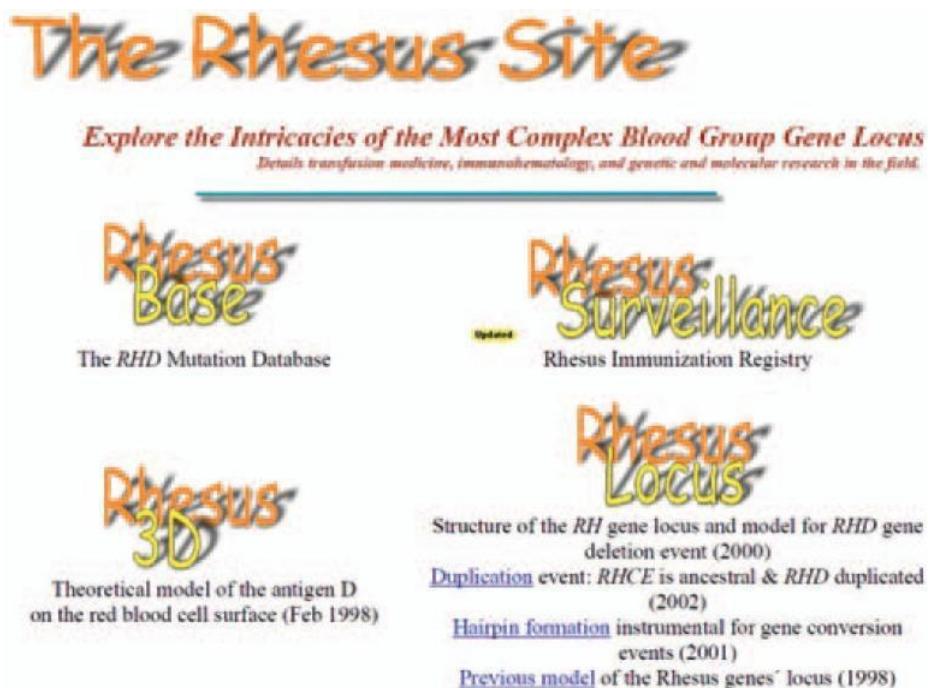
1.23 Ispitivanje slobodne DNK u plazmi majke

Osjetljivost kvantitativne PCR ili PCR u stvarnom vremenu u dokazivanju slobodne DNK fetusa u perifernoj krvi majke primjećeno je još 1998.god. [114-115]. Ova DNK fetusa predstavlja relativno male fragmente DNK [116-117] dobijene iz plazme majke, koja je oslobođena iz ćelija fetusa u njenoj cirkulaciji. Prednost slobodne DNK fetusa je u tome što se može dobiti iz krvi majke nekoliko sati poslije rođenja [118], ali se uzorak DNK fetusa izdvaja i tokom trudnoće u nekoliko zemalja Evrope, kako bi se identifikovale trudnoće sa rizikom za nastanak HBFN i primjenili algoritmi za primjenu RhIg profilakse u *RHD*-negativnim trudnoćama [119-122].

1.24 Rhesus sajt

Rhesus sajt je najveći izvor informacija za krvnogrupni sistem Rh. Namjenjen je specijalistima transfuzijske medicine, kao i onima koji nisu specijalisti iz ove oblasti, ali su im značajne provjerene informacije na ovu temu. Veb sajt sadrži podatke o istraživanjima iz oblasti transfuzijske 38

medicine, imunohematologije i molekularnih ispitivanja. Linkovi vode do značajnih publikacija i metodoloških izvora za Rhesus. Mnogi podaci koji su originalno prezentovani na Rhesus sajtu kasnije su formalno objavljeni u stručnoj literaturi. Odjeljak ‘RhesusBase’ predstavlja najveću bazu podataka za *RHD* alele; odjeljak ‘RhesusSurveillance’ razmatra rezultate najvećih prospektivnih studija o imunizaciji D antigenom kod D-pozitivnih pacijenata. Veb izvori za sve dostupne podatke o krvnogrupnom sistemu Rh su: The Rhesus Site (www.uni-ulm.de/wflegel/RH/); Weak D nomenklature (www.uni-ulm.de/wflegel/RH/WeakD/) (*Nomenklatura slabog D antiga*na); GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ722727.1) (Banka gena); RhesusBase (www.uni-ulm.de/fwagner/RH/RB2/) (Rhesus baza); Rhesus Immunization Registry (www.uni-ulm.de/wflegel/RH/RIR/#title) (Registar Rhesus imunizacije) (Slika 10) [123].



Slika 10. Grafički prikaz Rhesus sajta, The Rhesus Site, kada posjetioci dođu na njegov URL (www.uni-ulm.de/wflegel/RH/). Ispod naziva i horizontalne ponude, prvi odjeljak sadrži linkove za četiri osnovne oblasti o podacima naučnog istraživanja u okviru krvnogrupnog sistema Rh.

Preuzeto iz: Wagner F, Flegel WA. The Rhesus Site. *Transfus Med Hemother*. 2014 Oct; 41(5): 357–363. Published online 2014 Sep 15. doi: [10.1159/000366176](https://doi.org/10.1159/000366176).

2.0 Ciljevi istraživanja

1. Utvrditi molekularnim metodama da li davaoci krvi u populaciji Republike Srpske, kod kojih je serološki određen slab oblik antiga D, zaista imaju slabo izražen antigen D, parcijalni antigen D ili kombinaciju ova dva tipa;
2. Kod dokazanih oblika slabih i parcijalnih antiga D, utvrditi njihovu učestalost i uporediti je sa učestalošću slabih i parcijalnih antiga D u drugim populacijama bijele rase;
3. Utvrditi da li kod osoba sa dokazanim slabim i parcijalnim oblikom antiga D postoje one koje su stvorile anti-D antitijelo i da li su ti podaci u skladu sa onim objavljenim u stručnoj literaturi;
4. Testovima molekularne dijagnostike dokazati da li davaoci krvi, serološki utvrđeni kao RhD-negativni, RhD fenotipa Ccddee i cdddEe, imaju gen *RHD* i antigen D na eritrocitnoj membrani, toliko slab da se ne može dokazati serološkim tehnikama, niti dostupnim anti-D test serumima;
5. Retrospektivnom studijom utvrditi da li je neki od RhD-negativnih primalaca, Rh fenotipa ccddee, koji su primali krv fenotipa Ccddee i cdddEe stvorio anti-D antitijelo poslije primjene krvi sa naznačenim fenotipovima;
6. Na osnovu dobijenih rezultata, napraviti Registar osoba sa varijantama antiga D, kako bi u svakom trenutku raspolagali sa adekvatnim podacima o davaocima krvi u Republici Srpskoj, na osnovu čega bi se mogla vršiti razmjena podataka sa međunarodnim Registrima rijetkih krvnih grupa;
7. Postavljanje baze za Nacionalnu referentnu laboratoriju za imunohematologiju i molekularnu imunohematologiju u Zavodu za transfuzijsku medicinu Republike Srpske.

3.0 Radna hipoteza

1. Očekuje se da će se tokom izrade ove doktorske disertacije molekularnom dijagnostikom otkriti određeni oblici kako slabih, tako i parcijalnih oblika antiga D u populaciji davalaca krvi Republike Srpske, kao i da će ti slabi oblici odgovarati slabim tipovima 1-3, koji su najčešći u ostalim ispitanim populacijama bijele rase;
2. Pretpostavka je da će u populaciji davalaca krvi Republike Srpske najčešći oblik slabog antiga D odgovarati nalazima istraživača iz Hrvatske, s obzirom na istorijske i regionalne povezanosti, kao i na migracije na ovim prostorima;
3. Dokazivanje prirodnog ili imunog anti-D antitijela kod davalaca krvi sa određenim oblicima slabog, odnosno parcijalnog antiga D, trebalo bi da bude usaglašeno sa opisanim slučajevima dokazanog anti-D antitijela kod osoba sa varijantama D antiga u drugim populacijama i izvođenjem skrininga antitijela tipiziranim, enzimski tretiranim eritrocitima, kao i indirektnog antiglobulinskog testa tipiziranim, enzimski netretiranim eritrocitima;
4. Odgovarajuće ispitivanje *RHD* gena identifikovaće i serološki D-negativne davaoce krvi, koji su u stvari slab D ili DEL, što će osigurati primjenu njihove krvi isključivo D-pozitivnim primaocima;
5. Uzimanjem uzorka krvi za skrining antitijela RhD-negativnim primaocima, Rh fenotipa ccddee, koji su dobijali krv davalaca čiji je Rh fenotip bio Ccddee i ccddEe utvrдиće se da li je kod njih došlo do senzibilizacije nekom od varijanti D;
6. Radna hipoteza je da će se i kod ispitivanih davalaca krvi Republike Srpske sa varijantama D dokazati slične molekularne promjene, kao što je to opisano u literaturi;
7. Uvođenje molekularne dijagnostike kod osoba sa varijantama antiga D koji su davaoci krvi, kao i formiranje Registra davalaca sa slabim D, predstavlja formiranje Nacionalne referentne laboratorije za imunohematologiju i molekularnu imunohematologiju.

4.0 Ispitanici, materijali i metode

4.1 Ispitanici

Za izradu ove doktorske disertacije korišteni su uzorci krvi redovnih dobrovoljnih davalaca, koji su serološkim tehnikama, metodom u epruveti, metodom u mikroploči i metodom u gelu određeni kao osobe sa slabije izraženim antigenom D, na osnovu jačine aglutinacije, a prema uputstvu proizvođača test serum, kao i uzorci krvi davalaca koji su RhD/negativni, sa C i /ili E antigenom u Rh fenotipu. U bazi podataka Zavoda za transfuzijsku medicinu Republike Srpske u Banjoj Luci trenutno je evidentirano 85 osoba sa dokazanim slabijim oblikom antiga D, kao i 92 RhD-negativnih, C+/E+. Prema projekciji Zavoda za statistiku Republike Srpske, broj stanovnika u Republici Srpskoj je 1 170 342 (podaci se odnose na 2013. godinu) [124], u dobi od 18 do 65 godina ima 776 740 stanovnika, a u informacionom sistemu Zavoda za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci u periodu od aprila 2016. do marta 2017. godine registrovano je 8592 davaoca krvi, kojima je određivana krvna grupa sistema ABO i RhD antigen, a po potrebi i utvrđenom algoritmu i slabi D antigen. Od 776 740 građana koji mogu da daju krv (u dobi od 18 do 65 godina), 571 812 čine osobe muškog pola, a 598 530 su ženskog pola.

Svi davaoci krvi uključeni u ispitivanje bili su upoznati sa ciljem studije, vrstom testiranja i dali su saglasnost za učestvovanje u njemu. Sadržaj obavještenja za ispitanike i tekst saglasnosti odobreni su od strane Etičkog odbora Kliničkog centra u Banjoj Luci (Prilog 2).

4.2 Uzorci krvi za ispitivanja

Od svakog ispitanika uzimana su dva uzorka krvi na antikoagulansu EDTA: jedan za serološka ispitivanja RhD statusa, određivanje Rh fenotipa, skrining antitijela, a drugi, za molekularnu tipizaciju RhD i određivanje Rh fenotipa.

4.3 Imunohematoške metode za određivanje RhD antiga, Rh fenotipa i skrining antitijela

Cilj upotrebe imunoseroloških metoda u kliničkoj praksi je obezbjeđivanje kompatibilne krvi za transfuziju. Osnovni zahtjev koji se postavlja pri izboru testova za rad je da omoguće pouzdano utvrđivanje prisustva ili odsustva određenog antiga na ispitivanim eritrocitima i prisustvo ili odsustvo klinički značajnih antitijela u ispitivanom serumu [125-128].

Za određivanje eritrocitnih antiga izbor testa zavisi od karakteristika antiga sa jedne i raspoloživih test reagenasa (test seruma) sa druge strane. Najprostija metoda je metoda aglutinacije u test epruveti, u fiziološkom rastvoru. Ovaj test se može skoro uvijek primijeniti kada su na raspolaganju relevantna antitijela klase IgM. Kada su antitijela klase IgG reakciju treba izvoditi u koloidnom medijumu, u testu koristiti enzimom obrađene eritrocite, ili indirektni antiglobulinski test. Od ova tri testa, test sa enzimima obrađenim eritrocitima je najsenzitivniji, ali on ima i određene nedostatke: a) neki eritrocitni antigeni mogu da se razgrade enzimima, i b) enzimima obrađeni eritrociti mogu da daju nespecifičnu aglutinaciju. Indirektni antiglobulinski test rijetko daje lažno pozitivne rezultate, njime se otkriva većina klinički značajnih antitijela, pa je zbog toga zastupljen u skoro svim imunohematoškim testiranjima. Aglutinacija u koloidnom medijumu je najmanje senzitivna za većinu antitijela, ali je jednostavna za izvođenje i može da pomogne u otkrivanju nekih eritrocitnih antitijela [100]. U praksi se najpouzdaniji rezultati dobijaju kombinacijom testova

4.3.1 Aglutinacija u tečnoj sredini

Reakcija se odigrava u test epruveti poslije miješanja suspenzije eritrocita i test seruma. Za utvrđivanje prisustva ili odsustva određenog antiga koriste se test serumi poznate specifičnosti, a za otkrivanje antitijela

eritrociti poznatog fenotipa. U tečnoj sredini, odnosno u epruvetama, mogu se

izvoditi svi pretransfuzijski testovi: određivanje eritrocitnih krvnih grupa, skrining, identifikacija, titar antitijela, kao i unakrsna proba između davaoca i primaoca [129-131].

Dugogodišnja primjena ove metode u imunoserologiji eritrocitnih krvnih grupa, kao i uporedne analize sa drugim metodama su ukazale na neke njene nedostatke. U njih spadaju: potreba za relativno velikim uzorkom krvi (može da bude problem u radu sa uzorcima krvi odojčeta i novorođenčeta), velika potrošnja test reagenasa, teškoće u otkrivanju slabih antigena i antitijela kada su prisutna u maloj koncentraciji, teškoće u otkrivanju miješane populacije eritrocita, teškoće u otkrivanju multiplih antitijela i problem u očitavanju rezultata reakcije. Metoda nije standardizovana, pa rezultat u velikoj mjeri zavisi od iskustva osoblja koje je izvodi [7,132,133]. Na Slici 11. prikazani su reagensi i laboratorijska oprema za rad u epruvetama.

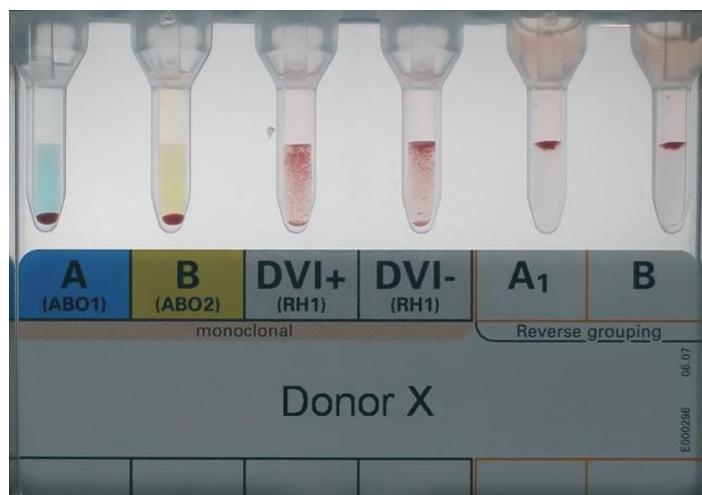


Slika 11. Standardna oprema i reagensi za imunohematološko određivanje krvnih grupa i skrining antitijela metodom u epruveti.

Preuzeto i adaptirano iz: Jovanović Srzentić S, Veljković D. Imunobiološki i klinički značaj krvnih grupa. IntraNet communication, Beograd, 2009. Izvor: www.diahem.com.

4.3.2 Aglutinacija u gelu

Tehniku reakcije antigen-antitijelo mikrometodom aglutinacije u gelu opisao je i patentirao Y. Lapierre 1985. godine. DiaMed je dizajnirao ID karticu i razvio metodu sa idejom standardizacije reakcija aglutinacije. Ova metoda zasniva se na upotrebi mikrocjevčica u kojima se nalaze partikule gela. Svaka gel kartica sadrži šest mikropruveta za šest jednakih ili različitih testova (Slika 12). Gel partikule su sferične i u testu imaju funkciju reakcionog medijuma i filtera. One zadržavaju aglutinate eritrocita, a propuštaju slobodne eritrocite na dno. Time je olakšano i ujednačeno očitavanje rezultata reakcije. Fiksacija aglutinata olakšava i ujednačava očitavanje rezultata, a posebno odvajanje pozitivnih od negativnih nalaza. Princip testa je direktna (slana sredina) ili indirektna (antihumanglobulin test) aglutinacija eritrocita, sa specifičnim antitijelima na partikulama gela [133].



Slika 12. ID kartica za određivanje krvne grupe ABO i RhD antiga davaocima krvi, metodom u gelu, monoklonskim test serumima, prema preporukama Vodiča Velike Britanije. Test serumi anti-D su monoklonski, jedna je serija koja dokazuje varijantu DVI, a druga ona koja ne dokazuje varijantu DVI.

Prednosti testa su: smanjena mogućnost greške, ujednačeniji rad svih izvršilaca, bolja kontrola kvaliteta rada, praćenje individualnog učinka svakog izvršioca je bolja, manji uzorci krvi (mikrometoda, što je značajno u pedijatriji i u odeljenjima intenzivne terapije i njege), čistiji rad (nema pranja eritrocita), mogućnost infekcije se smanjuje, kontaminacija reagenasa je nemoguća.

Fotografija reakcije koja se čuva je sigurnost za pacijenta i dio bezbjednosti svih zaposlenih u službama za transfuziju. Suspenzije eritrocita su precizno propisane, pipetiranje se vrši poluautomatskim pipetama sa tačno određenim volumenima reagenasa, omogućeno je inkubiranje i centrifugiranje ID kartica prema potrebi [133-134]. Aglutinati u gelu su postojani i lako uočljivi, tako da je očitavanje rezultata lako i ujednačeno (Slika 12). Po završenom centrifugiranju, očitavanje može da se obavi odmah, a nepromjenljivost rezultata je sigurna i poslije 24 do 48 časova, ako se ID kartica čuva na +4°C do +6°C. Rezultati mogu biti fotografisani i na taj način obezbijedeni kao trajan medicinski dokument. U ID kartici postoje tri vrste gela: a) gel sa specifičnim antitijelima, b) gel sa AHG reagensom, i c) neutralni gel [134].

Za izvođenje testova mikrometodom aglutinacije u gelu potreban je mali uzorak krvi, tako da može biti korišten i kapilarni uzorak.

Ukoliko se procedura poštuje, ova metoda se pokazala superiornijom u dokazivanju eritrocitnih antigena i klinički značajnih antieritrocitnih antitijela od konvencionalne metode aglutinacije u tečnoj sredini. Posebno je povećana mogućnost otkrivanja slabih antigena i podgrupa, kao i nižih koncentracija metodom aglutinacije u gelu, a posebno je olakšana identifikacija multiplih antitijela u serumu. Ova metoda je senzitivnija i pogodnija i u ispitivanju eluata [133-137].

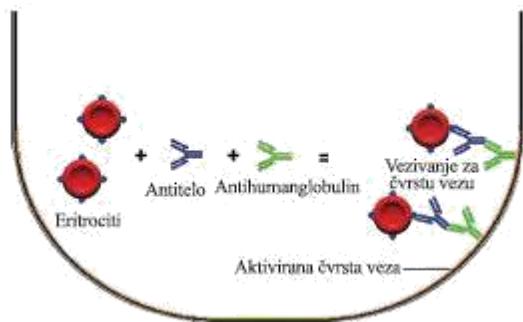
Zbog pobrojanih prednosti ovu metodu upotrebljava u rutinskom radu preko 70% evropskih transfuzioloških laboratorija (United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Blood Transfusion Laboratory Practice—UK NEQAS) kako za ispitivanje davalaca krvi, tako i primalaca krvnih komponenti i novorođene djece [138].

4.3.3 Metode čvrste faze

Metode sa čvrstom fazom (engl. *Solid phase red cells Adherence Assays-SPRCA*) upotrebljavaju se za otkrivanje eritrocitnih antigena ili antitijela od kraja osamdesetih godina prošlog vijeka. Za razliku od aglutinacije u tečnoj sredini, gdje se reakcija antitijela sa komplementarnim antigenom odigrava u tečnoj sredini (fazi), kod ovog metoda je jedan od reaktanata immobilisan (vezan za zid udubljenja), pa se reakcija odigrava na zidu udubljenja (Slika 13). U upotrebi je nekoliko različitih kombinacija metoda čvrste faze [139].

Metoda čvrste faze za otkrivanje eritrocitnih antigena

Metodom u čvrstoj fazi (engl. *Solid phase Assays for Detecting Red Cell Antigens*) krvna grupa se određuje u mikrotitarskim pločama, u kojima je za zid udubljenja vezano antitijelo poznate specifičnosti. Princip rada je jednostavan i podrazumijeva dodavanje ispitivanih eritrocita u udubljenja mikrotitarske ploče. Kada je na eritrocitima prisutan antigen za koga je specifično antitijelo, doći će do reakcije antiga na eritrocitima sa antitijelima vezanim za udubljenje zida mikrotitarske ploče. Ukoliko je reakcija negativna, odnosno ukoliko se na eritrocitima ne nalazi antigen, eritrociti će se nakupiti na dnu udubljenja formirajući dugme. U suprotnom, pozitivan rezultat će dovesti do obojenja zidova udubljenja na čitavoj površini na kojoj se nalaze vezana antitijela. Pozitivna reakcija znači prisustvo antiga na ispitivanim eritrocitima (Slika 13) [139-141].

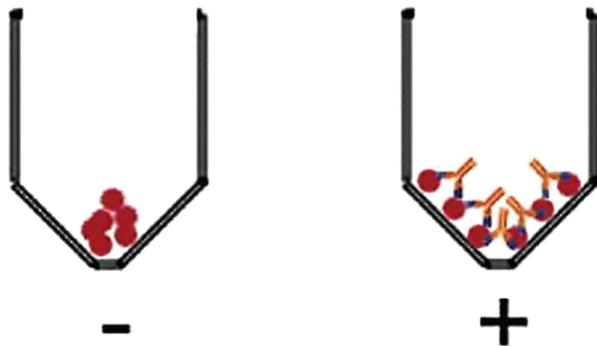


Slika13. Otkrivanje antitijela u čvrstoj fazi. Za zid epruvete vezano je sekundarno antitijelo (AHG).

Preuzeto i adaptirano iz: Jovanović Srzentić S, Veljković D. Imunobiološki i klinički značaj krvnih grupa. IntraNet communication, Beograd, 2009.

Metoda čvrste faze za otkrivanje antieritrocitnih antitijela

Za otkrivanje antieritrocitnih antitijela u ispitivanom serumu koriste se i mikrotitarske ploče u kojima je na zid udubljenja (jažice), vezana membrana test eritrocita poznatog fenotipa (engl. *Solid Phase Assays for Detecting Antibodies for Red Cell Antigens*). U udubljenje se dodaje ispitivani serum. Tokom inkubacije doći će do reakcije antiga sa komplemetarnim antitijelom, ukoliko se u ispitivanom serumu nalazi antitijelo protiv antiga vezanog za zid jažice. Mikroploče sa jažicama se potom ispiraju nekoliko puta radi otklanjanja slobodnih antitijela, a onda im se dodaju eritrociti obloženi IgG antitijelima. Negativan rezultat označava prisustvo dugmeta na dnu udubljenja, a pozitivan rezultat prisustvo difuznih aglutinata na zidovima i na dnu jažice, upravo na svim površinama na kojima je vezan antigen određene specifičnosti (Slika 14) [140-142].

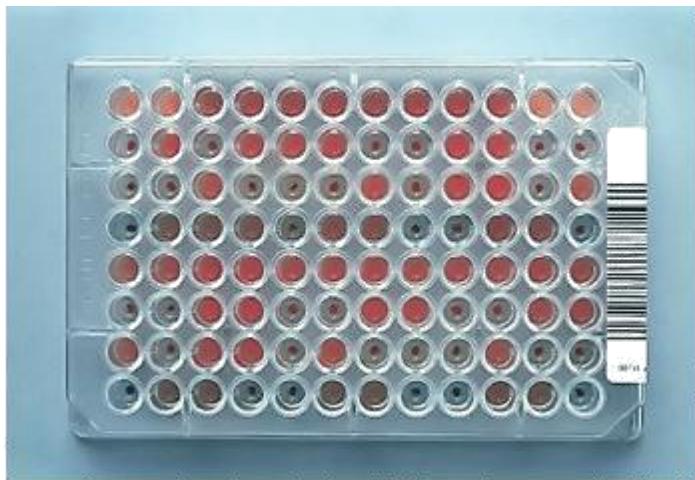


Slika 14. Očitavanje reakcije metodom aglutinacije u čvrstoj fazi. Lijevo su negativni rezultati (skupljeni eritrociti u sredini udubljenja), a desno pozitivni (difuzno aglutinisani eritrociti na cijeloj površini dna udubljenja).

Preuzeto i adaptirano sa sajta: www.medicine.mcgill.ca

4.3.4 Aglutinacija u mikrotitarskim pločama

Umjesto u test epruvetama, reakcija se odigrava u mikrotitarskim pločama. Koristi se za određivanje eritrocitnih antigena ili antitijela. Male količine eritrocita i test seruma se dodaju u mikroepruvete na pločama koje se potom centrifugiraju. Eritrociti sa dna udubljenja resuspenduju se stavljanjem ploče na mješalicu ili manuelnim protresanjem ploče, a potom se manuelno ili pomoću automatskog čitača vrši očitavanje reakcije. U slučaju negativne reakcije eritrociti su potpunosti resuspendovani u serumu, bez vidljivih aglutinata (Slika 15). Prednost ove metode u odnosu na konvencionalni metod aglutinacije u epruveti je manja potrošnja reagenasa [143-144].



Slika 15. Mikrotitarska ploča. U udubljenja mikrotitarske ploče dodaje se test serum poznate specifičnosti i ispitivani eritrociti, kao i serum ispitanika i test eritrociti poznatog fenotipa, A1, B, i O. Pozitivan rezultat je kada se u sredini udubljenja pojavi dugme (aglutinat), a negativan kada su eritrociti raspršeni na cijeloj površini dna udubljenja.

Preuzeto sa sajta: www.diahem.com.

4.4 Test reagensi za određivanje krvnih grupa sistema ABO, RhD antiga, Rh fenotipa i skrining i identifikaciju antitijela davaocima krvi u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci

4.4.1 Test reagensi za određivanje antiga D i Rh fenotipa korišteni u studiji

U serološkom ispitivanju RhD antiga i Rh fenotipova dobrovoljnih davalaca krvi, korišteni su sljedeći test reagensi: a) humani monoklonski (anti-D monoclonal, IgM/IgG), anti-D blend TH-28/MS-36 i anti-D blend 175 2-415 1E4, proizvođača CE-Immunodiagnostika GmbH, Germany; b) panel od 9 humanih monoklonskih anti-D test reagenasa: anti-D klase IgM, klona HM10, anti-D klase IgG, klona HM16, anti-D klase IgM, klona P3X61, anti-D klase IgG, klona P3X35, anti-D klase IgM, klona P3X21211F1, anti-D klase IgM, klona P3X21223B10, anti-D klase IgG, klona P3X241, anti-D klase IgG, klona P3X249, anti-D klase IgG, klona P3X290, za rad u epruveti, proizvođača Diagast, Francuska (Slika 16.).

D-SCREEN

Nº	Clone Klon	Type Typ	D Partials – D Partials – D Kategorien										
			II	IIIa IIIb IIIc	IVa	IVb	Va	VI	VII	DFR	DBT	RoHar	HMI
1	HM10	IgM	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
2	HM16	IgG	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
3	P3X61	IgM	+	+	+	+	+	-	+	±	+	+	+
4	P3X35	IgG	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
5	P3X21211F1	IgM	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
6	P3X21223B10	IgM	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
7	P3X241	IgG	+	+	+	+	-	-	+	±	-	-	+
8	P3X249	IgG	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
9	P3X290	IgG	+	+	±	-	+	±	+	+	-	-	+

Slika 16. Lista na kojoj su date karakteristike anti-D test reagenasa, koji ulaze u sastav D-SCREEN panela za utvrđivanje varijanti antiga D metodom u epruveti, proizvođača Diagast.

Za određivanje Rh fenotipa korišteni su sljedeći reagensi proizvođača Diagast, Francuska, humani monoklonski anti-C test reagens, klonova P3X25513GB+MS24, anti-E, klona 906, anti-c, klona 951 i anti-e, klona P3GD512+MS63. U ovoj studiji, za određivanje krvnih grupa sistema ABO i RhD antiga metodom u mikropločama, na aparatu Techno Twin Station, korišteni su sljedeći test reagensi: DiaClon-MP Anti-A (ćelijska linija BIRMA-1), DiaClon-MP Anti-B (ćelijska linija LM306/686 (LB-2)), DiaClon-MP Anti-AB (ćelijska linija ES131 (ES-15), ES-4), DiaClon MP Anti-DVI/IgM (ćelijska linija TH-28) i DiaClon-MP Anti-DVI+/IgM/IgG (ćelijska linija MS-201/MS-26), a svi proizvodi su proizvođača BioRad, USA, kao i monoklonski anti-D IgG (ćelijska linija ESD1), za određivanje slabijih oblika antiga D metodom u gelu, proizvođača BioRad, USA. Mikroploče sa antitijelima u suvom stanju i negativna kontrola, spremne za upotrebu, uz sljedeće test reagense za određivanje Rh i Kell fenotipova: Anti-C ćelijska linija MS-24; Anti-c ćelijska linija MS-33; Anti-E ćelijska linija MS-260; Anti-e ćelijska linija MS-63, Anti-K ćelijska linija MS-56; negativna kontrola, pufer bez antitijela (BioRad).

Za test adsorpcije i elucije, koji su rađeni u Institutu za transfuziju krvi Srbije, korišten je test serum anti-D, humani-monoklonski, proizvođača-Institut za transfuziju krvi Srbije, "in house" proizvodnja (mješavina pula seruma imunizovanih dobrovoljnih davalaca -IgG poliklonska antitijela i komercijalni monoklonski test reagensi - IgM humana, monoklonska antitijela: klon RUM1 ili MS-201).

4.4.2 Test eritrociti za određivanje krvnih grupa sistema ABO davaocima krvi u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci

Za ispitivanje ABO antitijela, metodom u mikropločama na aparatu Techno Twin Station, proizvođača BioRad, korišteni su sljedeći reagensi: eritrociti za testiranje seruma: a) DiaCell-MP ABO A₁, A₂, B, O, DiaCell-MP ABO A₁, A₂, B, DiaCell-MP ABO A₁, B, O, DiaCell-MP ABO A₁, B; b) ID-Diluens 1: Modifikovani rastvor bromelina za suspenziju eritrocita; c) ID-DiaCell ABO, test eritrociti za ispitivanje prisustva ABO antitijela u serumu ispitanika, proizvođača BioRad, metodom u gelu, ručno i na aparatu Techno Twin Station.

4.4.3 Test eritrociti za skrining i identifikaciju antitijela davaocima krvi

Za skrining i identifikaciju antitijela ispitanicima korišteni su test eritrociti za skrining antitijela tehnikom indirektnog antiglobulinskog testa, a po potrebi i enzimskom tehnikom. To su kompleti test eritrocita sa poznatom distribucijom eritrocitnih antigena, ID-DiaCell I-II-III, kao i enzimski tretirani test eritrociti za skrining antitijela ID-DiaCell I-II-IIIP, proizvođača BioRad, Switzerland. Svaki set sastoji se od dvije vrste RhD-pozitivnih eritrocita, Rh fenotipa CCDee, C^{W+}, ccDEE, kao i jedne vrste RhD-negativnih test eritrocita, Rh fenotipa ccddee. Svaki od opisanih test eritrocita ima na svojoj membrani antigene Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, M, S, s u duploj dozi, a barem jedni od ponuđenih test eritrocita pozitivni su na antigene K, Le^a, Le^b, P1 i N. Test eritrociti ID-DiaCell Pool korišteni su takođe za skrining antitijela ispitanicima na aparatu

Techno Twin Station, oni su mješavina dvije vrste test eritrocita Rh fenotipova R1R1 i R2R2, za ispitivanje seruma u IAT, a proizvođač je BioRad, Switzerland. Paneli za identifikaciju antitijela na temperaturi ambijenta i u IAT su proizvođača BioRad, Switzerland, sastoje se od jedanaest test eritrocita različitih fenotipova, od kojih je pet test eritrocita cee pažljivo odabранo i posjeduje duplu dozu antiga. Distribucija antiga na eritrocitima ima nepromjenljiv Rh raspored, a svi eritrociti su serološki testirani na prisustvo HLA antiga klase 1. Na raspolaganju je bio i panel sa enzimski tretiranim eritrocitima i istom distribucijom eritrocitnih antiga kao što je opisano i za prethodni, takođe proizvođača BioRad.

4.4.4 Određivanje krvne grupe ABO i RhD antiga davaocima krvi u Zavodu za transfuzijsku medicinu Republike Srpske

Krvna grupa ABO određuje se na osnovu prisustva ili odsustva A i/ili B antiga na eritrocitima, kao i prisustva ili odsustva anti-A i/ili anti-B antitijela u serumu. Kod odraslih osoba postoji recipročan odnos između A i/ili B antiga na eritrocitima i ABO antitijela u serumu (npr. ako je antigen A prisutan na eritrocitima očekuje se odsustvo anti-A i prisustvo anti-B antitijela, odnosno postoji takozvano Landsteiner-ovo pravilo).

RhD-pozitivan i RhD-negativan fenotip određuju se na osnovu prisustva ili odsustva D antiga na eritrocitima [145-148].

Test procedura - metoda u epruveti

Opšta pravila

- Za određivanje krvne grupe ABO i RhD antiga potreban je uzorak krvi uzet sa EDTA kao antikoagulansom; uzorci krvi od novorođenčadi i odojčadi do uzrasta od 6 mjeseci ne sadrže očekivana ABO antitijela u serumu, pa se samo vrši ispitivanje ABO antiga na eritrocitima [145-147];
- Za određivanje RhD statusa potrebno je raditi samo testiranje direktnom aglutinacijom sa anti-D test reagensom;

- Ako se određuje RhD novorođenčeta RhD-negativne majke metoda ispitivanja mora da bude osjetljiva za dokazivanje slabih varijanti D antigena [148];
- Jačina aglutinacija koja je potrebna da bi se osoba odredila kao Rh (D) pozitivna je najmanje 2+; slabija reakcija od navedene zahtjeva dodatna ispitivanja prije donošenja definitivnog zaključka;
- Ukoliko se krvna grupa ABO određuje prvi put, da bi se donio krajnji zaključak potrebna su dva podudarna rezultata ispitivanja iz istog uzorka krvi, i to korištenjem različitih metoda određivanja (pločica, epruveta, gel, mikroploča) ili izvođenjem iste metode od strane različitih tehničara i korištenjem reagenasa različitih proizvođača. Ukoliko u dosjeu postoji podatak o prethodno određenoj krvnoj grupi, on mora biti podudaran sa ABO krvnom grupom određenom iz datog uzorka [145-148];
 - Lažno pozitivne rezultate mogu da daju prisutna auto- ili aloantitijela, kontaminirani uzorak krvi i reagens ili korištenje pogrešnog reagensa;
 - Dodatnu reaktivnost mogu da daju anti-A₁ kod osoba krvne grupe A₂ ili A₂B, pasivna antitijela, antitijela protiv sastojaka reagensa, stečeni-B antigen i B(A) antigen;
 - Lažno negativne rezultate mogu da daju kontaminirani ili neaktivni reagens, propust u dodavanju reagensa ili uzorka krvi u test epruvetu, kontaminirani uzorak, fenomen prozone kod anti-A i/ili anti-B test seruma;
 - Reaktivnost može da izostane zbog leukemije, miješane populacije ćelija (genetska himera, transplantacija) ili poremećenog imunog odgovora.

4.4.5 Određivanje slabog (weak) D antigena

Fenotip weak D (slabi D) nastaje uslijed genetskih mutacija *RHD* regija koje kodiraju transmembranski dio D antigena. Manifestuje se kvantitativnim smanjenjem broja D antigena koji se nalazi na membrani eritrocita, uglavnom ne dovodi do stvaranja anti-D antitijela nakon izlaganja RhD-pozitivnim eritrocitima i interpretira se kao RhD-pozitivni fenotip, uz najčešće visok afinitet za IgM monoklonalni anti-D serum. Ekspresija D antigena može biti slaba ukoliko je *RHCE* gen na hromozomu koji je suprotan od *RHD* (trans efekat), npr. u genotipu *DCE/Ce* [145-148].

Parcijalni D fenotip nastaje djelovanjem hibridnih gena i genetskih mutacija *RHD* regija koje kodiraju dijelove D antigena na spoljašnjoj membrani eritrocita. Neki parcijalni D se ponašaju kao slabi, a drugi ne, u direktnim testovima sa anti-D serumom svi stvaraju antitijela protiv dijelova D-antigena koji im nedostaju. Ukoliko se ovi pacijenti transfunduju, neophodno je da prime RhD-negativne eritrocite, a trudnice i porodilje su kandidati za RhD imunoprofilaksu [145-146].

I slabi D i parcijalni D fenotipovi mogu da izazovu stvaranje anti-D antitijela kod RhD-negativnih primalaca.

Test procedura- metoda u epruveti

Opšta pravila

- Za ispitivanje slabog D potreban je nekoagulisan uzorak krvi ispitanika ili uzorak krvi uzet sa EDTA kao antikoagulansom;
- Istovremeno raditi test sa RhD kontrolnim reagensom;
- Ne koristiti polispecifični AHG reagens ukoliko se ispituje koagulisani uzorak krvi, jer C3 komponenta na eritrocitima može dovesti do lažno pozitivnog rezultata testiranja [145];
- Ne čitati rezultat testa mikroskopski zbog mogućnosti pojave lažno pozitivnih rezultata;

- Uzorci krvi trudnica ili potencijalnih primalaca krvi koji reaguju slabo ($\leq 2+$) u direktnom testu sa anti-D serumom ne uzimaju se dalje za testiranje prisustva weak D antiga [146,148];
- Lažno pozitivne rezultate mogu da daju pozitivan DAT, kontaminirani uzorak krvi, reagens ili korištenje pogrešnog reagensa;
- Lažno negativne rezultate mogu da daju kontaminirani ili neaktivni reagens, propust u dodavanju reagensa ili uzorka krvi u test epruvetu, upotreba pogrešnog reagensa ili nepravilno pranje eritrocita prije dodavanja AHG reagensa (Tabela 8 i Tabela 9).

Tabela 8. Testiranje D antiga testom direktne aglutinacije sa anti-D test serumom

Jačina reakcije sa anti-D je...	Reakcija sa kontrolom je ...	Uzorak je od ...	RhD je ...
$\leq 2+$	negativna	bilo kog pacijenta	Pozitivan
$\leq 2+$	negativna	trudnice ili primaoca krvi	negativan
pozitivna	negativna	davaoca, odojčeta ili RhD-neg. žene	pozitivan
pozitivna ili negativna	pozitivna	bilo kog pacijenta	nije utvrđen

Tabela 9. Testiranje slabog D antigena

Reakcija sa anti-D je...	Reakcija sa kontrolom je ...	RhD je ...
pozitivna	negativna	pozitivan
pozitivna	pozitivna	ne može biti utvrđen, potrebna kisela elucija
negativna	negativna	negativan

Preporuke za interpretaciju direktnog i indirektnog testiranja sa anti-D reagensom prikazane su u Tabeli 10 [145].

Tabela 10. Preporuke za testiranje D antigena (direktna aglutinacija i testiranje Dw antigena).

Preuzeto i adaptirano iz: Judd J, Johnson S, Storry J. Judd's methods in immunohematology. 3rd ed. Bethesda, MD: AABB, 2008.

	Direktno testiranje			Testiranje za slabo D	
Rezultati sa anti-D	$\geq 2+$	$\leq 2+$	0	pozitivan*	negativan
Kandidat za transfuziju	D+(poz.)	D-(neg.)	D-(neg.)	nije indikovano	
Trudnica	D+(poz.)	D-(neg.)	D-(neg.)	nije indikovano	
Dijete RhD- negativne majke§	D+(neg.)	testirati na weak D		D+(poz.)	* D-(neg.)
Davalac krvi	D+(neg.)	testirati na weak D		D+(poz.)	D-(neg.)

*Ako je kontrolni test za autoaglutinaciju negativan

§Za određivanje potrebe za Rh imunoprofilaksu

4.4.6 Skrining antitijela

Antitijela stvorena protiv antigena eritrocita mogu izazvati direktnu aglutinaciju ili komplementom posredovanu lizu eritrocita, ili mogu obložiti eritrocite sa IgG i/ili C3 komponentom komplementa [149].

Direktna aglutinacija i/ili liza se može uočiti nakon centrifugiranja mješavine eritrocita i seruma. Antitijela koja oblažu eritrocite mogu se pojačati u nisko-jonskoj sredini dodavanjem pojačivača kakav je LISS (rastvor niske jonske jačine). Eritrociti inkubirani sa serumom/plazmom u prisustvu LISS na 37°C se ispiraju, kako bi se otklonili vezani globulini, a zatim se dodaje AHG reagens. Aglutinacija sa AHG pokazuje da su eritrociti obloženi globulinima. Važno je napomenuti da u slučaju izvođenja pretransfuzijskih i prenatalnih ispitivanja nije potrebno detektovati C3-vezujuća antitijela [145-149].

Test procedura- metoda u epruveti

Opšta pravila

- Za ispitivanje prisustva antitijela u serumu/plazmi ispitanika potreban je uzorak krvi uzet sa EDTA kao antikoagulansom;
- Testiranje se izvodi iz seruma ukoliko je potrebno otkriti antitijela koja se vezuju preko komponenti komplementa;
- Potrebne su dvije vrste test eritrocita ($R_1R_1\text{-CCDee}$ i $R_2R_2\text{-ccDEE}$) (1,2);
- Jedna vrsta test eritrocita mora imati fenotip Jk (a+b-);
- Test eritrociti ne treba da imaju jaku ekspresiju Bg antigaena [147];
- Ne čitati rezultat testa mikroskopski zbog mogućnosti pojave lažno pozitivnih rezultata;
- Lažno pozitivne rezultate mogu da daju povećana brzina i vrijeme centrifugiranja u toku izvođenja testa, mikroskopsko čitanje rezultata,

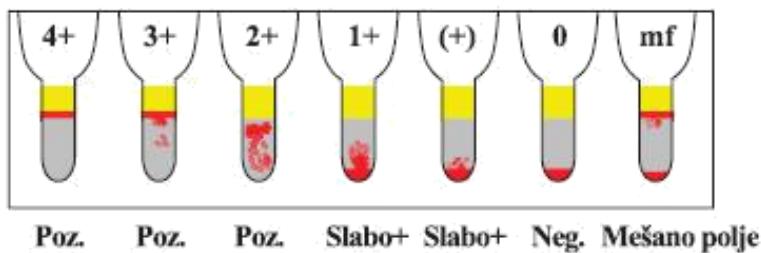
kontaminirani uzorak krvi ili reagens kojem je istekao rok, neadekvatan uzorak krvi ispitanika ili antitijela protiv sastojaka test reagensa;

- Lažno negativne rezultate mogu da daju neadekvatno pranje eritrocita, prekinuto testiranje, upotreba pogrešnog reagensa, upotreba AHG koji je izgubio svoju aktivnost, ukoliko se ne doda AHG, loše pripremljena ćelijska suspenzija, propust u dodavanju test eritrocita ili seruma/plazme ispitanika.

Test procedura- metoda u gelu

Opšta pravila

- Za ispitivanje specifičnosti antitijela u serumu/plazmi ispitanika potreban je uzorak krvi uzet sa EDTA kao antikoagulansom;
- Gel u cjevčicama ID-kartica je porozan i sadrži u sebi pufer, kao što su LISS ili PBS [149-150];
- Gel ima spektar frakcionisanja molekulske težine 4.000 do 150.000, što omogućava slobodan prolaz pojedinačnih eritrocita, ali ne i eritrocitnih aglutinata [149-150];
- Lažno pozitivne reakcije mogu da daju ID-kartice čiji je rok važnosti istekao ili su oštećene (prethodno otvorene), fibrin u testiranoj plazmi i loše pripremljeni reagensi;
- Lažno negativne reakcije mogu da daju oštećene ID-kartice, neadekvatna količina reagenasa i neadekvatno odlivanje supernatanta (Slika 17). Pozitivan nalaz je crvena linija na površini gela, a negativan kada je eritrocitno dugme na dnu mikropruvete. Moguće je čitanje gradacije aglutinacije (od 4+ do ±), a potpuno je vidljivo i miješano polje.



Slika 17. Očitavanje jačine reakcije aglutinacije metodom u gelu.
mf- miješano polje. Izvor: www.diahem.com

4.4.7 Identifikacija antitijela

Identifikacija antitijela se izvodi ukoliko je skrining antitijela pozitivan i ima za cilj da odredi specifičnost prisutnog antitijela u ispitivanoj plazmi/serumu.

Procedura rada treba da bude u skladu sa procedurom koja se primjenjuje redovno za prepostavljenu specifičnost antitijela. Na primjer, ukoliko se prepostavlja prisustvo anti-M antitijela mora se dokazati direktna aglutinacija sa M+ eritrocitima, kao i indirektna AHG aglutinacija sa M+ (M+N-) eritrocitima [146-149].

Interpretacija rezultata identifikacije antitijela zahtijeva sveobuhvatno znanje seroloških osobina svakog antitijela, što podrazumijeva:

- temperaturu na kojoj je antitijelo reaktivno,
- reaktivnost antitijela u različitim metodama identifikacije – npr. PEG,
- očekivano ponašanje određenih antitijela sa eritrocitima koji su enzimski tretirani,
- sposobnost određenog antitijela da vezuje komplement ili izaziva hemolizu,
- sklonost određenih antitijela da pokazuju efekat doze, npr. da reaguju jače sa homozigotnim eritrocitima (dupla doza) nego sa heterozigotima (jedna doza) [145,151].

Test procedura - metoda u epruveti

Opšta pravila

- Za ispitivanje specifičnosti antitijela u serumu/plazmi ispitanika potreban je uzorak krvi sa EDTA kao antikoagulansom.
- Rezultati ispitivanja moraju biti međusobno usklađeni, npr. ukoliko se pretpostavlja prisustvo anti-K antitijela, neophodno je da jedino K+ eritrociti u testovima identifikacije budu reaktivni [146-149].
- Uz identifikaciju antitijela obavezno je uraditi i autokontrolu [145].
- Postupak rada uskladiti sa standardnim operativnim procedurama (SOP) za laboratoriju u kojoj se radi identifikacija antitijela.
- Lažno pozitivne rezultate mogu da daju antitijela na sastojke reagenasa, kontaminirani uzorak ili reagensi iz panela, nepropisno čuvani reagensi, nepropisno pripremljeni reagensi, mikroskopsko očitavanje aglutinacije, velika brzina centrifugiranja test epruveta, korištenje pogrešnog reagensa ili uzorka krvi ispitanika.
- Lažno negativne rezultate mogu da daju kontaminirani reagensi ili regaensi koji su istekli iz roka važnosti, kontaminirani uzorak krvi ispitanika, greška u dodavanju AHG u test epruvete, neadekvatno pranje eritrocita, prekinuto testiranje, upotreba neaktivnog AHG reagensa, greška u dodavanju test eritrocita ili seruma/plazme ispitanika, loše pripremljena ćelijska suspenzija, mala brzina ili kratko centrifugiranje, upotreba pogrešnog reagensa i pogrešnog uzorka krvi pacijenta.

Test procedura - metoda u gelu

Opšta pravila

- Za ispitivanje specifičnosti antitijela u serumu/plazmi ispitanika potreban je uzorak krvi sa EDTA kao antikoagulansom;
- Lažno pozitivne reakcije mogu da daju ID-kartice kojima je istekao rok važnosti ili koje su oštećene (pokazuju znake sušenja, imaju mjehuriće,

kapljice gela ili supernatanta u gornjim dijelovima mikrocjevčica ili na donjoj strani pokrovne folije, imaju oštećenu foliju), fibrin u testiranoj plazmi i loše pripremljeni reagensi [147,151];

- Lažno negativne reakcije mogu da daju oštećene ID-kartice, neadekvatna količina reagenasa i neadekvatno odljevanje supernatanta;
- Pozitivna reakcija sa svim eritrocitima iz test panela i negativna autokontrola mogu biti posljedica nespecifične reakcije ili ukazuju na prisustvo aloantitijela protiv visoko frekventnog antigaena;
- Pozitivna reakcija sa svim test eritrocitima iz test panela i pozitivna autokontrola mogu biti posljedica nespecifičnih reakacija [145,146];
- Pozitivna reakcija sa svim test eritrocitima iz test panela uz pozitivnu autokontrolu, ali kad je reakcija sa jednim ili više test eritrocita jače pozitivna od autokontrole ukazuje na prisustvo i aloantitijela, pa je neophodno izvršiti dalja ispitivanja [151].

4.4.8 Kombinovana procedura adsorpcije i elucije

Ova metoda se primjenjuje u slučajevima kada svim ostalim testiranjima ne može da se utvrdi specifičnost antitijela, naročito u sljedećim stanjima:

- prisustvo slabo izraženih antigena na eritrocitima ili slabo reaktivnih antitijela u serumu/plazmi,
- identifikacija specifičnosti antitijela, posebno kod postojanja multipnih antitijela u ispitivanom uzorku,
- koncentracija i prečiščavanje antitijela, npr. adsorpcija antitijela u serumu grupe O protiv antiga visoke učestalosti eritrocita grupe O, sa pripremom eluata koji može da se koristi za tipizaciju eritrocita svih ABO grupa [152].

Adsorpcija antitijela se najbolje postiže primjenom male razlike odnosa serum/eritrociti (npr. 2:1 ili manje), dok će eluati sadržati više antitijela kada se koristi velika razlika odnosa serum/eritrociti (npr. 5:1, ili više). Prethodno tretiranje eritrocita proteolitičkim enzimima može da ubrza proces adsorpcije [145,153].

U cilju identifikacije antitijela, koristi se velika zapremina seruma koja oblaže manju količinu eritrocita-idealno 5:1 odnos i koriste se slabo reaktivni eritrociti. Vezano antitijelo se eluira, a zatim se testira eluat i utvrđuje reaktivnost antitijela. U nekim slučajevima se serum dalje adsorbuje, koristeći malu razliku odnosa serum/eritrociti (2:1) i testira paralelno sa eluatom i neadsorbovanim serumom [145,154-155].

Test procedura

Opšta pravila

- Za izvođenje adsorpcije i elucije potrebno je 4-10 ml seruma/plazme za adsorpciju i 4-10 ml eritrocita za adsorpciju;
- Kao opšte pravilo, treba izabrati slabo reaktivni uzorak, jer se može pretpostaviti da će nositi samo jednu od krvnogrupnih determinanti protiv koje je stvoreno antitijelo u serumu [145];
- Pravilan odabir eritrocita za adsorpciju ima ključnu ulogu za uspjeh ove procedure, pa je važno poznavanje fenotipa ispitanika [147];
- Da bi se izbjegla dilucija seruma tokom adsorpcije, koja može da dovede do značajnog gubitka aktivnosti slabo reaktivnih aloantitijela, važno je otkloniti što više rezidualnog fiziološkog rastvora;
- Lažno pozitivne ili negativne rezultate mogu da daju nepropisno skladišteni reagensi, pogrešna tehnika testiranja ili upotreba pogrešnih reagenasa.

4.4.9 Potvrđni test za negativne i/ili slabo pozitivne reakcije sa anti-D metodom u gelu

ID-DiaClon Anti-D test reagens metodom u gelu, urađen manuelno ili automatski se upotrebljava za potvrdu RhD negativnih rezultata i dodatnu karakterizaciju D varijanti (slabi D ili parcijalni D) [156-158].

Porast upotrebe monoklonskih anti-D koji potiču od različitih ćelijskih linija dovodi do problema u interpretaciji nalaza prilikom određivanja antiga D, naročito u razlikovanju slabo izraženog od parcijalnog antiga D (D varijante). Metodom u gelu, pozitivan nalaz jačine od 3+ do 4+ ukazuje na prisustvo antiga D, a reakcije slabije jačine ukazuju na slabo D (D weak). Ove slabo pozitivne reakcije mogu se razlikovati u zavisnosti od korištene monoklonske ćelijske linije. Eritrociti koji daju negativan nalaz u direktnom testiranju, a pozitivan u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT) se smatraju slabim D (D weak) ili parcijalnim D (D varijanta). Dopunska potvrda može, takođe, da se uradi i u ID-sistemu, pomoću monoklonskih anti-D test seruma koji su tako pripremljeni da otkriju slabo izražene antige D i antigen DVI, na ID-karticama "Coombs Anti-IgG" ili na ID-karticama "LISS/Coombs" (Tabela 11 i Tabela 12) [156].

Reagensi

"ID-DiaClon Anti-D" za potvrdu slabo izraženog antiga D weak indirektnim antiglobulinskim testom (IAT), sadrži monoklonski anti-D IgG (ćelijska linija ESD1), kao reagens za neposrednu upotrebu, u boćicama od 5 ml.

Dodatni potrebni reagensi

- a) ID-kartice "Coombs Anti-IgG" sa 6 mikrocjevčica koje sadrže anti-IgG (zečiji) u matriksu gela. Konzervans: < 0,1% NaN₃;
- b) ID-kartice "LISS/Coombs" sa 6 mikrocjevčica koje sadrže polispecifični AHG (zečiji anti-IgG i monoklonski anti-C3d, ćelijska linija C139-9) u matriksu gela. Konzervans: < 0,1% NaN₃;
- c) ID-Diluent 2: modifikovani LISS za suspenziju eritrocita.

Potrebna oprema:

a) ID-dispenzor; b) ID-pipeta; c) ID-nastavci za pipete; d) ID-radni stalak; e) Epruvete za suspenziju; f) ID-inkubator 37⁰C; g) ID-centrifuga 6, 12 ili 24.

Uzorak krvi

Za dobijanje optimalnih rezultata, prilikom testiranja koristiti svježe izvađen uzorak krvi ili u skladu s lokalnim propisima o kriterijumima za prihvatanje uzorka. Poželjno je uzorak krvi uzeti na citratu, EDTA ili CPD-A antikoagulansu. Mogu se koristiti i uzorci krvi uzeti u epruvete bez antikoagulansa.

Interpretacija rezultata

Pozitivan nalaz: aglutinisani eritrociti formiraju crvenu liniju na površini gela ili su aglutinati raspršeni u gelu.

Negativan nalaz: kompaktni eritrocitni sloj na dnu cjevčice.

U Tabeli 11 je prikazana jačina reakcije aglutinacije za RhD antigen pri korištenju gel metode.

Tabela 11. Reakcija za RhD antigen pri korištenju kartice »ID-DiaClon Anti-D«

RhD-pozytivan	Rh weak D/RhDVI*	RhD-negativan
4+	1+ do 3+	-(neg.)

*Za sigurnu interpretaciju slabog-weak ili parcijal-D, preporučuje se dalje ispitivanje uzorka uz pomoć ID Partial-RhD Typing Set ili Prošireni set za ispitivanje parcijalnog D antiga.

U Tabeli 12 je prikazana razlika u jačini reakcije aglutinacije za RhD antigen – za RhD-pozytivan i slabi (weak) D fenotip.

Tabela 12. Razlikovanje RhD-pozitivanog i slabog (weak) D fenotipa

Razlikovanje RhD-pozitivanog i slabog (weak) D fenotipa	Nalaz	Nalaz
Direktni test sa anti-D serumom na ID kartici	3+ do 4+	2+ do -(neg.)
Test sa »ID-DiaClon Anti-D« i ID karticom »Coombs Anti-IgG« ili sa ID-karticom »LISS/Coombs«	4+	3+ do 1+
Rezultati	RhD+ (poz).	slabi (weak) D/DVI

Napomene

Ovaj anti-D reagens je izabran da reaguje sa DVI fenotipom.

Ograničenja

- a) ID kartice koje imaju vazdušne mjehuriće ili gel kapljice u gornjim dijelovima mikrocjevčica i/ili na pokrovu, moraju se centrifugirati prije upotrebe.
- b) Bakterijska ili druga kontaminacija korištenih materijala mogu prouzrokovati lažno pozitivne ili lažno negativne rezultate.
- c) Ostaci fibrina u serumu ili napakovani agregati mogu da zarobe neaglutinisane eritrocite dajući finu ružičastu liniju na površini gela dok je većina eritrocita poslije centrifugiranja vidljiva na dnu cjevčice.
- d) Neophodno je strogo pridržavanje uputstava za rad i upotrebu preporučene opreme. Oprema treba da bude redovno provjeravana prema GLP proceduri.
- e) Upotreba drugih rastvora umjesto Diluensa 2 za suspenziju eritrocita može da izmjeni nalaz.
- f) Previše jaka ili previše slaba suspenzija eritrocita može prouzrokovati netačne rezultate.

Karakteristike testa

Karakteristike testa ID-DiaClon Anti-D su interno evaluirane sa panelima eritrocita koji su imali ekspresiju različitih varijanti antiga D. Ovaj reagens je bio u stanju da odredi slabe D tipove 1, 2, 3, 4.0, 4.1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 17.

Za célijsku liniju uključenu u ID-DiaClon anti-D je takođe poznato da otkriva i sljedeće varijante; DII/DNU, DIII, DV (samo je DVa procjenjivana), DCS, DVI, DVII, DOL, DFR, DAR i DAR-E, DKH/DAU-4, ali ne sljedeće varijante DIV, DBT, i DHAR [156-157].

4.4.10 Monoklonski test reagensi za određivanje ABO/RhD krvne grupe na mikropločama

Reagensi

Upotrebljavaju se standardizovani reagensi spremni za upotrebu, u boćicama od 100 ml, za direktnu primjenu na mikropločama:

- a) DiaClon-MP anti-A (célijska linija BIRMA-1), DiaClon-MP anti-B (célijska linija LM306/686 (LB-2)), DiaClon-MP anti-AB (célijska linija ES131 (ES-15), ES-4), DiaClon-MP anti-DVI-/IgM (célijska linija TH-28), DiaClon-MP anti-DVI+/ IgM/IgG (célijska linija MS-201/MS-26), DiaClon-MP negativna kontrola (pufer bez antitijela);
- b) ID-Diluens 1: Modifikovani rastvor bromelina za suspenziju eritrocita. Metoda i reagensi su proizvođača BioRad.

Ostali potreban materijal:

Koriste se: a) DiaMed-MP mikroploče sa pokrovnom folijom; b) Multikanalna pipeta; c) ID-pipeta; d) ID-nastavci za pipetu; e) Epruvete za suspenzije; f) Postolje za reagense; g) DiaCent-MP 2 centrifuga za mikroploče; h) ID-dispenzor za ID-Diluens 1.

Uzorak krvi

Za dobijanje optimalnih rezultata, određivanje treba izvoditi koristeći svježe izvađen uzorak krvi, ili u skladu s lokalnim propisima o kriterijumima za prihvatanje uzorka. Poželjno je da se uzorak krvi uzme na citratu, EDTA ili CPD-A antikoagulansu. Mogu se koristiti i uzorci uzeti u obične epruvete (bez antikoagulansa).

Kada je potrebno koristiti serum umjesto plazme, serum se mora dobro izbistriti centrifugiranjem na 1500g 10 min, prije upotrebe, kako bi se uklonili ostaci fibrina koji mogu da utiču na izgled reakcije.

Interpretacija rezultata

Aglutinacija ukazuje na reakciju između antiga i antitijela. Jako pozitivan nalaz: kompletna aglutinacija, ili 2-3 aglutinata skupljena na dnu niše. Slabo pozitivan nalaz: prisustvo malih aglutinata na dnu niše, često s mnoštvom slobodnih eritrocita u suspenziji. Negativan nalaz: nema vidljive aglutinacije, ukazuje na odsustvo reakcije između antiga i antitijela. Rezultati su validni samo ako negativna kontrola pokazuje negativnu reakciju) [159].

U Tabeli 13 je prikazana jačina reakcije aglutinacije za određivanje ABO krvnih grupa pri korištenju monoklonskih test reagenasa na mikrotitarpločama.

Tabela 13. Reakcija za ABO krvnu grupu

Test serum			Krvna grupa
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	
1+ do 2+	negativan	1+ do 2+	A*
negativan	1+ do 2+	1+ do 2+	B
+ do 2+	1+ do 2+	1+ do 2+	AB
negativan	negativan	negativan	O

*Određivanje A podgrupa zahtijeva dalje ispitivanje. **Ax eritrociti mogu dati negativnu reakciju sa Anti-A**

U Tabeli 14 je prikazana jačina reakcije aglutinacije za određivanje RhD antiga pri korištenju monoklonskih test reagenasa na mikrotitarpločama.

Tabela 14. Reakcije za RhD

RhD-pozitivan	jako pozitivan
Slabi (weak) RhD	negativan do slabo pozitivan
RhD-negativan	Negativan

Važno: DVI+ eritrociti daju slabu do pozitivnu reakciju sa anti-D IgM/ IgG (ćelijske linije MS-201 / MS-26) i negativnu sa anti-D IgM (ćelijska linija TH-28). Slabi D (D weak) i DVI mogu da daju negativnu reakciju u metodi sa mikropločom. Ako je potrebno otkriti sve slabe D tipove, verifikovati sve negativne rezultate drugim procedurama (ID-Card ili pomoću Indirektnog antiglobulin testa) [159].

4.4.11 Određivanje ABO/RhD krvnih grupa na mikropločama sa liofilizovanim monoklonskim antitijelima, spremnim za upotrebu

Reagensi:

Mikroploče sa liofilizovanim monoklonskim antitijelima i negativnom kontrolom, spremnim za upotrebu. Od reagenasa koriste se: a) anti-A, ćelijska linija BIRMA-1; b) anti-B, ćelijska linija LM306/686 (LB-2); c) anti-AB, ćelijska linija ES131 (ES-15)/ES-4; d) anti-D; e) ctl (pufer bez antitijela), a proizvođač je BioRad [160].

Potrebni dodatni reagensi:

a) Eritrociti za testiranje ABO antitijela: DiaCell-MP ABO A₁, A₂, B, O; DiaCell-MP ABO A₁, A₂, B DiaCell-MP ABO A₁, B, O; DiaCell-MP ABO A₁, B; b) ID-Diluens 1: Modifikovani rastvor bromelina za suspenziju eritrocita.

Ostali potreban materijal:

a) ID-dispenzor za Diluens; b) ID-pipeta; c) ID nastavci za pipetu; d) Epruvete za suspenzije; e) DiaCent-MP 2 centrifuga za mikroploče; f) Preporučuje se: MP-Reader (automatski čitač sa integrisanom tresilicom).

Uzorak krvi

Za dobijanje optimalnih rezultata, prilikom testiranja koristiti svježe izvađen uzorak krvi, ili u skladu s lokalnim propisima o kriterijumima za prihvatanje uzorka. Poželjno je da se uzorak krvi uzme na citratu, EDTA ili CPD-A antikoagulansu. Mogu se koristiti i uzorci uzeti u obične epruvete (bez antikoagulansa). Kada je potrebno koristiti serum umjesto plazme, serum se mora dobro izbistriti centrifugiranjem na 1500g 10 min, prije upotrebe, kako bi se uklonili ostaci fibrina koji mogu da utiču na izgled reakcije.

4.4.12 Određivanje fenotipova Rh i Kell na mikropločama sa antitijelima u suvom stanju, spremnim za upotrebu

Reagensi

Mikroploče sa antitijelima u suvom stanju i negativna kontrola, spremni za upotrebu. U upotrebi su sljedeći test reagensi: anti-C ćelijska linija MS-24; anti-c ćelijska linija MS-33; anti-E ćelijska linija MS-260; anti-e ćelijska linija MS-63, anti-K ćelijska linija MS-56; negativna kontrola, pufer bez antitijela.

Za 16 određivanja fenotipa u jednoj mikroploči (2 u jednom redu), jažice 1–6: C, c, E, e, K, ctl/7–12: C, c, E, e, K, ctl. Svaka mikroploča ima barkod (broj proizvoda / konfiguracije i uzastopni-redni broj) za identifikaciju.

Dodatni potrebni reagensi:

ID-Diluent 1: modifikovani rastvor bromelina za suspenziju eritrocita.

Dodatni potreban materijal:

- a) ID-Pipetor; b) DiaCent-MP 2 centrifuga za mikroploče; c) ID-nastavci (nastavci za pipetor); d) ID-dispenzor za ID-Diluent 1; e) epruvete za suspenzije.

Preporučuje se: "MP-Reader" (automatizovani čitač sa ugradenim agitatorom), proizvođača BioRad.

4.4.13 Test za kiselu eluciju antieritrocitnih antitijela

Cilj direktnog antiglobulinskog (Coombs) testa, DAT, je da se utvrди da li su eritrociti obloženi antitijelima. Ukoliko se nađe pozitivan DAT, treba uraditi sljedeća ispitivanja: a) odrediti klasu antitijela na eritrocitima (IgG, IgM, IgA), kao i komponente komplementa C3d i C3c; b) utvrditi specifičnost antitijela. Različite klase antitijela se otkrivaju procedurom DAT-a sa monospecifičnim AHG reagensima anti-IgG, -IgM, -IgA, -C3d i -C3c. Za identifikaciju, antitijela se odvajaju od eritrocita tehnikama elucije kao što je postupak elucije kiselinom koji se smatra najprikladnjijim metodom za eluciju toplih antitijela. DiaCidel sadrži

reagense koji su gotovi za primjenu što pojednostavljuje izvođenje radne procedure elucije antieritrocitnih antitijela koja su najčešće zastupljena.

Reagensi:

DiaCidel, rastvor za pranje (koncentrovan) koji sadrži pufer glicin-NaCl, u bočicama od 30 ml. Eluat ispitati uobičajenim testovima za dokazivanje prisustva antitijela i utvrđivanje njihove specifičnosti; kao negativnu kontrolu upotrijebiti supernatant koji je sačuvan nakon posljednjeg pranja.

Interpretacija rezultata

Ako je došlo do aglutinacije između test eritrocita i eluata, a nije došlo do aglutinacije u kontrolnoj epruveti, znači da su antitijela eluirana s površine eritrocita. Nastaviti sa uobičajenom procedurom za identifikaciju antitijela [162].

4.4.14 Imunohematološka ispitivanja u automatizovanom sistemu-osnovni principi

Automatizovani sistem Techno Twin Station (BioRad, Slika 18) koristi Maestro program kojim se upravlja sa BioRad-ovim aparatima za automatsko ukapavanje i čitačima, sa podacima o ispitanicima, testovima i radnim listama [163]. Isključivo je namijenjen za postupke u laboratorijskoj "in Vitro" dijagnostici (IVD) u kontrolisanoj sredini, bez prisutnosti ispitanika. Program i instrumente smiju koristiti samo specijalizovano obučeno osoblje. Program Maestro je napravljen da služi kao baza za rad.



Slika 18. Techno Twin Station, DiaMed (Cressier sur Morat)-potpuno automatizovani sistem za određivanje eritrocitnih antigena i antitijela. www.diahem.com

Techno je sistem za ukapavanje, centrifugiranje i čitanje ID-kartica i ukapavanje mikroploča. Priložen je poseban softver za obradu ID-Kartica na PC računaru. U svrhu automatizacije nekih sistemskih funkcija, Techno ima opcije za: a) centralni informacioni sistem (CIS), za automatsku obradu i prenos podataka; b) barkod čitač, u svrhu bržeg unosa podataka o ispitaniku; c) automatski sistem ukapavanja, u svrhu direktnog procesuiranja mikrocjevčica i podataka o ispitaniku.

Karakteristike aparata Techno Twin Station su: a) potpuna identifikacija sa bar kodovima; b) identifikacija uzoraka epruveta, ID-kartica, mikroploča, reagensa i test eritrocita; c) kontrola prisutnosti seruma ili plazme u mikrocjevčici nakon centrifugiranja; d) kontrola gela za vrijeme identifikacije (opcija); e) detektovanje nivoa tečnosti uz pomoć elektronskog detektora u epruvetama ispitanika, bočicama reagensa i bocama diluenata i uz pomoć plovka u kanisterima rastvora za pranje i otpada; f) detektor ugrušaka u eritrocitima ili serumu za vrijeme uzimanja eritrocita i seruma.

Potpuna identifikacija

Techno automatski detektuje sve resurse u instrumentu, pomoću očitanih bar kodova koje poredi sa potrebnim resursima za odabrani test. Instrument takođe provjerava broj lota i rok trajanja resursa.

Detektor nivoa tečnosti

Techno je konstruisan da stalno provjerava raspoloživost reagensa, diluenta, rastvora za pranje A i B, da bi izbjegao bilo kakvu grešku. Instrument takođe provjerava i obavještava kad je kanister za otpad pun. U svrhu izbjegavanja netačnog detektovanja nivoa, epruvete pacijenata (centrifugirane ili ne), epruvete sa serumom ispitanika, reagensi, test serumi i diluenti ne smiju imati pjenu ili balonчиće na površini.

Detektor ugruška

Radi sprečavanja oštećenja hidrauličnog kruga za vrijeme ukapavanja, Techno ima sposobnost detektovanja ugruška u eritrocitima ili serumu sa senzorom.

4.4.15 Određivanje jačine reakcije i interpretacija rezultata seroloških testiranja

Određivanje jačine reakcije i interpretacija rezultata (određivanje skora) seroloških reakcija treba da budu standardizovani između laboratorija i pojedinačnih izvršioca kako bi se obezbijedila uniformnost i reproducibilnost testiranja [145]. Pored toga, numeričke vrijednosti skora seroloških reakcija mogu poslužiti za kvantitativno određivanje ekspresije antiga seročita, dok s druge strane, zahtjevi da određene reakcije moraju biti određenog stepena odnosno jačine da bi se test interpretirao kao pozitivan (npr. rezultati testiranja sa anti-A, anti-B ili anti-D test serumom prilikom određivanje krvne grupe ABO Rh D) su dio preporuka kontrole kvaliteta [164-165].

Ovaj opis pokazuje načela interpretacije seroloških reakcija svih hemaglutinacionih testiranja koja se izvode u epruveti (Tabela 15).

Procedura:

Opšta pravila

- Za izvođenje seroloških hemaglutinacionih testova koriste se test epruvete veličine 10-12x75 mm;
- Prilikom interpretacije rezultata seroloških reakcija ne treba koristiti oznake +++, ++, + ili -, jer one mogu lako da se promijene;
- Ne očitavati rezultate testiranja mikroskopski zbog moguće pojave lažno pozitivnih rezultata;
- Lažno pozitivni rezultati testiranja nastaju kao posljedica velike brzine centrifugiranja;
- Lažno negativni rezultati testiranja nastaju kao posljedica suviše snažnog trešenja epruveta prilikom očitavanja rezultata.

Tabela 15. Određivanje jačine reakcije rezultata seroloških testiranja

Aglutinacija	Skor	Onda je prisutna...
4+	12	POTPUNA AGLUTINACIJA: nema neaglutinisanih eritrocita
3+ ^s	11	Reakcija između 3+ i 4+
3+	10	JAKA REAKCIJA: nekoliko odvojenih masa aglutinisanih eritrocita; nema neaglutinisanih eritrocita
2+ ^s	9	Reakcija između 2+ i 3+
2+	8	UMJERENA AGLUTINACIJA: veliki aglutinati između brojnih manjih aglutinata; nekoliko neaglutinisanih eritrocita
1+ ^s	6	Reakcija između 1+ i 2+
1+	5	SLABA REAKCIJA MIJEŠANO POLJE: mnogo aglutinata od najviše 20 eritrocita sa nekoliko manjih aglutinata i neaglutinisanim eritrocitima
1+ ^w	4	Reakcija između ± i 1+
±	3	GRANULARNA REAKCIJA: mali aglutinati sa mnogo neaglutinisanih eritrocita
W	2	REKACIJA U TRAGOVIMA: mali aglutinati (3-4 eritrocita) sa mnogo neaglutinisanih eritrocita
0 ^r		GRUBA REAKCIJA: eritrocitno dugme se ne odvaja glatko; ivica dugmeta izgleda grubo
0	0	NEMA REAKCIJE
mf ^s		JAKA REAKCIJA MIJEŠANO POLJE: veliki aglutinati sa malim brojem neaglutinisanih eritrocita
mf		MIJEŠANO POLJE: aglutinati srednje veličine zajedno sa neaglutinisanim eritrocitima
mf ^w		SLABA REAKCIJA MIJEŠANO POLJE: nekoliko pramenova aglutinisanih eritrocita, ali najviše neaglutinisanih eritrocita
h ^s		JAKA HEMOLIZA: malo ili uopšte nema intaktnih eritrocita
h		UMJERENA HEMOLIZA: prisutno nekoliko intaktnih eritrocita
h ^w		HEMOLIZA U TRAGOVIMA: prisutno više intaktnih eritrocita

3+^s-jaka reakcija između 3+ i 4+ (s-eng. strong); 2+^s- jaka reakcija između 2+ i 3+; 1+^s-reakcija između 1+ i 2+; 1+^w-reakcija između ± i 1+ (eng. weak-slabo); mf^s- mixed field- miješano polje-reakcija mešanog polja sa velikim aglutinatima (eng. strong-jako); mf^w- slaba reakcija miješanog polja (eng. weak-slabo).

4.5 Molekularna tipizacija RHD i RHCE antiga korištena u ovoj studiji

Za molekularnu tipizaciju u ovom istraživanju korišteni su komercijalni kitovi bazirani na Fluogene metodi, odnosno tehnički lančane reakcije polimeraze uz sekvencionalno specifične prajmere, PCR-SSP (engl. PCR: *polymerase chain reaction*, SSP: *sequence specific primers*) s detekcijom fluorescencije (RBC-Fluogene D Screen, RBC-Fluogene CDE i RBC-Fluogene D weak/variant kitovi proizvođača *Inno-train Diagnostik, Kronberg, Njemačka*) [166]. Rezultati dobijeni Fluogene metodom provjereni su i potvrđeni u Zavodu za transfuzijsko medicino Republike Slovenije, standardnom PCR-SSP metodom s detekcijom elektroforezom amplikona u gelu agaroze (RBC-Ready Gene CDE i RBC-Ready Gene weak D kitovi proizvođača *Inno-train Diagnostik, Kronberg, Njemačka*).

PCR SSP je varijanta PCR metode koja može razlikovati pojedine polimorfizme, koji se međusobno razlikuju samo u jednoj bazi, SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) budući da su samo sekvence prajmera odgovorne alele koji se testom određuju [167]. Kod Fluogene metode, kao i kod standardne PCR-SSP metode korištene u ovom istraživanju paralelno se izvodi više multiplex PCR reakcija.

PCR uzorci u kojima se prajmer veže za svoju specifičnu ciljnu sekvencu stvaraju specifični amplikon nakon PCR-a, dok uzorci bez sekvence komplementarne prajmerima ne stvaraju amplikon. U svaku PCR reakciju dodati su i prajmeri za amplifikaciju interne kontrole (genska sekvencia ljudskog hormona rasta, HGH – engl. *human growth hormone*). Interna kontrola ima za cilj generisanje amplikona kad nema specifičnog amplikona za one alele koje određujemo u pojedinoj jažici. Detekcija PCR produkata Fluogene metodom odvija se putem mjerjenja signala fluorescencije, što je novija varijanta u odnosu na standardnu detekciju elektroforezom u gelu agaroze kod uobičajenih PCR sistema [168].

4.5.1 Detekcija signala kod uobičajenih PCR-SSP sistema

Kod uobičajenih PCR-SSP sistema i kod Fluogene metode priprema PCR reakcije je potpuno identična. Razlika je u detekciji amplikona nastalih PCR reakcijom. U standardnoj PCR SSP metodi detekcija amplikona izvodi se elektroforezom nastalih amplikona u gelu agaroze [169]. Nastali amplikoni su DNA sekvence, dakle električki negativno nabijene,

određenih dužina baznih parova (bp – engl. *base pairs*) koji u električnom polju putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi (anodi).

Agaroza je linearni polimer, najčešće ekstrahovan iz crvenih algi, polisaharid, koji se sastoji od ponavljačih disaharidnih podjedinica agarobioze (a koju čine D-galaktoza i 3,6-anhidro-L-galaktopiranosa). Lanci agaroze stvaraju heliksna vlakna koji se sklapaju u nadzavijene (engl. *supercoiled*) strukture radijusa 20-30 nm [170]. U čvrstom stanju ta vlakna stvaraju trodimenzionalnu mješavinu kanala (šupljina) dijametara 50 nm do >200 nm u zavisnosti od koncentracije agaroze korištene za pripremu gela. Što je veća koncentracija agaroze, dijametri šupljina su u prosjeku manji. Trodimenzionalna struktura agaroze stabilizuje se vodoničnim vezama, tako da se običnim zagrijavanjem može poništiti i vratiti u tekuće stanje.

U uobičajenom 2% gelu agaroze različite veličine DNK mogu se razdvojiti tako što će kraći fragmenti putovati brže, a duži fragmenti kraće kroz šupljine polimera [170].

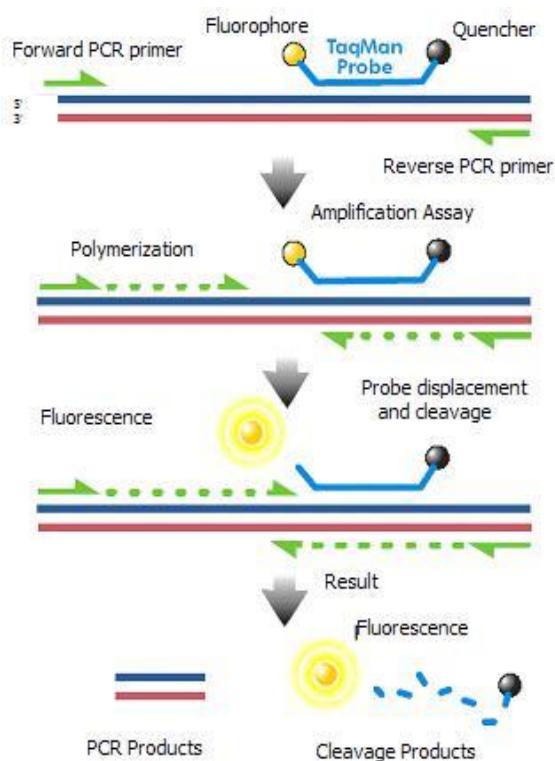
Fragmenti se mogu učiniti vidljivim bojenjem gela određenom bojom koja fluoresceira u UV području elektromagnetskog spektra (etidijum bromid, GelRed, itd.). Nakon bojenja gela, u jažicama u kojima je došlo do specifične reakcije, pojavljuje se slika amplikona što predstavlja pozitivnost reakcije. U jažicama u kojima specifične reakcije nema, vidljiva je samo reakcija interne kontrole. Interna kontrola se od svih specifičnih reakcija razlikuje po veličini fragmenta, tako da je moguće na gelu agaroze napraviti potpunu distinkciju signala [171].

4.5.2 Detekcija signala Fluogene metodom

Kod Fluogene metode svaka PCR reakcija sadrži 2 ili 3 fluorokroma vezana za oligonukleotidne sonde. Fluorokromi se međusobno mogu razlikovati prema emisijskom spektru fluorescencije. Te sonde su proizvod posebno modifikovanog Taqman® sistema. Barem jedna sonda je specifična za ciljnu sekvencu (koja je različita od sekvenci specifičnih prajmera) i jedna sonda je specifična za internu kontrolnu sekvencu HGH. Prije i poslije PCR reakcije izvodi se mjerjenje emisije fluorescencije fluorokroma u posebnom analizatoru FluoVista (proizvođača *Inno-train Diagnostik, Kronberg, Njemačka*). Porast fluorescencije

(razike između post- i pre-PCR očitanja) iznad graničnih vrijednosti koje određuje proizvođač, pokazuje pozitivne reakcije amplifikacije (Slika 19) [172].

Taqman sonde su hidrolitičke sonde koje su originalno dizajnirane da povećaju specifičnost kvantitativnog PCR-a (qPCR, od engl. *quantitative PCR*) odnosno PCR-a u realnom vremenu (engl. *real-time PCR*). Metod je prvo objavljen 1991. godine od strane istraživača u Cetus Corporation, SAD [173]. Princip Taqman sondi oslanja se na $5' \rightarrow 3'$ eksonukleaznu aktivnost Taq-polimeraze kako bi izrezala dvostruko obilježenu sondu tokom hibridizacije na komplementarnu ciljnu sekvencu, kao i na detekciju signala fluorescencije iz fluorofora. Nastali signal fluorescencije omogućuje kvantitativno mjerjenje nakupljanja PCR produkta i povećava specifičnost PCR reakcije. U Fluogene metodi ovo mjerjenje fluorescencije vrši se prije i nakon PCR reakcije, za razliku od qPCR metoda, gdje se ovo mjerjenje izvodi tokom same PCR reakcije (u realnom vremenu) [172].



Slika 19. Kod Fluogene metode svaka PCR reakcija sadrži 2 ili 3 fluorokroma vezana za oligonukleotidne sonde. Fluorokromi se međusobno mogu razlikovati prema emisijskom spektru fluorescencije. Te sonde su posebno modifikovanog Taqman® sistema. Barem jedna sonda je specifična za ciljnu sekvencu (koja je različita od sekvenci specifičnih prajmera) i jedna sonda je specifična za internu kontrolnu sekvencu HGH.

4.5.3 RBC-Fluogene test sistemi

Prealikvotirane i osušene različite mješavine oligonukleotida u PCR pločama omogućuju amplifikaciju sekvenci različitih varijanti. Svaka od tih oligonukleotidnih mješavina sadrži prajmere za PCR te sonde obilježene različitim fluorescirajućim bojama: a) sonda specifična za određenu varijantu (alel) koja se određuje (fluorokrom 1); b) sonda specifična za HGH, interna kontrola (fluorokrom 2); c) dodatna sonda specifična za određenu varijantu (alel) koja se određuje (fluorokrom 3) u pojedinim reakcijama.

Jedna jažica na PCR ploči, označena crnom linijom, sadrži negativnu kontrolu, odnosno kontrolu kontaminacije, samo sa HGH specifičnom mješavinom oligonukleotida.

Svaki test sistem sadrži različit broj jažica na test ploči potreban za izvođenje tipizacije jednog DNK uzorka. Tako RBC-Fluogene D Screen kit sadrži samo jednu jažicu (nema posebne negativne kontrole), RBC-Fluogene CDE kit 24 jažice (23+1 negativna kontrola), dok RBC-Fluogene D weak/variant kit sadrži 16 jažica (15+1 negativna kontrola) za tipizaciju jednog uzorka DNK [168].

Generalno su za PCR reakciju potrebni slobodni deoksiribonukleotid-trifosfati (dNTPs), PCR pufer s Mg^{2+} ionima te *Taq* polimeraza [174]. Svi ti reagensi kod Fluogene metode već su prealikvotirani, spremni za korištenje i izmješani u tzv. FluoMix bočicu. U svakom kitu dolazi onoliki broj FluoMix bočica koliko se uzoraka može istestirati pojedinim kitom, što doprinosi jednostavnosti izvođenja testa i smanjivanju ljudskih grešaka kod pipetiranja [168].

Svi RBC-Fluogene test sistemi imaju isti princip pripreme PCR ploče. Nakon otapanja PCR ploča, FluoMix bočica i DNK uzoraka, FluoMix se snažno vorteksira 30 sekundi i ispipetira 7,5 μ l u negativnu kontrolnu jažicu kao kontrola kontaminacije uz 7,5 μ l destilovane vode. Zatim se dodaje DNK razrijeđena na 1 ng/ μ l u ostatak FluoMixa, volumena koji zavisi o testu koji se izvodi. Nakon ponovnog snažnog vorteksiranja 30 sekundi, 15 μ l alikvota se ispipetira u ostale jažice na PCR ploči (čiji broj zavisi od testa koji se koristi). Ploča se prekrije posebnom prozirnom optičkom folijom, kako bi se spriječila evaporacija uzorka tokom PCR reakcije, a istovremeno preko nje omogućilo i očitavanje fluorescencije.

U roku od 15 minuta od pripreme PCR ploče, potrebno je uraditi pre-PCR očitanje fluorescencije u FluoVista analizatoru. U roku od 15 minuta od očitavanja pre-PCR fluorescencije potrebno je prebaciti PCR ploču u PCR aparat (engl. *thermocycler*, u našem

istraživanju korišten je aparat Eppendorf Mastercycler, proizvođača *Eppendorf, Njemačka*) s određenim PCR protokolom koji je jednak za sve Fluogene testove: 1x95°C, 2 min; 40x95°C, 15 sek.; 60°C, 1 min; 1x20°C, 3 min.; 20°C, maksimalno 15 min.

Nakon završetka PCR protokola, u principu za 80 minuta, u roku od 15 minuta potrebno je uraditi post-PCR očitanje fluorescencije u FluoVista analizatoru.

Nakon završnog mjerena fluorescencije, Fluogene software automatski očitava datoteke i odmah prikazuje rezultate molekularne tipizacije [168].

4.5.4 RBC-FluoGene D-Screen

Ovaj kit omogućuje detekciju eksona gena *RHD* i to eksona 3, 5 i 10 u jednoj reakciji. Pritom je ekson 10 označen fluorokromom 1, a eksoni 3 i 5 su oba označena fluorokromom 2 (zajednička detekcija). Interna kontrola, HGH označena je fluorokromom 3 (Tabela 16). Ovaj test je pogodan za molekularnu potvrdu serološki negativnih uzoraka. Pozitivne reakcije na screening testu se kasnije dalje istražuju [168].

Tabela 16. Prilagođeno prema tabeli uz RBC-Fluogene D-Screen kit, proizvođača *Inno-train Diagnostik, Njemačka*.

SNPs i nomenklatura prema tabeli alela krvnih grupa Međunarodnog udruženja za transfuziju krvi, ISBT "Names for RHD (ISBT 004) negative null blood group alleles v3.1 170309" i "004 RHCE alleles v3.0 20160728" (<http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>).

pozicija jažice u ploči	naziv	specifičn ost	SNP	intron/ ekson	aminokise lina	ISBT fenotip	ISBT naziv alela	RBC marker (boja)	IC marker (boja)
B1, B2, B3, B4, B5, B6, F1, F2, F3, F4, F5, F6	D-Screen- D-E10	RHD Exon 10	+105A	3'-UTR	-	RH:1(D) ili RHD negativan	RHD*01 ili RHD*01 N.01	1	3
	D-Screen- D-E3/5	RHD Exon 3 RHD Exon 5	455A 676G 787G	3 5	Ile172 Ala226 Gly263			2	

4.5.5 RBC-FluoGene CDE

Ovaj kit omogućuje detekciju pojedinačnih 9 eksona *RHD* gena (svi eksoni osim eksona 8) kao i CcEe antigenske determinante u *RHCE* genu. Takva konfiguracija omogućuje jednostavnu detekciju „normalnog“ D (svih 10 eksona *RHD* gena pozitivno) kao i njegovo razlikovanje od različitih i mnogobrojnih parcijalnih D tipova molekularnobiološkom detekcijom različitih eksona *RHD* gena. Kod *RHD* negativnih uzoraka (dd fenotip) sve reakcije eksona će biti negativne. Može se odrediti i Dpsi varijanta.

Kod *RHCE* gena, osim CcEe antigenskih determinanti, određuje se i prisutnost Cw, kao i hibridi *RHD* gena sa *RHCE* genom.

Potrebno je napomenuti, da, s obzirom na učestalo otkrivanje novih varijanti, ovaj kit ne može detektovati sve poznate varijante *RHD* i *RHCE* gena. Varijante s mutacijama u veznim mjestima za prajmere i/ili fluorescentne sonde ne mogu se detektovati i zbog toga pokazuju jednak uzorak pozitivnih reakcija kao D. Zbog svega toga, popis pojedinih mutacija (SNPs) koje se određuju u pojedinim jažicama ima veliku važnost za pravilno određivanje rezultata testa i predviđanje fenotipa (Prilog 3) [168].

4.5.6 RBC-FluoGene D weak/variant

Slabi D antigeni su aleli *RHD* gena koji se ne razlikuju u imunogenetskoj (ekstracelularnoj) proteinskoj strukturi od D antiga. Molekularne karakteristike slabih D tipova su različite tačkaste mutacije, koje proizvode varijantne aminokiselina u intracelularnim ili transmembranskim regijama pojedinog antiga.

Korištenjem ovog kita mogu se detektovati najčešći slabi D tipovi (1, 1.1, 2, 3, 4, 4.0, 4.1, 4.2 (DAR), 5, 11, 14, 15, 17). Barem 95% svih slabih D tipova mogu se klasificirati kao slabi D aleli tipovi 1 do 5. Nadalje, ovim kitom mogu se odrediti i tri najčešće DEL varijante DEL(M295I), DEL(K409K) i DEL(IVS3+1G>A) (Prilog 4) [168].

4.6 Algoritam određivanja varijanti antigena D primjenjen u Zavodu za transfuzijsku medicinu Republike Srpske u Banjoj Luci

Određivanje RhD antigena davaocima krvi u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci radilo se rutinski iz uzoraka krvi davalaca uzetih na antikoagulansu, na aparatu Techno Twin Station, metodom u mikropločama. Davaocima koji krv daju prvi put krvna grupa sistema ABO i RhD antigeni određivani su dva puta, sa dva različita lota anti-D test seruma proizvođača BioRad, kako je naznačeno u poglavlju Ispitanici, materijali i metodi. Davaoci krvi koji su metodom u mikropločama na aparatu Techno Twin Station određeni kao RhD-negativni, provjeravani su manuelnom metodom, uz korištenje test reagenasa anti-D proizvođača CE Immunodiagnostika, kao i panel monoklonskih anti-D test reagenasa za dokazivanje slabih i parcijalnih oblika antigena D (D-SCREEN), proizvođača Diagast. Svim RhD-negativnim davaocima i davaocima krvi sa varijantama antigena D određivan je Rh fenotip, metodom u mikropločama, na aparatu Techno Twin Station. RhD status davalaca krvi dodatno je potvrđivan testom za slabi D, uz pomoć monoklonskog anti-D test reagensa i ID kartica-anti-IgG i Liss/Coombs, metodom u gelu.

Ukoliko je jačina reakcije u mikroploči bila slaba (prema uputstvu proizvođača za interpretaciju nalaza metodom u mikropločama) ili negativna, u epruveti u direktnoj aglutinaciji $\leq 2+$, a u indirektnom antiglobulinskom testu $\leq 3+$, metodom u epruveti i metodom u gelu, rezultat je interpretiran kao varijanta antigena D, odnosno slabi (weak) RhD antigen.

Kod osamdeset pet serološki dokazanih slabih RhD antigena, kao i 92 RhD-negativna davaoca, C+/E+ rađena je molekularna tipizacija, prije svega kitom za molekularni skrining, a onda kitovima Dweak i CDE, metodom PCR-SSP, uz florometrijsko očitavanje na aparatu FluoVista, (prema opisanoj proceduri u poglavlju Ispitanici, materijali i metodi), radi potvrde nalaza dobijenih serološkim metodama.

5.0 Rezultati

5.1 Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka rađena je u statističkom paketu SPSS 22 za Windows. Primarno dobijeni podaci analizirani su deskriptivnim statističkim metodama. Od deskriptivnih statističkih metoda korištene su: mjere centralne tendencije, mjere varijabiliteta i pokazatelji strukture iskazani u procentima.

5.2 Socio-epidemiološke karakteristike ispitivane grupe sa slabije izraženim D (Dweak)

Broj stanovnika RS, u dobi od 18-65 godina iznosi 776680, od toga 388394 (50,0%) ženskog i 388286 (37,6%) muškog pola. Ukupan broj davalaca iznosio je 8592 u periodu ispitivanja od aprila od 2016. do marta 2017. godine, što je 1,1% u odnosu na broj stanovnika RS starosti 18-65 godina. Od toga je bilo 1713 (0,4%) ženskog i 6879 (1,8%) muškog pola. Ukupan broj ispitivanih davalaca krvi bio je 85 osoba sa serološki slabo izraženim RhD antigenom i 92 serološki RhD-negativna davaoca krvi, sa C/E antigenom u Rh fenotipu.

Učestalost slabijeg D (Dweak) antiga u odnosu na ukupan broj davalaca krvi iznosio je 85/8592 (0,99% ili 1,0%), dok je u odnosu na ukupan broj RhD-pozitivnih davalaca, kojima su obuhvaćeni i davaoci sa serološki slabije izraženim RhD antigenom, iznosila 85/7065 (1,20% ili 1,0%).

Učestalost molekularno dokazanog slabijeg D (Dweak) u odnosu na ukupan broj RhD-pozitivnih davalaca, kojim su obuhvaćeni i davaoci sa slabije izraženim D antigenom, prema polu iznosila je 32/1383 (2,31% ili 2,3%) kod davalaca ženskog pola i 53/5682 (0,93% ili 1,0%) kod davalaca muškog pola.

5.2.1 Karakteristike grupe ispitanika sa serološki i molekularno dokazanim varijantama RhD antiga

U istraživanju je učestvovalo 85 davalaca krvi, kojima je serološki dokazan RhD antigen, prema algoritmu opisanom u poglavlju Ispitanici, materijal i metode. Od toga je bilo

32 (37,6%) ženskog i 53 (62,4%) muškog pola. Krvna grupa A je zastupljena kod njih 39 (45,9%), B kod 14 (16,5%), AB kod 5 (5,9%) i O kod njih 27 (31,8%).

Medijana broja davanja krvi iznosila je 2 puta, znači oko 50% davalaca je dalo do 2 puta krv (Tabela 17).

Tabela 17. Socio-epidemiološke karakteristike grupe	
Posmatrana grupa (n=85)	
Pol (ženski /muški)	32/53
Krvna grupa A	39 (45,9%)
B	14 (16,5%)
AB	5 (5,9%)
O	27 (31,8%)
Krv dali med (min-max)	2 (1-26)

Serološki dokazan Rh fenotip je distribuiran na sljedeći način: a) CcDwee je dokazan kod 79 (92,9%) od ukupnog broja ispitanih davalaca krvi; b) CCDwee kod 2 (2,4%); c) ccDwEe kod 3 (3,5%); d) CCDNB ee kod 1 (1,2%) davaoca krvi (davalac čiji je tip parcijalni oblik D antiga nazvan DNB).

Slabi D tip 1 je određen kod 30 (35,3%) davalaca, tip 3 kod 50 (58,8%), tip DNB kod jednog davaoca (1,2%) i kod 4 (4,7%) davaoca su ostali oblici, koji se nisu mogli precizno definisati postojećim metodom.

D-SCREEN panelom je testirano 55 ispitanika, sa 9 različitih monoklonskih anti-D test reagenasa za dokazivanje slabih i parcijalnih oblika, proizvođača Diagast, a jačine reakcija aglutinacije eritrocita sa svim anti-D test reagensima prikazane su u Prilogu 5.

U Tabeli 18 vidi se broj ispitanih davalaca sa slabijim oblicima RhD antiga u odnosu na dobijene jačine reakcija aglutinacije sa pojedinačnim monoklonskim anti-D test reagensima iz panela D-SCREEN.

Tabela 18. Jačina reakcije ispitivanih eritrocita sa anti-D reagensima iz D-SCREEN panela					
	- (neg.)	1+	2+	3+	4+
1 IgM	13 (23.6%)	7 (12.7%)	19 (34.5%)	12 (21.8%)	4 (7.3%)
2 IgG	0 (0.0%)	2 (3.6%)	4 (7.3%)	44 (80.0%)	5 (9.1%)
3 IgM	3 (5.5%)	6 (10.9%)	14 (25.5%)	26 (47.3%)	6 (10.9%)
4 IgG	0 (0.0%)	3 (5.5%)	3 (5.5%)	44 (80.0%)	5 (9.1%)
5 IgM	47 (85.5%)	4 (7.3%)	4 (7.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
6 IgM	49 (89.1%)	4 (7.3%)	2 (3.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
7 IgG	0 (0.0%)	2 (3.6%)	5 (9.1%)	43 (78.2%)	5 (9.1%)
8 IgG	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (5.5%)	44 (80.0%)	8 (14.5%)
9 IgG	0 (0.0%)	3 (5.5%)	3 (5.5%)	44 (80.0%)	5 (9.1%)

U Tabeli 18 se može uočiti da nijedan od ispitivanih uzoraka nije pokazao negativan nalaz sa monoklonskim anti-D test reagensima klase IgG iz panela D-SCREEN. Najveći broj uzoraka pokazao je jačinu aglutinacije od 3+ u reakciji sa monoklonskim anti-D test reagensima 2 IgG (njih 44), 4 IgG (njih 44), 7 IgG (njih 43), 8 IgG (njih 44) i 9 IgG (ukupno 44). Negativan nalaz, odnosno izostanak aglutinacije pokazao je najveći broj ispitivanih uzoraka (47 i 49) u reakciji sa monoklonskim anti-D test reagensima klase IgM, 5 IgM i 6 IgM.

U tabelama od 19a do 19i prikazana je jačina reakcije aglutinacije varijanti antiga D sa anti-D test reagensima IgM i IgG iz panela D-SCREEN.

Tabela 19a. Jačina reakcije pojedinih varijanti D antiga sa anti-D test reagensom 1 IgM iz panela D-SCREEN						
	- (neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
tip 1	11 52.4%	6 28.6%	3 14.3%	1 4.8%	0 0.0%	21 100.0%
tip 3	2 6.7%	0 0.0%	15 50.0%	9 30.0%	4 13.3%	30 100.0%
DNB	0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%
ostali oblici	0 0.0%	1 33.3%	0 0.0%	2 66.7%	0 0.0%	3 100.0%
Ukupno	13 23.6%	7 12.7%	19 34.5%	12 21.8%	4 7.3%	55 100.0%

U Tabeli 19a pokazano je da sa anti-D test reagensom klase IgM, 1 IgM, od ukupno 21 ispitanika sa slabim D tipa 1, eritrociti 11 davalaca nisu dali reakciju aglutinacije, njih 6 je dalo reakciju aglutinacije jačine 1+, ukupno tri davaoca sa slabim D tipa 1 dalo je reakciju aglutinacije od 2+ i samo jedan davalac istog tipa dao je reakciju aglutinacije jačine 3+. Parcijalni D tipa DNB dao je sa ovim test reagensom jačinu aglutinacije jačine 2+. Od 30 ispitanih oblika slabog D tipa 3, 2 nisu dala aglutinaciju sa anti-D 1 IgM, dok je jačinu aglutinacije od 2+ dalo 15 ispitanih uzoraka ovog tipa, reakciju jačine 3+ dalo je 9, a 4 uzorka slabog D tipa 3 dalo je reakciju jačine 4+.

U Tabeli 19b uočava se da sa anti-D test reagensom 2 IgG iz panela D-SCREEN nijedan od dokazanih slabih oblika D antiga nije dao negativan nalaz, a najveći broj slabih D tipa 1 (njih 17) i tipa 3 (njih 23) dalo je reakciju aglutinacije jačine 3+.

Tabela 19b. Jačina reakcije pojedinih varijanti D antiga sa anti-D test reagensom 2 IgG iz panela D-SCREEN						
	- (neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
tip 1		1 4.8%	3 14.3%	17 81.0%	0 0.0%	21 100.0%
tip 3		1 3.3%	1 3.3%	23 76.7%	5 16.7%	30 100.0%
DNB		0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
ostali oblici		0 0.0%	0 0.0%	3 100.0%	0 0.0%	3 100.0%
Ukupno		2 3.6%	4 7.3%	44 80.0%	5 9.1%	55 100.0%

Analizom rezultata u Tabeli 19c može se vidjeti da eritrociti 3 davaoca sa slabim D antigenom tipa 1 nisu dali aglutinaciju sa anti-D 3 IgM, a 8/21 ispitanog uzorka davalaca sa slabim D tipa 1 dalo je reakciju aglutinacije jačine 2+. Najveći broj ispitanih eritrocita davalaca sa slabim D tipa 3, njih 17/30 ispitanih, dalo je jačinu aglutinacije 3+ sa ovim anti-D test reagensom, dok je najveći broj davalaca ovog tipa (njih 5), u odnosu na sve ispitane uzorke krvi, pokazivalo aglutinaciju jačine 4+.

Tabela 19c. Jačina reakcije pojedinih varijanti D antiga sa anti-D test reagensom 3 IgM iz panela D-SCREEN

	- (neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
tip 1	3 14.3%	3 14.3%	8 38.1%	7 33.3%	0 0.0%	21 100.0%
tip 3	0 0.0%	3 10.0%	5 16.7%	17 56.7%	5 16.7%	30 100.0%
DNB	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
ostali oblici	0 0.0%	0 0.0%	1 33.3%	1 33.3%	1 33.3%	3 100.0%
Ukupno	3 5.5%	6 10.9%	14 25.5%	26 47.3%	6 10.9%	55 100.0%

U Tabeli 19d može se vidjeti da je najveću jačinu aglutinacije u reakciji sa anti-D 4 IgG iz panela D-SCREEN, jačine 3+, dalo 16 ispitanih eritrocita sa dokazanom slabom D varijantom tipa 1 i 24 ispitana uzorka davalaca sa varijantom tipa 3, dok je jačinu aglutinacije od 4+ dalo 5 ispitanih uzoraka eritrocita slabog D tipa 3.

Tabela 19d. Jačina reakcije pojedinih varijanti D antiga sa anti-D test reagensom 4 IgG iz panela D-SCREEN

	- (neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
tip 1		2 9.5%	3 14.3%	16 76.2%	0 0.0%	21 100.0%
tip 3		1 3.3%	0 0.0%	24 80.0%	5 16.7%	30 100.0%
DNB		0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
ostali oblici		0 0.0%	0 0.0%	3 100.0%	0 0.0%	3 100.0%
Ukupno		3 5.5%	3 5.5%	44 80.0%	5 9.1%	55 100.0%

Iz Tabele 19e možemo da zaključimo da je veliki broj ispitanih uzoraka eritrocita davalaca krvi kod kojih je dokazan slab D tipa 1- njih 21 i 24 uzorka eritrocita davalaca krvi kod kojih je dokazan slab D tipa 3 dao negativnu reakciju aglutinacije sa anti-D 5 IgM iz panela D-

SCREEN. Negativan nalaz dali su i eritrociti davaoca sa DNB oblikom antigena D. Zapaža se takođe da jačinu aglutinacije od 3+ i 4+ sa anti-D 5 IgM iz panela D-SCREEN nije dao ni jedan od ispitivanih uzoraka krvi.

Tabela 19e. Jačina reakcije pojedinih varijanti D antigena sa anti-D test reagensom 5 IgM iz panela D-SCREEN						
	-(neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
tip 1	21 100.0%	0 0.0%	0 0.0%			21 100.0%
tip 3	24 80.0%	4 13.3%	2 6.7%			30 100.0%
DNB	1 100.0%	0 0.0%	0 0.0%			1 100.0%
ostali oblici	1 33.3%	0 0.0%	2 66.7%			3 100.0%
Ukupno	47 85.5%	4 7.3%	4 7.3%			55 100.0%

Anti-D 6 IgM iz panela D-SCREEN dao je negativnu jačinu aglutinacije sa 49 ispitanih eritrocita davalaca krvi kod kojih je dokazana neka od varijanti antigena D, i to sa 21 uzorkom eritrocita slabog D antigena tipa 1, 26 uzoraka eritrocita slabog D antigena tipa 3 i sa 1 uzorkom eritrocita sa dokazanim D antigenom varijante DNB, kao i jednim uzorkom eritrocita kod koje tip varijante D antigena nije mogao biti dokazan.

Tabela 19f. Jačina reakcije pojedinih varijanti D antigena sa anti-D test reagensom 6 IgM iz panela D-SCREEN						
	-(neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
tip 1	21 100.0%	0 0.0%	0 0.0%			21 100.0%
tip 3	26 86.7%	3 10.0%	1 3.3%			30 100.0%
DNB	1 100.0%	0 0.0%	0 0.0%			1 100.0%
ostali oblici	1 33.3%	1 33.3%	1 33.3%			3 100.0%
Ukupno	49 89.1%	4 7.3%	2 3.6%			55 100.0%

Zapaža se takođe da jačinu aglutinacije od 3+ i 4+ sa anti-D 6 IgM iz panela D-CREEN nije dao ni jedan od ispitivanih uzoraka krvi. Sve navedeno je prikazano u Tabeli 19f.

Analizom rezultata u Tabeli 19g može se zaključiti da je najviše ispitivanih uzoraka krvi dalo jačinu aglutinacije od 3+ i to 16 sa eritrocitima koji imaju tip 1 slabog D antiga i 23 sa eritrocitima koji imaju tip 3 slabog D antiga, kao i eritrociti sa varijantom DNB antiga D, dok je 5 uzoraka krvi sa varijantom slabog D tipa 3 dalo aglutinaciju od 4+ sa anti-D 7 IgG iz panela D-SCREEN.

Tabela 19g. Jačina reakcije pojedinih varijanti D antiga sa anti-D test reagensom 7 IgG iz panela D-SCREEN						
	-(neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
tip 1		1 4.8%	4 19.0%	16 76.2%	0 0.0%	21 100.0%
tip 3		1 3.3%	1 3.3%	23 76.7%	5 16.7%	30 100.0%
DNB		0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
ostali oblici		0 0.0%	0 0.0%	3 100.0%	0 0.0%	3 100.0%
Ukupno		2 3.6%	5 9.1%	43 78.2%	5 9.1%	55 100.0%

Ni jedan od ispitivanih uzoraka eritrocita nije dao negativan nalaz, niti slabu aglutinaciju jačine 1+ u reakciji aglutinacije sa anti-D 8 IgG iz panela D-SCREEN, dok je njih 44 dalo jačinu reakcije od 3+, od čega je 17 uzoraka eritrocita bilo sa slabim D antigenom tipa 1, 23 uzorka eritrocita sa slabim D tipa 3, 1 sa varijantom DNB i 3 uzorka eritrocita kod kojih nije dokazan tip varijante slabog D antiga. Aglutinaciju jačine 4+ dalo je 8 ispitanih uzoraka krvi, od kojih je 2 bilo sa slabim D tipa 1 i 6 sa slabim D tipa 3, što se sve može vidjeti u Tabeli 19h.

Tabela 19h. Jačina reakcije pojedinih varijanti D antigena sa anti-D test reagensom 8 IgG iz panela D-SCREEN						
	-(neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
tip 1			2 9.5%	17 81.0%	2 9.5%	21 100.0%
tip 3			1 3.3%	23 76.7%	6 20.0%	30 100.0%
DNB			0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
ostali oblici			0 0.0%	3 100.0%	0 0.0%	3 100.0%
Ukupno			3 5.5%	44 80.0%	8 14.5%	55 100.0%

U Tabeli 19i može se uočiti da nijedan od ispitanih uzoraka nije dao negativan nalaz u reakciji aglutinacije sa anti-D 9 IgG iz panela D-SCREEN. Najveći broj, njih 44, dao je jačinu aglutinacije od 3+ (17 uzoraka eritrocita sa dokazanim slabim D tipa 1 i 23 uzorka eritrocita sa slabim D tipa 3, kao i 1 sa varijantom DNB, uz tri uzorka kojima nije dokazan tip slabog D antigaena. Jačinu aglutinacije od 4+ dalo je 5 uzoraka eritrocita koji imaju slabi D antigen tipa 3.

Tabela 19i. Jačina reakcije pojedinih varijanti D antigena sa anti-D test reagensom 9 IgG iz panela D-SCREEN						
	-(neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
tip 1		2 9.5%	2 9.5%	17 81.0%	0 0.0%	21 100.0%
tip 3		1 3.3%	1 3.3%	23 76.7%	5 16.7%	30 100.0%
DNB		0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
ostali oblici		0 0.0%	0 0.0%	3 100.0%	0 0.0%	3 100.0%
Ukupno		3 5.5%	3 5.5%	44 80.0%	5 9.1%	55 100.0%

U Tabeli 20 prikazana je distribucija dokazanih varijanti antiga D kod davalaca krvi u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci u odnosu na pol. RhD antigen tip 3 dokazan je sa najvećom učestalošću u ispitivanoj populaciji davalaca krvi i muškog i ženskog pola, (30 davalaca muškog i 20 testiranih davalaca ženskog pola u odnosu na ukupan broj od 85 ispitanih), za njim slijedi tip 1, koji je dokazan kod 21 osobe muškog i 9 osoba ženskog pola, a kod jedne osobe ženskog pola dokazan je parcijalni oblik D antigena- DNB. U po dva slučaja i kod davalaca muškog i kod davalaca krvi ženskog pola utvrđeni su ostali oblici varijanti D antiga. Od 85 ispitivanih uzoraka krvi, 64% bilo je muškog, a 37% ženskog pola.

Tabela 20. Distribucija pola po molekularno dokazanim varijantama D antiga			
	Muški	Ženski	Ukupno
tip 1	21 (70.0%)	9 (30.0%)	30 (100.0%)
tip 3	30 (60.0%)	20 (40.0%)	50 (100.0%)
DNB	0 (0.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)
ostali oblici	2 (50.0%)	2 (50.0%)	4 (100.0%)
Ukupno	53 (64.4%)	32 (37.6%)	85 (100.0%)

U Tabeli 21 prikazana je distribucija molekularno dokazanih varijanti antiga D u odnosu na pripadnost krvnoj grupi ABO. Najveća učestalost slabog D antiga tipova 1 i 3 zapažena je kod osoba krvne grupe A (15 i 22 od ukupnog broja testiranih davalaca krvi), koja je i najzastupljenija u ispitivanoj grupi davalaca krvi; a onda kod ispitanika krvne grupe O (6 i 19 od ukupnog broja ispitivanih davalaca krvi).

Tabela 21. Distribucija krvne grupe ABO po molekularno dokazanoj varijanti D antiga

	A	B	AB	O	Ukupno
tip 1	15 (50.0%)	7 (23.3%)	2 (6.7%)	6 (20.0%)	30 (100.0%)
tip 3	22 (44.0%)	7 (14.0%)	2 (4.0%)	19 (38.0%)	50 (100.0%)
DNB	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)
ostali oblici	2 (50.0%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	1 (25.0%)	4 (100.0%)
Ukupno	39 (45.9%)	14 (16.5%)	5 (5.9%)	27 (31.8%)	85 (100.0%)

U Tabeli 22 prikazana je distribucija dokazanih varijanti antiga D u odnosu na Rh fenotip. Najveći broj slabog D antiga tipova 1 i 3 dokazan je kod osoba Rh fenotipa CcDwee (29/97% i 49/98% od ukupno 79 ispitanih davalaca krvi sa Rh fenotipom CcDwee, koji je i najčešće zastupljen u ispitivanom uzorku, što čini 93% u odnosu na ukupan broj ispitanih osoba); tipovi 1 i 3 dokazani su kod po jednog ispitanika Rh fenotipa CCDwee, kao i parcijalni oblik DNB, što je ukupno 3 ispitanika, odnosno 3,6% u odnosu na ukupan broj od 85, odnosno 100% testiranih; a ostali oblici varijanti antiga D dokazani su kod 1 davaoca krvi Rh fenotipa CcDwee i 3 davaoca Rh fenotipa ccDwEe.

Tabela 22. Distribucija varijanti RhD antiga prema Rh fenotipu

	CcDwee	CCDwe e	ccDwEe	CCDNBee	Ukupno
tip 1	29 (96.7%)	1 (3.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	30 (100.0%)
tip 3	49 (98.0%)	1 (2.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	50 (100.0%)
DNB	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)
ostali oblici	1 (25.0%)	0 (0.0%)	3 (75.0%)	0 (0.0%)	4 (100.0%)
Ukupno	79 (92.9%)	2 (2.4%)	3 (3.5%)	1 (1.2%)	85 (100.0%)

U tabelama od 23a do 23i prikazana je jačina reakcije aglutinacije ispitivanih eritrocita davalaca krvi različitih Rh fenotipova sa anti-D test reagensima IgM i IgG iz panela D-SCREEN.

U Tabeli 23a prikazana je jačina reakcije test reagenasa anti-D 1 IgM iz panela D-SCREEN u odnosu na Rh fenotip ispitanika. Može se uočiti da je 13 od ukupno 55 ispitanih uzoraka dalo negativnu reakciju aglutinacije sa ovim test reagensom, od toga je 12 imalo Rh fenotip CcDwee, a 1 ispitanik je imao Rh fenotip CCDwee. Najveći broj ispitanih uzoraka krvi dao je jačinu aglutinacije od 2+ u reakciji sa 1 IgM iz panela D-SCREEN, 18 uzoraka imalo je Rh fenotip CcDwee, a 1 uzorak je parcijalni oblik D antigena DNB, sa Rh fenotipom CCDee.

Tabela 23a. Jačina aglutinacije ispitivanih eritrocita davalaca krvi različitih Rh fenotipova sa anti-D test reagensom 1 IgM iz panela D-SCREEN

	- (neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
CcDwee	12 23.5%	7 13.7%	18 35.3%	10 19.6%	4 7.8%	51 100.0%
CCDwee	1 100.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%
ccDwEe	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	2 100.0%	0 0.0%	2 100.0%
CCDNBee	0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%
Ukupno	13 23.6%	7 12.7%	19 34.5%	12 21.8%	4 7.3%	55 100.0%

Tabela 23b pokazuje da negativan nalaz aglutinacije sa anti-D test reagensom 2 IgG nije dao nijedan od 55 ispitanih uzoraka krvi, bez obzira na Rh fenotip, dok je najveći broj uzoraka dao aglutinaciju jačine 3+, njih 44, od kojih je 40 imalo Rh fenotip CcDwee.

Tabela 23b. Jačina aglutinacije ispitivanih eritrocita davalaca krvi različitih Rh fenotipova sa anti-D test reagensom 2 IgG iz panela D-SCREEN

	-(neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
CcDwee		2 3.9%	4 7.8%	40 78.4%	5 9.8%	51 100.0%
CCDwee		0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
ccDwEe		0 0.0%	0 0.0%	2 100.0%	0 0.0%	2 100.0%
CCDNBee		0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
Ukupno		2 3.6%	4 7.3%	44 80.0%	5 9.1%	55 100.0%

U reakciji sa test reagensom 3 IgM iz panela D-SCREEN najveći broj uzoraka dao je jačinu aglutinacije od 3+, njih 26, od toga je 25 uzoraka imalo Rh fenotip CcDwee, dok je negativan nalaz dalo 3 ispitana uzorka, od toga 2 Rh fenotipa CcDwee, a 1 Rh fenotipa CCDwee, što se može vidjeti na Tabeli 23c.

Tabela 23c. Jačina aglutinacije ispitivanih eritrocita davalaca krvi različitih Rh fenotipova sa anti-D test reagensom 3 IgM iz panela D-SCREEN

	-(neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno	
CcDwee		2 3.9%	6 11.8%	13 25.5%	25 49.0%	5 9.8%	51 100.0%
CCDwee		1 100.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%
ccDwEe		0 0.0%	0 0.0%	1 50.0%	0 0.0%	1 50.0%	2 100.0%
CCDNBee		0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
Ukupno		3 5.5%	6 10.9%	14 25.5%	26 47.3%	6 10.9%	55 100.0%

Tabela 23d pokazuje da nijedan od ispitivanih uzoraka krvi nije davao negativan nalaz aglutinacije sa anti-D test reagensom 4 IgG, dok je najveći broj, čak 44 uzorka krvi, od kojih je 41 imao Rh fenotip CcDwee, davalо aglutinaciju jačine 3+, a 5 uzoraka eritrocita Rh fenotipa CcDwee davalо je reakciju aglutinacije jačine 4+.

Tabela 23d. Jačina aglutinacije ispitivanih eritrocita davalaca krvi različitim Rh fenotipova sa anti-D test reagensom 4 IgG iz panela D-SCREEN						
	-(neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
CcDwee		3 5.9%	2 3.9%	41 80.4%	5 9.8%	51 100.0%
CCDwee		0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%
ccDwEe		0 0.0%	0 0.0%	2 100.0%	0 0.0%	2 100.0%
CCDNBee		0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
Ukupno		3 5.5%	3 5.5%	44 80.0%	5 9.1%	55 100.0%

U reakciji sa anti-D test reagensom 5 IgM iz panela D-SCREEN 47 uzoraka ispitivanih eritrocita, od ukupno 55 ispitivanih uzoraka krvi dalo je negativan nalaz. Najveća jačina aglutinacije bila je 2+, što se pokazalo kod 2 uzorka Rh fenotipa CcDwee i kod 2 uzorka Rh fenotipa ccDwEe (Tabela 23e).

Tabela 23e. Jačina aglutinacije ispitivanih eritrocita davalaca krvi različitim Rh fenotipova sa anti-D test reagensom 5 IgM iz panela D-SCREEN						
	-(neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
CcDwee	45 88.2%	4 7.8%	2 3.9%			51 100.0%
CCDwee	1 100.0%	0 0.0%	0 0.0%			1 100.0%
ccDwEe	0 0.0%	0 0.0%	2 100.0%			2 100.0%
CCDNBee	1 100.0%	0 0.0%	0 0.0%			1 100.0%
Ukupno	47 85.5%	4 7.3%	4 7.3%			55 100.0%

Kada se analizira reakcija aglutinacije 55 ispitanih uzoraka eritrocita davalaca krvi sa anti-D test reagensom 6 IgM iz panela D-SCREEN (Tabela 23f), može se zaključiti da je čak 49 uzoraka dalo negativan nalaz u reakciji aglutinacije, dok je najjača reakcija aglutinacije bila 2+, a dobijena je sa dva uzorka krvi, od kojih je jedan imao Rh fenotip CcDwee, a drugi Rh fenotip ccDEe.

Tabela 23f. Jačina aglutinacije ispitivanih eritrocita davalaca krvi različitih Rh fenotipova sa anti-D test reagensom 6 IgM iz panela D-SCREEN						
	- (neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
CcDwee	47 92.2%	3 5.9%	1 2.0%			51 100.0%
CCDwee	1 100.0%	0 0.0%	0 0.0%			1 100.0%
ccDwEe	0 0.0%	1 50.0%	1 50.0%			2 100.0%
CCDNBee	1 100.0%	0 0.0%	0 0.0%			1 100.0%
Ukupno	49 89.1%	4 7.3%	2 3.6%			55 100.0%

U Tabeli 23g može se uočiti da nijedan od ispitivanih eritrocita nije dao negativan nalaz u reakciji sa anti-D 7 IgG iz panela D-SCREEN, dok je najjaču reakciju aglutinacije pokazalo 43 uzorka ispitanih eritrocita, od kojih je 40 imalo Rh fenotip CcDwee, 2 je bilo Rh fenotipa ccDwEe, a jedan je bio parcijalni oblik DNB, Rh fenotipa CCDNBee. Najjaču reakciju aglutinacije, jačine 4+ dali su eritrociti Rh fenotipa CcDwee kod 5 davalaca krvi.

Tabela 23g. Jačina aglutinacije ispitivanih eritrocita davalaca krvi različitih Rh fenotipova sa anti-D test reagensom 7 IgG iz panela D-SCREEN						
	- (neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
CcDwee		2 3.9%	4 7.8%	40 78.4%	5 9.8%	51 100.0%
CCDwee		0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%
ccDwEe		0 0.0%	0 0.0%	2 100.0%	0 0.0%	2 100.0%
CCDNB ee		0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
Ukupno		2 3.6%	5 9.1%	43 78.2%	5 9.1%	55 100.0%

U Tabeli 23h vidi se da nijedan od ispitivanih uzoraka eritrocita davalaca krvi nije dao ni negativnu reakciju, niti slabu aglutinaciju jačine 1+ u ispitivanju sa anti-D test reagensom 8 IgG iz panela D-SCREEN. Aglutinaciju jačine 3+ dalo je 44 uzorka krvi, od kojih je 40 bilo Rh fenotipa CcDwee, dok je jačinu aglutinacije od 4+ pokazalo 8 uzoraka istog Rh fenotipa.

Tabela 23h. Jačina aglutinacije ispitivanih eritrocita davalaca krvi različitih Rh fenotipova sa anti-D test reagensom 8 IgG iz panela D-SCREEN						
	-(neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
CcDwee			3 5.9%	40 78.4%	8 15.7%	51 100.0%
CCDwee			0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
ccDwEe			0 0.0%	2 100.0%	0 0.0%	2 100.0%
CCDNBee			0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
Ukupno			3 5.5%	44 80.0%	8 14.5%	55 100.0%

Nijedan od ispitivanih uzoraka eritrocita davalaca krvi nije dao negativan nalaz u reakciji aglutinacije sa anti-D test reagensom 9 IgG iz panela D-SCREEN, ali je kod ukupno 44 ispitana uzorka reakcija aglutinacije bila 3+, od kojih je 40 imalo Rh fenotip CcDwee, dok je 5 uzoraka krvi istog Rh fenotipa dalo reakciju aglutinacije jačine 4+ (Tabela 23i).

Tabela 23i. Jačina aglutinacije ispitivanih eritrocita davalaca krvi različitih Rh fenotipova sa anti-D test reagensom 9 IgG iz panela D-SCREEN						
	-(neg.)	1+	2+	3+	4+	Ukupno
CcDwee		3 5.9%	3 5.9%	40 78.4%	5 9.8%	51 100.0%
CCDwee		0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
ccDwEe		0 0.0%	0 0.0%	2 100.0%	0 0.0%	2 100.0%
CCDNBee		0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	0 0.0%	1 100.0%
Ukupno		3 5.5%	3 5.5%	44 80.0%	5 9.1%	55 100.0%

U Tabeli 24 prikazna je distribucija pola u odnosu na dokazani Rh fenotip ispitanika. Zapaža se da je i kod osoba muškog i kod osoba ženskog pol najčešći Rh fenotip CcDwee.

Tabela 24. Distribucija pola u odnosu na Rh fenotip ispitivanih davalaca			
	Muški	Ženski	Ukupno
CcDwee	49 (62.0%)	30 (38.0%)	79 (100.0%)
CCDwee	2 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
ccDwEe	2 (66.7%)	1 (33.3%)	3 (100.0%)
CCDNB ee	0 (0.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)
Ukupno	53 (62.4%)	32 (37.6%)	85 (100.0%)

U Tabeli 25 prikazana je distribucija krvnih grupa ABO u odnosu na dokazane Rh fenotipove davalaca krvi. Najčešći Rh fenotip, CcDwee zapažen je kod krvne grupe A, onda slijedi krvna grupa O, kod 27 ispitanika.

Tabela 25. Distribucija krvne grupe ABO u odnosu na Rh fenotip ispitivanih eritrocita					
	A	B	AB	O	Ukupno
CcDwee	36 (45.6%)	14 (17.7%)	4 (5.1%)	25 (31.6%)	79 (100.0%)
CCDwee	1 (50.0%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
ccDwEe	2 (66.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (33.3%)	3 (100.0%)
CCDNBee	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)
Ukupno	39 (45.9%)	14 (16.5%)	5 (5.9%)	27 (31.8%)	85 (100.0%)

Distribucija pojedinačnih slabih i parcijalnih oblika antigena D u odnosu na Rh fenotip prikazana je u Tabeli 26.

Tabela 26. Distribucija dobijenih varijanti D u odnosu na Rh fenotip					
	tip 1	tip 3	DNB	ostali oblici	Ukupno
CcDwee	29 (36.7%)	49 (62.0%)	0 (0.0%)	1 (1.3%)	79 (100.0%)
CC Dwee	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
ccDwEe	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)	3 (100.0%)
CCDNB ee	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)
Ukupno	30 (35.3%)	50 (58.8%)	1 (1.2%)	4 (4.7%)	85 (100.0%)

Najveću zastupljenost tip 3 slabog D antiga ima kod osoba Rh fenotipa CcDwee, (49/50 dokazanih slabih D oblika tipa 3) i kod jedne osobe Rh fenotipa CCDwee. Od 30 utvrđenih varijanti slabog D tipa 1, 29 je dokazano kod osoba Rh fenotipa CcDwee, dok je jedan utvrđen kod davaoca Rh fenotipa CCDNBee.

Gradacija jačine reakcije pojedinih varijanti antiga D sa dvije vrste monoklonskih anti-D test seruma klase IgM prikazana je u Tabeli 27.

Tabela 27. Jačina reakcije pojedinih varijanti antiga D sa anti-D test reagensima 1 IgM i 3 IgM iz panela D-SCREEN					
	tip 1	tip 3	DNB	ostali oblici	Ukupno
'-(neg.) /-'(neg.)*	3 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)
Ostali (jačina aglutinacije od 1+ do 4+)**	18 (34.6%)	30 (57.7%)	1 (1.9%)	3 (5.8%)	52 (100.0%)
Ukupno	21 (38.2%)	30 (54.5%)	1 (1.8%)	3 (5.5%)	55 (100.0%)

'-(neg.) /-'(neg.)- negativan nalaz sa 1 IgM i 3 IgM anti-D test reagensima

**- jačina aglutinacije od 1+ do 4+ sa 1IgM i 3 IgM anti-D test reagensima

Gradacija jačine reakcije pojedinih varijanti antiga D sa dvije vrste monoklonskih anti-D test seruma 1 IgM i 3 IgM u odnosu na određene Rh fenotipove prikazana je u Tabeli 28.

Tabela 28. Jačina reakcije sa anti-D test reagensima 1 IgM i 3 IgM iz panela D-SCREEN u odnosu na pojedinačne Rh fenotipove					
	Cc Dw ee	CC Dw ee	CC Dw Ee	CC DNB ee	Ukupno
'-(neg.) /-'(neg.)*	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)
Ostali (jačina aglutinacije od 1+ do 4+)**	49 (94.2%)	0 (0.0%)	2 (3.8%)	1 (1.9%)	52 (100.0%)
Ukupno	51 (92.7%)	1 (1.8%)	2 (3.6%)	1 (1.8%)	55 (100.0%)

'-(neg.) /-'(neg.)- negativan nalaz sa 1IgM i 3 IgM anti-D test reagensima

**- jačina aglutinacije od 1+ do 4+ sa 1IgM i 3 IgM anti-D test reagensima

U Tabeli 29 prikazana je jačina reakcije eritrocita sa monoklonskim anti-D test serumima 1 IgM i 3 IgM ispitanika muškog i ženskog pola.

Tabela 29. Jačina reakcije sa anti-D test reagensima 1 IgM i 3 IgM iz panela D-SCREEN u odnosu na pol			
	Muški	Ženski	Ukupno
'-(neg.) /-(neg.)*	3 (100.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)
Ostali (jačina aglutinacije od 1+ do 4+)**	35 (67.3%)	17 (32.7%)	52 (100.0%)
Ukupno	38 (69.1%)	17 (30.9%)	55 (100.0%)

'-(neg.) /-(neg.) - negativan nalaz sa 1IgM i 3 IgM anti-D test reagensima

** - jačina aglutinacije od 1+ do 4+ sa 1IgM i 3 IgM anti-D test reagensima

Jačina reakcije aglutinacije određenih tipova slabijih oblika antiga D sa monoklonskim anti-D test reagensima 5 IgM i 6 IgM iz panela D-SCREEN prikazana je u Tabeli 30.

Tabela 30. Jačina reakcije pojedinih varijanti antiga D sa anti-D test reagensima 5 IgM i 6 IgM iz panela D-SCREEN					
	tip 1	tip 3	DNB	ostali oblici	Ukupno
'-(neg.)/ -(neg.)*	21 (44.7%)	24 (51.1%)	1 (2.1%)	1 (2.1%)	47 (100.0%)
1+(poz.)/-(neg.)**	0 (0.0%)	2 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
1+(poz.)/1+(poz..)***	0 (0.0%)	2 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
2+(poz.)/1+(poz..)****	0 (0.0%)	1 (50.0%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)	2 (100.0%)
2+(poz.)/2+(poz..)*****	0 (0.0%)	1 (50.0%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)	2 (100.0%)
Ukupno	21 (38.2%)	30 (54.5%)	1 (1.8%)	3 (5.5%)	55 (100.0%)

'-(neg.)/ -(neg.) - negativan nalaz sa 1IgM i 3 IgM anti-D test reagensima; **1+(poz.)/-(neg.)- reakcija aglutinacije jačine 1+ sa 5IgM i negativan nalaz sa 6 IgM; ***1+(poz.)/1+(poz..)- reakcija aglutinacije jačine 1+ sa 5IgM i 1+ sa 6 IgM; **** reakcija aglutinacije jačine 2+(poz.) sa 5IgM i 1+(poz.) sa 6IgM; ***** reakcija aglutinacije jačine 2+(poz.) sa 5IgM i 2+(poz.). sa 6IgM iz panela D-SCREEN

Jačina reakcije aglutinacije eritrocita ispitivanih davalaca krvi određenih Rh fenotipova sa monoklonskim test reagensima 5 IgM i 6 IgM iz panela D-SCREEN vidi se u Tabeli 31.

Tabela 31. Jačina reakcije varijanti antiga D različitih Rh fenotipova sa anti-D test reagensima 5 IgM i 6 IgM iz panela D-SCREEN

	CcDwee	CCDw ee	ccDw Ee	CCDNB ee	Ukupno
-(neg.)/-(neg.)*	45 (95.7%)	1 (2.1%)	0 (0.0%)	1 (2.1%)	47 (100.0%)
1+(poz.)/ -(neg.)*	2 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
1+(poz.)/1+(poz.)****	2 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
2+(poz.)/1+(poz.)*****	1 (50.0%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
2+(poz.)/2+(poz.)******	1 (50.0%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
Ukupno	51 (92.7%)	1 (1.8%)	2 (3.6%)	1 (1.8%)	55 (100.0%)

*-(neg.)/ -(neg.)- negativan nalaz sa 1IgM i 3 IgM anti-D test reagensima; **1+(poz.)/-(neg.)- reakcija aglutinacije jačine 1+ sa 5IgM i negativan nalaz sa 6 IgM; ***1+(poz.)/1+(poz..)- reakcija aglutinacije jačine 1+ sa 5IgM i 1+ sa 6 IgM; **** reakcija aglutinacije jačine 2+(poz.) sa 5IgM i 1+(poz.) sa 6IgM; ***** reakcija aglutinacije jačine 2+(poz.) sa 5IgM i 2+(poz.). sa 6IgM iz panela D-SCREEN

Tabele 31 se može vidjeti da su 45 ispitivanih uzoraka Rh fenotipa CcDwee, jedan Rh fenotipa CCDwee i jedan Rh fenotipa CCDNBee dali negativan nalaz sa 5 IgM i 6 IgM test reagenasa anti-D, dok su najjaču reakciju aglutinacije sa ovim test reagensima (2+ i 2+) dali po jedan ispitanik sa Rh fenotipom CcDwee i ccDwEe.

U Tabeli 32 prikazana je jačina reakcije eritrocita ispitanika sa monoklonskim anti-D test reagensima 5 IgM i 6 IgM iz panela D-SCREEN u odnosu na pol.

	Muški	Ženski	Ukupno
-(neg.)/ -(neg.)*	34 (72.3%)	13 (27.7%)	47 (100.0%)
1+(poz.)/ -(neg.)*	1 (50.0%)	1 (50.0%)	2 (100.0%)
1+(poz.)/1+(poz..)***	0 (0.0%)	2 (100.0%)	2 (100.0%)
'2+(poz.)/1 +(poz.)****	2 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
2+(poz.)/2+(poz.)******	1 (50.0%)	1 (50.0%)	2 (100.0%)
Ukupno	38 (69.1%)	17 (30.9%)	55 (100.0%)

*-(neg.)/ -(neg.)- negativan nalaz sa 1IgM i 3 IgM anti-D test reagensima; **1+(poz.)/-(neg.)- reakcija aglutinacije jačine 1+ sa 5IgM i negativan nalaz sa 6 IgM; ***1+(poz.)/1+(poz..)- reakcija aglutinacije jačine 1+ sa 5IgM i 1+ sa 6 IgM; **** reakcija aglutinacije jačine 2+(poz.) sa 5IgM i 1+(poz.) sa 6IgM; ***** reakcija aglutinacije jačine 2+(poz.) sa 5IgM i 2+(poz.). sa 6IgM iz panela D-SCREEN

5.3 Karakteristike grupe ispitanika koji su serološki RhD-negativni, Rh fenotipa D-neg(-), C/E-poz.(+), molekularno tipiziranih na *RHD* i *RHCE*

Statistička obrada podataka rađena je u statističkom paketu SPSS 22 za Windows. Primarno dobijeni podaci analizirani su deskriptivnim statističkim metodama i metodama za testiranje hipoteze. Od deskriptivnih statističkih metoda korištene su: mjere centralne tendencije, mjere varijabiliteta i pokazatelji strukture iskazani u procentima.

5.3.1 Socio-epidemiološke karakteristike grupe ispitanika koji su serološki RhD negativni

U istraživanju je učestvovalo 92 RhD-negativna davaoca krvi. Od toga je bilo 15 (16,3%) ženskog i 77 (83,7%) muškog pola. Krvna grupa tipa A je zastupljena kod njih 34 (37,0%), tipa B kod 19 (20,7%), tipa AB kod 7 (7,6%) i tipa O kod njih 32 (34,8%).

Medijana broja davanja krvi iznosila je 5 puta. Znači oko 50% davaoca je dalo do 5 puta krv (Tabela 33).

Tabela 33. Socio-epidemiološke karakteristike grupe serološki RhD-negativnih davalaca krvi	
Posmatrana grupa (n=92)	
Pol (ženski /muški)	15/77
Krvna grupa A	34 (37,0%)
B	19 (20,7%)
AB	7 (7,6%)
O	32 (34,8%)
Krv dali med (min-max)	5 (1-41)

Rh fenotip je distribuiran na sljedeći način: a) CcDwee je dokazan kod njih 7 (7,6%); b) cccdEe kod 22 (23,9%); c) Ccddee kod 56 (60,9%); d) CcddEe kod 3 (3,3%); e) CC dd ee kod 2 (2,2%); f) kod 2 (2,2%) davaoca je ostao neutvrđen (Tabela 34).

Pozitivan nalaz molekularnog skrininga utvrđen je kod 9 (9.8%), a negativan kod 83 (90,2%) davalaca krvi.

Od devetoro ispitanika, čiji je molekularni skrining bio pozitivan, slabi D tip 1 određen je kod 2 (22,2%) davaoca, tip 11 kod 4 (44,4%), tip 3 kod 1 (11,1%) i kod 2 (22,2%) davaoca je ostao neodređen.

Tabela 34. Distribucija rezultata Rh fenotipa posle molekularnog skrininga u grupi serološki RhD-negativnih davalaca krvi			
	Negativan	Pozitivna	Ukupno
CcDwee	0 (0.0%)	7 (100.0%)	7 (100.0%)
ccddEe	22 (100.0%)	0 (0.0%)	22 (100.0%)
Ccddee	56 (100.0%)	0 (0.0%)	56 (100.0%)
CcddEe	3 (100.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)
CCddee	2 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
Neodređen	0 (0.0%)	2 (100.0%)	2 (100.0%)
Ukupno	83 (90.2%)	9 (9.8%)	92 (100.0%)

U Tabeli 35 prikazana je distribucija molekularno utvrđenih varijanti RhD antiga, prema Rh fenotipu, kod serološki RhD-negativnih davalaca krvi, gdje se vidi da je, među utvrđenima, najčešći tip 11- kod četiri davaoca krvi, onda slijedi tip 1 kod dva davaoca krvi i tip 3 kod jednog davaoca krvi.

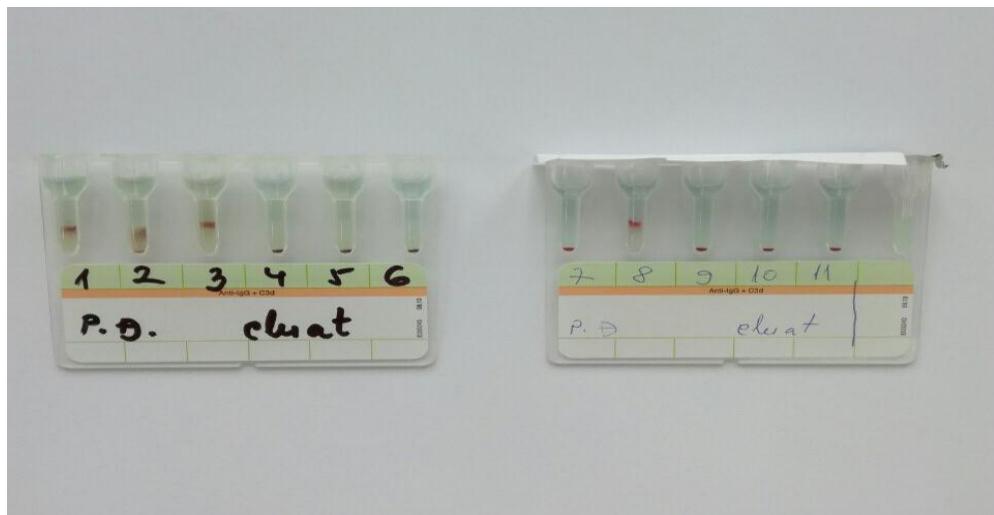
Tabela 35. Distribucija molekularno određene varijante RhD antiga prema Rh fenotipu u grupi serološki RhD-negativnih davalaca krvi					
	tip 1	tip 11	tip 3	ostali	Ukupno
CcDwee	2 (28.6%)	4 (57.1%)	1 (14.3%)	0 (0.0%)	7 (100.0%)
neodređen	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)	2 (100.0%)
Ukupno	2 (22.2%)	4 (44.4%)	1 (11.1%)	2 (22.2%)	9 (100.0%)

U Tabeli 36 prikazan je rezultat ispitivanja prisustva antiga D na eritrocitima tipa slabi D tip 11, kod 4 uzorka davalaca krvi. Testovi adsorpcije i kisele elucije rađeni su pošto je molekularnom tipizacijom utvrđeno da, kod prvobitno serološki određenih RhD-negativnih davalaca krvi, na eritrocitima postoji D antigen tip 11.

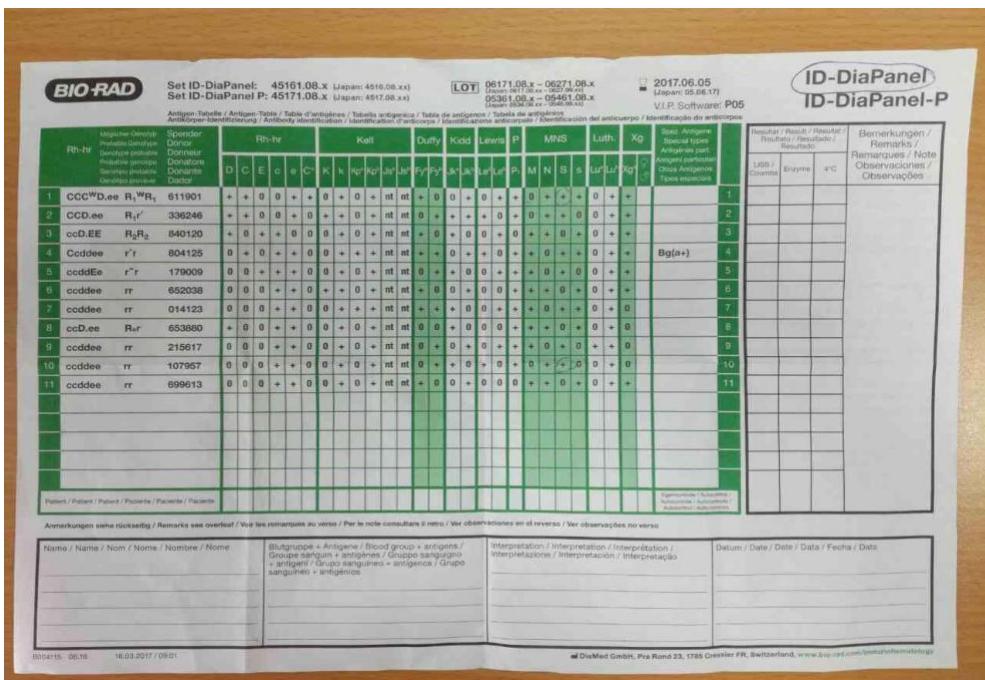
Tabela 36. Rezultati dokazivanja slabog D tipa 11 metodama adsorpcije i elucije kod četiri ispitanika

Seroški određen Rh fenotip	Adsorpcija sa anti-D test reagensom (ITKS-humanini monoklonski)	Identifikacija sa eluatom u IAT-LISSL Coombs Metoda u gelu	Identifikacija sa eluatom-enzimski test, metoda u gelu	Rh fenotip, određen molekularnom tipizacijom
1. Ccddee	2h, na 37°C	Anti-D, jačina reakcije 3+	Anti-D, jačina reakcije 4+	slabi D tip 11
2. Ccddee	2h, na 37°C	Anti-D, jačina reakcije 3+	Anti-D, jačina reakcije 4+	slabi D tip 11
3. Ceddee	2h, na 37°C	Anti-D, jačina reakcije 3+	Anti-D, jačina reakcije 4+	slabi D tip 11
4. Ccddee	2h, na 37°C	Anti-D, jačina reakcije 3+	Anti-D, jačina reakcije 4+	slabi D tip 11

Krv od davalaca uzimana je na EDTA. Identifikacija sa eluatom pokazivala je jačinu aglutinacije od 3+ u indirektnom antiglobulinskom testu metodom u gelu, a 4+ enzimskom tehnikom i metodom u gelu (Slika 20 i Slika 21) i na taj način je potvrđeno prisustvo antigena D na eritrocitima serološkim tehnikama.



Slika 20. Identifikacija eluata sa eritrocita ispitanika koji ima slabi D tip 11, poslije adsorpcije eritrocita sa anti-D serumom (humani-monoklonski, proizvođač Institut za transfuziju krvi Srbije, "in house" proizvodnja).



Slika 21. Tabela distribucije antiga na test eritrocitima za identifikaciju antitijela u panelu eritrocita proizvođača BioRad – D-positivi eritrociti su pod brojevima 1, 2, 3 i 8.

U Tabeli 37 prikazana je distribucija Rh fenotipova kod ispitivanih, serološki RhD-negativnih davalaca krvi.

Tabela 37. Distribucija Rh fenotipa u odnosu na pola u grupi serološki RhD-negativnih davalaca krvи

	Muški	Ženski	Ukupno
CcDwee	6 (85.7%)	1 (14.3%)	7 (100.0%)
ccddEe	19 (86.4%)	3 (13.6%)	22 (100.0%)
Ccddee	45 (80.4%)	11 (19.6%)	56 (100.0%)
CcddEe	3 (100.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)
CCddee	2 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
neodređen	2 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
Ukupno	77 (83.7%)	15 (16.3%)	92 (100.0%)

Distribucija krvne grupe ABO prema Rh fenotipu kod ispitivanih, serološki RhD-negativnih davalaca krvi prikazana je u Tabeli 38. Najveću učestalost među ispitanicima imala je krvna grupa A (34 osobe), slijedi je krvna grupa O (32 ispitanika), potom krvna grupa B (njih 19) i krvna grupa AB (7).

Tabela 38. Distribucija krvne grupe ABO u odnosu na Rh fenotip kod ispitanika koji su serološki RhD-negativni					
	A	B	AB	O	Ukupno
CcDwee	3 (42.9%)	1 (14.3%)	0 (0.0%)	3 (42.9%)	7 (100.0%)
ccddEe	12 (54.5%)	2 (9.1%)	1 (4.5%)	7 (31.8%)	22 (100.0%)
Ccddee	15 (26.8%)	14 (25.0%)	6 (10.7%)	21 (37.5%)	56 (100.0%)
CcddEe	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)
CCddee	2 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
neodređen	0 (0.0%)	1 (50.0%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)	2 (100.0%)
Ukupno	34 (37.0%)	19 (20.7%)	7 (7.6%)	32 (34.8%)	92 (100.0%)

Distribucija pola u odnosu na molekularno dokazane varijante RhD antiga, kod serološki D-negativnih davalaca krvi prikazana je u Tabeli 39.

Tabela 39. Distribucija pola u odnosu na molekularno dokazane varijante RhD antiga kod serološki RhD-negativnih davalaca krvi			
	Muški	Ženski	Ukupno
tip 1	2 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
tip 11	3 (75.0%)	1 (25.0%)	4 (100.0%)
tip 3	1 (100.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)
Neodreden	2 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
Ukupno	8 (89.9%)	1 (11.1%)	9 (100.0%)

Varijante antiga D utvrđene molekularnom tehnikom kod serološki RhD-negativnih davalaca krvi sa najvećom učestalošću su dokazane kod osoba krvne grupe O, mada je među ovim ispitnicima najveću učestalost imala krvna grupa A (Tabela 40).

Tabela 40. Distribucija krvne grupe ABO u odnosu na molekularno dokazane varijante RhD antiga kod serološki RhD-negativnih davalaca krvi

	A	B	AB	O	Ukupno
tip 1	1 (50.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)	2 (100.0%)
tip 11	1 (25.0%)	1 (25.0%)	0 (0.0%)	2 (50.0%)	4 (100.0%)
tip 3	1 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)
neodreden	0 (0.0%)	1 (50.0%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)	2 (100.0%)
Ukupno	3 (33.3%)	2 (22.2%)	0 (0.0%)	4 (44.4%)	9 (100.0%)

5.4 Rezultati skrinininga antitijela

Skrining antitijela rađen je kod svakog davanja krvi, metodom u gelu, indirektnim antiglobuliniskim testom, prema proceduri koja je opisana u poglavlju 4. U svim testiranjima, kod svakog davanja krvi, skrining antitijela pokazivao je negativan nalaz.

5.5 Strategija transfuziološkog liječenja RhD-negativnih pacijenata

U Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci zauzet je stručni stav da se eritrociti davalaca koji su RhD-negativni, Rh fenotipa Ccddee, ccddEe, CcddEe primjenjuju isključivo RhD-pozitivnim primaocima, kao i da Rh fenotipovi davaoca i primaoca budu kompatibilni.

6.0 Diskusija

Ovo ispitivanje sprovedeno je na uzorku od 85 davalaca krvi, kod kojih je serološki određen slabi RhD-antigen, kao i na uzorku od 92 serološki RhD-negativna, C+/E+ pozitivna davaoca krvi, kako bi se savremenim molekularnim metodama utvrdila učestalost pojedinih tipova slabih oblika D antiga u ovoj populaciji, kao i eventualno prisustvo *RHD* gena kod serološki D-negativnih osoba.

Poznato je i već istaknuto da je krvno grupni sistem Rh najvažniji i najkompleksniji od svih 36 do sada poznatih krvnogrupnih sistema [175]. Poslije krvnogrupnog sistema ABO, Rh predstavlja najvažniji krvnogrupni sistem za kliničku praksu, zbog imunogenosti antiga koji mu pripadaju [176-177]. Najvažnije Rh antige, RhD, RhC, RhE, Rhc i Rhe, kodiraju dva susjedna genska lokusa, gen *RHD*, koji uslovljava nastanak RhD proteina i RhD antiga i gen *RHCE*, koji kodira nastanak RhCE proteina, zajedno sa antigenima RhC, RhE, Rhc i Rhe [12]. Neposredna blizina dva gena na hromozomu 1, kao i položaj *RHD* i *RHCE* gena na *RH* lokusu omogućavaju izmjenu genetičkog materijala, koja zauzvrat dovodi do nastanka mnogih klinički značajnih varijanti RhD antiga [35]. Neke od tih varijanti (kao na primjer, DEL) teško se dokazuju serološkim metodama, pa se često, poslije izvođenja standardnih imunohematoloških testova, osobe sa ovim fenotipovima označavaju kao RhD-negativne [65]. Pošto je uočeno da krv davalaca koji imaju neku od RhD varijanti može da dovede do imunizacije RhD-negativnih primalaca [55,68,74], sveobuhvatno ispitivanje RhD-negativnih davalaca suštinski je značajno za utvrđivanje onih jedinica eritrocita koje mogu da izazovu imunizaciju RhD-negativnih pacijenata.

U prethodnoj deceniji je sprovedeno nekoliko molekularnih studija u populaciji bijele rase, a objavljeni rezultati ovih ispitivanja ukazuju da preporučena strategija može da doprinese otkrivanju RhD varijanti, koje je teško dokazati rutinskim serološkim metodama [55,65,178-181]. Buduće strategije za molekularni skrining RhD-negativnih osoba trebalo bi da doprinesu otkrivanju svih davalaca krvi i krvnih produkata, koji bi potencijalno mogli da dovedu do aloimunizacije slabo izraženim RhD antigenom. Bez obzira na napredak u metodologiji, neusaglašenosti u rezultatima određivanja RhD antiga su i dalje problem u rutinskom imunohematološkom radu [39,84,181]. Uprkos najvećim naporima, broj RhD-negativnih davalaca krvi koji ima varijante antiga D i određuje sa kao RhD-negativan, čak i poslije

indirektnog antiglobulinskog testa, je veći nego što se prvobitno mislilo [182]. Međutim, rutinski molekularni skrining ne bi trebalo da poveća ukupne troškove koji se već izdvajaju za određivanje RhD antiga. Trebalо bi napomenuti da pogrešna klasifikacija RhD statusa davalaca krvi nosi sa sobom i povećan rizik od aloimunizacije antigenom D, koji ima poseban značaj za žene u generativnom periodu.

Prema podacima iz članka Banija i sar. [184], u većini zemalja Evrope distribucija muškog i ženskog pola u populaciji davalaca krvi je podjednaka u mnogim zemljama. Izuzetak predstavlja Italija, gde je učešće osoba ženskog pola u populaciji davalaca krvi manje nego osoba muškog pola i iznosi oko 30%. Slična je situacija u Grčkoj gdje je učestalost žena davalaca krvi oko 33%. U Španiji žene čine 46% od ukupnog broja davalaca krvi, u Portugaliji 43%, u Belgiji 45,4%, u Holandiji 50%, u Danskoj 50%, u Francuskoj 50%, u Velikoj Britaniji 53%, u Finskoj 55% [183,184]. Podaci su prikupljeni iz godišnjih izvještaja i dokumenata dostupnih na internet stranicama nacionalnih udruženja ili objavljenih u pet najvažnijih transfuzioloških časopisa (Transfusion, Vox Sanguinis, Transfusion and Apheresis Science, Transfusion Medicine, Blood Transfusion). Pregledano je oko 80 publikacija.

Sprovedena studija među davaocima krvi Republike Srpske iz 2013. godine pokazala je da je među davaocima krvi bilo značajno veće učešće muškaraca nego žena, od 28% do 100%, u zavisnosti od službe do službe, a žene su u pojedinačnim službama za transfuziju krvi Republike Srpske bile zastupljene sa učestalošću od 5% do 17% [183]. U tadašnjem ispitanom uzorku bilo je oko 10% davalaca krvi ženskog pola [185]. Taj podatak upućuje da smo po raspodjeli davalaca prema polu bili veoma slični nekim mediteranskim zemljama kao što su Italija i Grčka, gdje je učestalost davalaca ženskog pola niža nego što je učestalost davalaca krvi muškog pola [184]. Ove zemlje su u manjini, u odnosu na većinu zemalja mediteranske regije i Evropske unije, gdje je učestalost davanja krvi među polovima podjednaka. Na osnovu podataka koje je dao Zavod za statistiku Republike Srpske, u našoj državi ima više stanovnika ženskog nego muškog pola, a taj broj je u posmatranom periodu veći u korist ženskog pola za 15000 do 16000. Sigurno je da su običaji, navike, kao i trudnoće, porođaji, uslovi života i stepen informisanosti o potrebi davanja krvi uticali da broj žena davalaca u Republici Srpskoj bude niži nego u ostalim zemljama regionala i Evrope. Podaci za Srbiju govore da je učestalost davalaca ženskog pola u centralnom regionu Srbije oko 26% [183].

Za analizu rezultata u okviru ove studije uzeti su podaci iz popisa stanovništva, domaćinstava i stanova u Republici Srpskoj 2013. godine [123]. Broj stanovnika Republike Srpske, u dobi od 18-65 godina iznosio je 776680, od toga 388394 (50,0%) ženskog i 388286 (37,6%) muškog pola. Ukupan broj davalaca krvi u periodu od aprila 2016. do marta 2017. godine, prema podacima iz informacionog sistema Zavoda za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci, iznosi 8592, što je 1,1% u odnosu na broj stanovnika Republike Srpske, u dobi od 18-65 godina. Od toga je u odnosu na ukupan broj davalaca krvi, 1713 (20%) ženskog i 6879 (80%) muškog pola. Očigledno je da je zastupljenost žena kao davalaca krvi veća u ovoj studiji u odnosu na prethodnu u okviru magistarskog rada istog autora [183]. Kontinuiran rad Zavoda za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci na motivaciji stanovnika da postanu davaoci krvi, a posebno rad na popularisanju davaljaštva krvi u srednjim školama i fakultetima, kao i putem savremenih načina komunikacija (razni oblici medija, društvene mreže) očigledno su imali pozitivnih efekata.

Rezultati ranije sprovedenih studija pokazuju da su žene u 70% slučajeva više odbijane od davanja krvi u odnosu na osobe muškog pola. Razloge za odbijanje treba tražiti u većoj učestalosti pojave anemije, drugih zdravstvenih problema ili neželjenih događaja prilikom davanja krvi kod osoba ženskog pola [186-188]. Vazovagalne reakcije i osećaj zamora poslije davanja krvi izgleda da su češći kod osoba ženskog u odnosu na davaoce muškog pola. Zato bi opšte zdravstveno stanje ženske populacije trebalo unaprijediti dobro izbalansiranom ishranom i davanjem preparata gvožđa. Osnovni navedeni razlog za odustajanje od davanja krvi po mnogim studijama bio je strah [189-190]. Pojavu straha od davanja krvi kod osoba ženskog pola trebalo bi suzbijati podizanjem svijesti o prednostima davanja krvi. Mnoga ispitivanja pokazuju da su osobe ženskog pola manje zastupljene kao davaoci krvi [190-193]. Većina studija u Indiji takođe opisuje veliki broj davalaca muškog pola u poređenju sa davaocima ženskog pola [194-195]. Razloge za ovu pojavu treba tražiti u važećim socijalnim tabuima, kulturološkim navikama, nedostatku motivacije i strahu od davanja krvi, koji su veoma zastupljeni u zemljama u razvoju. Generalno, većina dobrovoljno prikupljenih jedinica krvi potiče iz mobilnih ekipa, organizovanih na fakultetima, industrijskim i trgovačkim institucijama [193-196].

U posmatranoj studiji, distribucija krvnih grupa sistema ABO među davaocima krvi u obje ispitivane grupe pokazuje da je najviše zastupljena krvna grupa A, potom O, a onda B i AB. U grupi u kojoj je učestvovalo 85 davalaca krvi, kojima je serološki dokazan slabiji RhD antigen,

krvna grupa A je zastupljena kod njih 39 (45,9%), B kod 14 (16,5%), AB kod 5 (5,9%) i O kod njih 27 (31,8%) (Tabela 17). U grupi od 92 serološki RhD-negativna davaoca krvi, C+/E+, krvna grupa tipa A je zastupljena kod njih 34 (37,0%), tipa B kod 19 (20,7%), tipa AB kod 7 (7,6%) i tipa O kod njih 32 (34,8%) (Tabela 33). Ovi rezultati su u korelaciji sa objavljenim podacima o distribuciji krvnih grupa sistema ABO u zdravoj populaciji na prostorima bivše Jugoslavije [7].

Mediana broja davanja krvi u ispitivanim grupama davalaca iznosila je 2 puta u populaciji od 85 davalaca sa serološki i molekularno dokazanim slabim RhD antigenom, znači oko 50% davalaca je dalo do 2 puta krv (Tabela 17), odnosno 5 puta u populaciji od 92 serološki RhD-negativna davaoca krvi, što znači da je oko 50% davalaca u toj grupi dalo do 5 puta krv (Tabela 33). Ovi podaci ukazuju da je riječ o davaocima koji su više puta dali krv, pa je i određivanje krvnih grupa rađeno više puta, a rezultati imunohematoških ispitivanja su tačni i pouzdani.

Pod terminom fenotip podrazumijevaju se rezultati testiranja eritrocita sa specifičnim antiserumima. Za određivanje Rh fenotipa koristi se pet osnovnih antiseruma: anti-D, anti-C, anti-c, anti-E i anti-e. Uobičajene oznake za Rh fenotip prvi je uveo Mourant 1949. godine. Neki genotipovi mnogo su češći u određenim etničkim grupama. Tako na primjer, genotip osobe evropskog porijekla, koja u fenotipu ima D, C, c i e vjerovatno je *DCe/ce*, odnosno *R1r*. Genotip osobe afričkog porijekla sa ovim fenotipom vjerovatno je *DCe/Dce*, tj. *R1Ro*. Genotip ne može precizno da se odredi bez ispitivanja članova porodice, ali može da se predvidi na osnovu fenotipa i učestalosti gena u nekoj populaciji. Fenotip obično simbolizuje najvjerojatniji genotip. Serološkim testiranjem ne može se utvrditi da li je ispitivana osoba homozigot ili heterozigot za antigen D, jer anti-D test serumi rijetko pokazuju razliku u aglutinaciji između eritrocita sa duplom ili pojedinačnom dozom antiga D. Molekularnim testiranjima utvrđuje se zigotnost gena *RHD*, njegova delecija ili postojanje inaktivnog gena *RHD*. Podatak o *RHD* zigotnosti oca ima značaja u predviđanju RhD statusa fetusa i razvoju kliničke slike hemolizne bolesti novorođenčeta, u slučajevima kada majka ima anti-D antitijelo u cirkulaciji. Ako je, na primjer, genotip njenog partnera *DD*, ona može da rodi isključivo D-pozitivno dijete. Ukoliko je partner *Dd*, postoji 50% vjerovatnoće da će svako dijete koje ona rodi biti D-negativno, kada anti-D u serumu majke neće imati uticaja na stanje ploda [7,12,197].

Rezultati ove studije pokazuju da je Rh fenotip dokazan serološkim tehnikama u populaciji od 85 RhD-pozitivnih davalaca sa slabim D antigenom i ponovno ispitan molekularnim metodama distribuiran na sljedeći način: a) CcDwee je dokazan kod njih 79 (92,9%); b) CCDwee kod 2 (2,4%); c) ccDwEe kod 3 (3,5%); d) CCDNBee kod 1 (1,2%) (davalac čiji je tip varijanta D=DNB). Svi slabi oblici tipova 3 i 1 dokazani su kod osoba sa Rh fenotipom CcDwee ili CCDwee, dok su ostali oblici detektovani na eritrocitima ispitanika sa Rh fenotipom ccDwEe (Tabela 22).

U grupi od 92 serološki RhD-negativna davaoca krvi, molekularnim metodama dobijeni su sljedeći rezultati ispitivanja Rh fenotipa: a) CcDwee je dokazan kod njih 7 (7,6%); b) ccddEe kod 22 (23,9%); c) Ccddee kod 56 (60,9%); d) CcddEe kod 3 (3,3%); e) CCddee kod 2 (2,2%); f) kod 2 (2,2%) davaoca je ostao neutvrđen (Tabela 34).

Upoređivanjem rezultata ispitivanja iz ove studije sa rezultatima objavljenim u literaturi može se zaključiti da je distribucija Rh fenotipova u ispitivanoj populaciji davalaca krvi u Republici Srpskoj u skladu sa distribucijom Rh fenotipova u drugim populacijama bijele rase [46].

Svakoj jedinici krvi uzetoj od dobrovoljnih davalaca, neophodno je odrediti RhD antigen. Kod prvog davanja krvi Standardi većine zemalja preporučuju korištenje dvije tehnike, od kojih jedna mora da bude automatizovana. Pod tehnikama se podrazumijevaju mikrotitarska ploča, epruveta i gel kartica, a pod reagensima monoklonski i polikonski test reagensi. Monoklonski test reagensi imaju mnogo prednosti, ali se antitijela koje oni sadrže vezuju samo za jedan epitop antiga, dok poliklonski regensi sadrže antitijela protiv više epitopa ispitivanog antiga. Danas su u češćoj upotrebi monoklonski test reagensi, a prednosti su im visoka specifičnost, dobar aviditet i odlična senzitivnost. Reagensi u drugoj tehnici po pravilu bi trebalo da budu od drugog proizvođača ili od druge serije istog proizvođača. Kod ostalih testiranja, dozvoljava se ispitivanje jednom tehnikom. U slučaju izostanka pozitivnog nalaza u inicijalnom testiranju Standardi zemalja centralne Evrope i većine zemalja koje su pripadale bivšoj Jugoslaviji predviđaju nastavak ispitivanja varijanti antiga D tehnikom indirektnog antiglobulinskog testa [7].

Kao što se može vidjeti iz opisanog algoritma za dokazivanje antiga D koji se primenjuje u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci, indirektan antiglobulinski test je sastavni dio rutinske prakse, kada je u ispitivanju prisustva D antiga na eritrocitima davaoca

krvi, sa anti-D test reagensima koji reaguju u direktnoj aglutinaciji nalaz negativan ili $\leq 2+$, metodom u epruveti i metodom u gelu. U Prilogu 5, u Tabelama 18, 19a do 19i, 23a do 23i kao i 27, 28, 29, 30 i 31 u poglavlju Rezultati, mogu se vidjeti jačine aglutinacija svih ispitanih eritrocita davalaca krvi sa serološki dokazanim slabim RhD antigenom, u reakciji sa različitim monoklonskim test reagensima anti-D za dokazivanje varijanti antiga D iz panela D-SCREEN proizvođača Diagast. Na osnovu priloženih rezultata, zaključuje se da sa pojedinim monoklonskim test reagensima anti-D klase IgM iz panela D-SCREEN nije reagovalo: 13 (prvi anti-D u panelu D-SCREEN, 1 IgM), 3 (treći anti-D u panelu D-SCREEN, 3 IgM), 47 (peti anti-D u panelu D-SCREEN, 5 IgM) i 49 (šesti anti-D u panelu D-SCREEN, 6 IgM) ispitanih eritrocita davalaca krvi, dok sa 4 vrste anti-D test reagenasa klase IgG različitih klonova nije zabilježen ni jedan negativan nalaz. To znači da u direktnoj aglutinaciji veliki broj ispitivanih eritrocita nije pokazao reakciju. Nadalje, na osnovu dobijenih nalaza poslije ispitivanja sa panelom monoklonskih anti-D test reagenasa D-SCREEN, nije se mogao donijeti zaključak o tipu varijante antiga D na ispitivanim eritrocitima. U službama za transfuziju krvi u svijetu strategija ispitivanja antiga D značajno je promjenjena uvođenjem monoklonskih anti-D reagenasa osamdesetih godina prošlog vijeka. Monoklonska antitijela imaju povećanu osjetljivost i u inicijalnom testiranju, mnogi eritrociti koji imaju slabiju ekspresiju RhD antiga mogu biti označeni kao RhD-pozitivni. Oni mogu da budu selektivni i za specifičnost određenih epitopa antiga D [198-200]. Paneli monoklonskih anti-D test reagenasa komercijalnih proizvođača za dokazivanje nekih parcijalnih i slabih oblika antiga D već duže vremena su dostupni na tržištu i neka saopštenja govore o mogućnostima njihove upotrebe za utvrđivanje određenih varijanti antiga D. Ipak, u najvećem broju slučajeva upotreboru ovih reagenasa ne može se sa sigurnošću dokazati varijanta antiga D, što je pokazalo i ovo ispitivanje.

Prije izvjesnog vremena u više laboratorija centralne Evrope rađene su studije koje su imale za cilj utvrđivanje učestalosti alela *RHD* molekularnim metodama, kod osoba koje su serološki bile D-negativne, sa antigenom C ili E u Rh fenotipu. Ove studije takođe su analizirale rizik od imunizacije D-negativnih primalaca poslije transfuzije eritrocita fenotipa weak (slabi) D. Tako se došlo do zaključka da se propust u utvrđivanju antiga D monoklonskim anti-D reagensima najčešće događa kod serološki D-negativnih davalaca, koji u Rh fenotipu imaju antigene C ili E. Zato ovi autori smatraju da bi u rutinskom testiranju prilikom prvog davanja krvi, ispitivanje trebalo dopuniti indirektnim antiglobuinskim testom, jer ovaj test otkriva većinu

D varijanti (fenotipova D weak i parcijalni D) [7,48,54-55]. Poslije detaljne analize načina određivanja antiga D davaocima krvi u više Laboratorija u centralnoj Evropi i drugim regijama, Međunarodni forum za dokazivanje slabije izraženog antiga D preporučio je rutinsku primjenu indirektnog antiglobulinskog testa kod svih D-negativnih davalaca, a posebno onih koji u fenotipu imaju antigen C ili E [182]. Već je ranije istaknuto da ni u Sjedinjenim Američkim Državama ne postoji standard kako za određivanju varijanti antiga D serološkim metodama i tehnikama, tako ni za interpretaciju dobijenih rezultata [92]. Učestalost davalaca krvi kojima je antigen D dokazan samo u indirektnom antiglobulinskom testu, prema podacima ovog foruma, kreće se od 0,01% u Španiji do 4,1% u Danskoj [48,182]. Učestalost slabijeg D (Dweak) antiga u odnosu na ukupan broj registrovanih davalaca krvi u ovom ispitivanju iznosio je 85/8592 (0,99% ili 1,0%), dok je u odnosu na ukupan broj registrovanih RhD-pozitivnih davalaca, kojima su obuhvaćen i davaoci sa serološki slabije izraženim RhD antigenom, iznosila 85/7065 (1,20% ili 1,0%).

Na osnovu poređenja sa iznijetim podacima iz literature može se zaključiti da se u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci primjenjuju savremene preporuke za dokazivanje RhD antiga davaocima krvi, kao i slabije izraženog antiga D u istoj populaciji, u okviru aktuelnih seroloških metoda, kao i da su, na osnovu rezultata dobijenih na ispitivanom uzorku, učestalost i tipovi slabijeg D antiga u populaciji Republike Srpske u skladu sa rezultatima objavljenim u literaturi za narode bijele rase.

Slijedeći savremenu strategiju u testiranju D antiga davaocima i trudnicama, u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci uvedeno je molekularno testiranje *RHD* i *RHCE* gena davaocima, trudnicama i pacijentima, početkom 2017. godine, metodom FluoGene. Ona podrazumijeva PCR-SSP, uz fluorometrijsko očitavanje na aparatu FluoVista. Analizom 85 serološki dokazanih slabih oblika RhD antiga kod dobrovoljnih davalaca krvi ranije pomenutom molekularnom tehnikom, dobijeni su sljedeći rezultati: slabi D tip 3 dokazan je kod 50 davalaca, slabi D tip 1 utvrđen je kod 30, parcijalni oblik antiga D- DNB identifikovan je kod jedne osobe, a kod četiri davalaca krvi utvrđeno je postojanje varijanti antiga D koje se po tipu ne mogu definisati postojećom metodom. Nalazi su provjeravani i u Zavodu za transfuzijsku medicinu Republike Slovenije Republike Slovenije, a precizna specifikacija varijante antiga D za ove četiri osobe nije mogla da se obavi ni u njihovoj laboratoriji za molekularnu dijagnostiku.

Ova četiri davaoca krvi zahtijevaju dalju dijagnostiku sekvencioniranjem *RHD* gena u nekoj od referentnih laboratorijskih ustanova u svijetu.

Prema objavljenim podacima u stručnoj literaturi, od ukupnog broja testiranih uzoraka, učestalost za D weak tip 1 je 70%, za D weak tip 2 iznosi 18%, dok je za D weak tip 3 frekvencija 5%. D weak tip 1 karakterističan je za haplotip *DCe*, D weak tip 2 za haplotip *DcE*, D weak tip 3 za haplotip *DcE*. Najčešći je tip 1, koji ima mutaciju aminokiselina Val270Gly i koji zajedno sa tipovima 2 i 3 predstavlja oko 93% D weak fenotipova dokazanih kod osoba evropskog porijekla [51,65,204]. Učestalost se razlikuje u različitim populacijama: veoma rijedak slabi oblik antiga D tip 38 (Gly278Asp) relativno je čest kod stanovnika Portugalske (201); weak D tip 42 najčešći je u Kvebeku, u Kanadi [202], kao i slabi D tip 3 (Ser3Cys), koji je najčešći u regionu Zagreba u Hrvatskoj [203] (Prilog 1).

Poređenjem rezultata dobijenim u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci sa nalazima objavljenim u literaturi, može se uočiti da je među ispitanim davaocima krvi u Republici Srpskoj koji imaju serološki slabi D antigen molekularnom metodom utvrđen, kao najčešći, slabi D tip 3, kod 50 ispitanih, a onda slijedi slabi D tip 1, kod 30 ispitanih. To je u korelaciji sa rezultatima dobijenim u evropskim populacijama, mada se u tim ispitivanjima kao što je istaknuto, najčešće pojavljuje slabi D tip 1, sa učestalošću od 70%, dok je učestalost slabog D tipa 3 oko 5%. Međutim, ispitivanje u Hrvatskoj pokazalo je da među davaocima krvi koji imaju weak D najveću učestalost zauzima slabi D tip 3 [203]. Iako su ovo naši prvi rezultati, oni bi ipak mogli da upućuju na određene genetske sličnosti naroda na istim prostorima, koje su rezultat viševjekovnog miješanja i migracija. Dokazani tipovi varijanti slabog D antiga u populaciji Republike Srpske u većini slučajeva prisutni su kod osoba sa Rh fenotipovima CcDwee, (tip 3 kod 49 osoba ovog Rh fenotipa i tip 1 kod 29 osoba ovog fenotipa), a samo u dva slučaja kod osoba sa fenotipom CCDwee (1 davalac sa weak D tip 3 i 1 davalac sa weak D tip 1). Kao što je napomenuto, podaci iz literature govore da je weak D tip 3 uglavnom udružen da haplotipom *DcE*, što u ovom ispitivanju nije slučaj.

Među davaocima krvi kojima je serološkim metodama utvrđen slabi D antigen, nalazi se i jedan kome je molekularnim ispitivanjem dokazano je da je to parcijalni oblik antiga D, tipa DNB. U serološkom ispitivanju, ovi eritrociti su davali reakciju aglutinacije jačine 3+ sa anti-D test reagensima metodom u epruveti, dok su u reakciji sa panelom monoklonskih anti-D test reagenasa za dokazivanje varijanti antiga D (D-SCREEN, Diagast) dali negativan nalaz sa

anti-D klase IgM, klena P3X21211F1 i anti-D klase IgM, klena P3X21223B10. Sa ostalih sedam test reagenasa anti-D reakcija aglutinacije bila je 3+ (anti-D klase IgM, klena HM10, anti-D klase IgG, klena HM16, anti-D klase IgM, klena P3X61, anti-D klase IgG, klena P3X35, anti-D klase IgG, klena P3X241, anti-D klase IgG, klena P3X249, anti-D klase IgG, klena P3X290. Rh fenotip davaoca dokazan serološki i molekularno je CCDee, a radi se o osobi ženskog pola, koja u cirkulaciji nije imala anti-D antitijelo.

Prema rezultatima istraživanja Wagner-a i saradnika iz 2002. godine o učestalosti varijante DNB kod četiri naroda centralne Evrope u Švajcarskoj, Njemačkoj i Danskoj, skrining nebirane populacije davalaca krvi Rh fenotipa CcDee pokazao je da je sa izuzetkom Danske, DNB najčešći parcijalni oblik antigena D u centralnoj Evropi. Najveću učestalost u istraženoj populaciji imao je u oblasti Ticino, a bio je zastupljeniji i od parcijalnog oblika DVII [205]. U ispitivanje je uključeno 12 davalaca krvi, među njima su bili i oni sa anti-D antitijelom u cirkulaciji. Radilo se o osobama bijele rase, porijekлом iz centralne Evrope, a deda jedinog ispitanika porijekлом iz Danske je austrijskog porijekla. Svi ispitanici su Rh fenotipa CcDee. Pošto su ispitani roditelji davaoca iz Danske, koji je naslijedio DNB alel od oca čiji je fenotip bio CCDee, utvrđena je povezanost haplotipa *CDe* sa ovom varijantom [205]. U Institutu za transfuziju krvi Srbije opisan je slučaj trudnice koja ima varijantu DNB, ali joj je u cirkulaciji dokazano anti-D antitijelo, odmah poslije drugog porođaja, u mješavini klasa IgM i IgG [206]. Kod ove žene antigen D je davao jačinu aglutinacije od 4+ sa svim raspoloživim anti-D test reagensima. U slučaju davaoca krvi ženskog pola iz Republike Srpske nemamo podatke o dokazanom anti-D antitijelu u cirkulaciji, jačina aglutinacije D antigena sa anti-D test reagensima u direktnoj aglutinaciji bila je 3+, dok je uobičajena reakcija za DNB tip varijante antigena D 4+, a Rh fenotip ispitanice je CCDwee, što je prethodno opisano u jednom slučaju [205]. Svakako je važno istaći da je primjer ove ispitanice važan za imunohematološko praćenje, jer ona ima oblik parcijalnog D antigena koji može da stvori anti-D antitijelo poslije transfuzije ili trudnoće i izlaganja RhD-pozitivnim eritrocitima. Zato je kod nje obavezno antenatalno imunohematološko testiranje u trudnoći i primjena RhD-negativne krvi, kao i RhD imunoprofilakse.

U naše ispitivanje bila su uključena 92 davaoca krvi koji su serološkim tehnikama određeni kao RhD-negativni, Rh fenotipa D-neg(-), C/E-poz(+), da bi im bila rađena molekularna tipizacija radi utvrđivanja eventualnog prisustva gena *RHD* i *RHCE*. Prije testa

molekularne tipizacije, rađen je molekularni skrining za sve serološki RhD-negativne davaoce krvi. Ovaj skrining omogućava detekciju eksona gena *RHD* i to eksona 3, 5 i 10 u jednoj reakciji, a test je pogodan za molekularnu potvrdu serološki negativnih uzoraka. Pozitivne reakcije dobijene skrining testom se kasnije dalje istražuju kitovima za *RHD* i *CDE*.

Molekularno utvrđen Rh fenotip u grupi od 92, serološki D-negativna ispitanika bio je distribuiran na sljedeći način: a) CcDwee je dokazan kod 7 (7,6%), od ukupnog broja ispitanih; b) ccddEe kod 22 (23,9%), od ukupnog broja ispitanih; c) Ccddee kod 56 (60,9%), od ukupnog broja ispitanih; d) CcddEe kod 3 (3,3%), od ukupnog broja ispitanih; e) CCddee kod 2 (2,2%), od ukupnog broja ispitanih; f) kod 2 (2,2%) davaoca je ostao neutvrđen (Tabela 34). Testiranjem metodom PCR-SSP sa fluorometrijskim očitavanjem fluorescencije na aparatu FluoVista u našoj laboratoriji dokazano je da od 7 davalaca krvi koji su serološki određeni kao RhD-negativni, Rh fenotipa Ccddee, njih 4 u stvari imaju slabi RhD tip 11 (57%), 2 slabi RhD tip 1 (29%) i 1 slabi RhD tip 3 (14,3%) (Tabela 35). Medijana broja davanja krvi iznosila je 5 puta kod ove grupe, što znači da se radi o populaciji višestrukih davalaca, kojima je kod svakog davanja ispitivan RhD status, ali kod njih sedam, slabi D antigen nije bilo moguće dokazati standardnim serološkim tehnikama. Naknadnim uzimanjem uzorka krvi od četiri davalaca i testiranjem eritrocita tehnikama adsorpcije i kisele elucije u Institutu za transfuziju krvi Srbije potvrđeno je prisustvo D antiga (Tabela 36, Slika 20 i Slika 21). Testovi adsorpcije i kisele elucije sa eritrocitima ovih davalaca krvi rađeni su pošto je molekularnom tipizacijom utvrđeno da, kod prвobitno serološki određenih RhD-negativnih davalaca krvi, na eritrocitima postoji D antigen tip 11. Za test adsorpcije korišten je test serum anti-D, humani-monoklonski, proizvođača- Instituta za transfuziju krvi Srbije, "in house" proizvodnja (mješavina pula seruma imunizovanih dobrovoljnih davalaca -IgG poliklonska antitijela i komercijalni monoklonski test reagensi - IgM humana, monoklonska antitijela: klon RUM1 ili MS-201). Na sajtu RhesusBase može se pronaći podatak da se slabi D tip 11 nalazi u dva haplotipa: jedan je cDe, kada se pojavljuje kao slabi D koji se lako može dokazati u indirektnom antiglobulinskom testu, dok je u haplotipu CDe gustina antiga mnogo manja, pa je ovaj fenotip po tome na granici slabog D i DEL fenotipa. Vjerovatno je da su opisana četiri slučaja slabog D tipa 11 u našoj populaciji davalaca u grupi onih koji se nasleđuju sa haplotipom CDe [65,107]. Ostala tri serološki D-negativna,

molekularno pozitivna davaoca krvi pripadaju tipovima 1 i 3. Njih nismo naknadno provjeravali tehnikama adsorpcije i elucije, jer uzorci krvi nisu bili dostupni.

U Prilogu 5, u Tabelama 18, 19a do 19i, 23a do 23i, kao i 27 i 31 u poglavljju Rezultati, mogu se vidjeti jačine aglutinacija svih ispitanih eritrocita davalaca krvi koji su označeni kao osobe sa serološki slabim RhD, u reakciji sa različitim monoklonskim test reagensima anti-D za dokazivanje varijanti antiga D iz panela D-SCREEN proizvođača Diagast. Na osnovu priloženih rezultata, zaključuje se da sa monoklonskim test reagensima anti-D klase IgM nije reagovalo 13 (prvi anti-D u panelu D-SCREEN, 1IgM), 3 (treći anti-D u panelu D-SCREEN, 3IgM), 47 (peti anti-D u panelu D-SCREEN, 5IgM) i 49 (šesti anti-D u panelu D-SCREEN, 6IgM) ispitanih eritrocita, dok sa 4 vrste anti-D test reagenasa klase IgG različitih klonova nije zabilježen ni jedan negativan nalaz. U Tabelama 19a do 19i vidi se jačina aglutinacije određenih tipova slabih D antiga u reakciji sa svim monoklonskim test reagensima anti-D iz panela D-SCREEN. Uočava se da je negativan nalaz sa monoklonskim anti-D reagensima klase IgM, 1IgM i 3IgM dao najveći broj ispitičanih eritrocita koji su imali slabi D tip 1 (njih 11 i 3, u reakciji sa 1IgM i 3IgM), dok je u reakciji sa monoklonskim anti-D klase IgM, 5IgM i 6IgM negativan nalaz dalo najviše ispitičanih eritrocita slabog D tipa 3 (24 i 26, u reakciji sa 5IgM i 6IgM). Kad je reč o anti-D reagensima klase IgG, najveći broj uzoraka dao je jačinu aglutinacije od 3+, dok su aglutinaciju od 4+ davali uglavnom eritrociti sa slabim D tipa 3, osim u slučaju anti-D klase IgG, 8IgG, sa kojim je 2 uzorka eritrocita slabog D tipa 1, kao i 6 uzoraka eritrocita slabog D tipa 3 dalo aglutinacije jačine 4+. Ovi nalazi upućuju na zaključak da je ispitanje varijanti antiga D indirektnim antiglobulinskim testom, sa anti-D reagensima klase IgG u prednosti nad direktnom aglutinacijom sa anti-D klase IgM, što je u korelaciji sa već iznijetim podacima iz literature.

Većina članova internacionalnog foruma, koja se prije nekoliko godina bavila analizom i prikupljanjem svih podataka na ovu temu, ipak je bila stanovišta da rutinsko testiranje *RHD* statusa ne treba da bude obavezno [55,65,207-208]. Kako je *RHD*DEL* obično povezan sa genima *RHCE*Ce* ili *RHCE*cE*, nekoliko učesnika foruma zastupalo je stav da se serološki RhD-negativnim primaocima, bez obzira na to kakav im je Rh fenotip, a posebno djevojčicama i ženama u generativnom dobu, transfunduje krv Rh fenotipa ccddee [55,65,182,207,209].

Studijom sprovedenom u Danskoj, tokom koje je testirano 5058 serološki D-negativnih davalaca na prisustvo *RHD* gena, molekularnom dijagnostikom utvrđeno je 13 osoba koje su imale ovaj gen. Svi davaoci koji su imali gen *RHD*, bili su fenotipa DEL [210]. Retrospektivnom analizom utvrđeno je da je 13 davalaca koji su imali *RHD* gen dalo 136 transfuzija D-negativnim pacijentima, a samo jedan primalac stvorio je anti-D antitijelo. Zaključak ove studije je da bi bilo teško opravdati troškove testiranja svih serološki D-negativnih davalaca na prisustvo *RHD* gena [210]. Pozitivan nalaz molekularnog skrininga u našem ispitivanju utvrđen je kod 9 (9,8%), a negativan kod 83 (90,2%) davalaca krvi. Od devetoro ispitanika, čiji je nalaz pozitivan, slabi D tip 1 određen je kod 2 (22,2%) davaoca, tip 11 kod 4 (44,4%), tip 3 kod 1 (11,1%) i kod 2 (22,2%) davaoca je ostao neodređen, što upućuje na zaključak da je molekularno određivanje RhD statusa kod osoba koje su serološki D-negativne, a imaju C i/ili E u Rh fenotipu svršishodno i neophodno radi primjene bezbjedne transfuzije RhD-negativnim primaocima.

Podaci iz literature kažu da RhD antigen fenotipa DEL ne može da se dokaže standardnim serološkim tehnikama, pa se takve osobe poslije rutinskog testiranja krvnih grupa u Službama za transfuziju krvi proglašavaju RhD-negativnima. Postoje podaci da fenotip DEL može da dovede do primarne imunizacije D-negativnih pacijenata putem transfuzije krvi [48], kao i drugi veoma slabi oblici antiga D, kao što su weak D tip 2 [55,69-70,88,179,182], slabi D tip 26 [55], slab oblik D tip 1 sa dCe u trans poziciji (koja slabi ekspresiju antiga) [95], kao i D-/D+ himere sa određenim količinom D-pozitivnih eritrocita, koja je toliko mala da ne može da se dokaže rutinskim serološkim testiranjem [55]. Ova istraživanja pokazala su da oko 1% stanovnika centralne Evrope ima *RHD* alele sa aberantnom strukturom koje kodiraju nastanak antiga D sa smanjenom reaktivnošću. Iz tih razloga u Švajcarskoj i Njemačkoj se već nekoliko godina svim davaocima krvi (koji su serološkim metodama određeni kao D-negativni) utvrđuje *RH* genotip, kako bi se među njima dokazali nosioci aberantnih *RH* alela, a posebno fenotip DEL i D+-himere i tako spriječila mogućnost senzibilizacije D-negativnih primalaca, posebno djevojčica i žena u generativnom periodu [179]. Navedeni podaci iz literature ukazuju da postoji korelacija između objavljenih rezultata i onih koji su dobijeni ovom studijom.

Oko 95% osoba bijele rase u centralnoj Evropi, kojima je serološki utvrđen slabi D antigen, ima slabi D tip 1, 2 ili 3. Oni se tretiraju kao RhD-pozitivni i mogu da dobiju transfuziju RhD-

pozitivne krvi. Odsustvo anti-D antitijela kod osoba pomenutih fenotipova izgleda da je posljedica činjenice da različita alela *RHD* kodira stvaranje svih epitopa RhD antigena kod ovih osoba u odnosu na osobe sa normalno izraženim antigenom D, iako je gustina antigena na površini eritrocita sa slabim D tip 1, 2 ili 3. manja nego kod onih sa normalnim D [51]. Aloimunizacija D antigenom i anti-D antitijelo dokazani su kod nekih drugih tipova slabog antigena D, kao što su slabi D tip 4.2 [51,76,208], (DAR) [51], tip 11 [51,76], tip 15 [51,76], tip 21 [211] i tip 57 [212].

Zbog prakse da je pojava neusaglašenih rezultata kod serološkog utvrđivanja parcijalnih ili slabih oblika antigena D česta u rutinskoj praksi, a može da se prevaziđe određivanjem *RHD* genotipa, kojim se obezbjeđuje preciznija analiza, stručnjaci Sjedinjenih Američkih Država predložili su algoritam testiranja za rješavanje seroloških rezultata slabih D fenotipova određivanjem *RHD* genotipa [92], koji je prikazan na Slici 8 u uvodnom poglavlju. Ovaj algoritam je opisan u poglavlju Ispitanici, materijali i metodi i primjenjen je u studiji koja je izvedena u Zavodu za transfuzisku medicinu Republike Srpske, a rezultati seroloških i molekularnih analiza varijanti antigena D u ispitivanoj populaciji davalaca krvi potvrđuju opravdanost njegove primjene.

Američka asocijacija banaka krvi i Koledž Američkih patologa оформили су Radnu grupu za *RHD* koja je pregledala objavljene i neobjavljene izvještaje, kako bi utvrdila da li slabi D tipovi 4.0 i 4.1 mogu da dobijaju RhD-pozitivnu krv bez posljedica od aloimunizacije. Ne postoje objavljeni radovi o dokazanim alo ili auto anti-D antitijelima kod osoba sa slabim D tip 4.1 u velikim studijama sprovedenim u Evropi [51,208] uprkos njihovoј učestalosti [51,69] i čestom transfuziološkom liječenju RhD-pozitivnim eritrocitima [213]. Radna grupa je analizirala objavljene podatke o osobama koje su imale slabi D tip 4.0 i stvorile anti-D antitijelo, od kojih su tri opisane u Njemačkoj [51], devet u Francuskoj [208], jedna u Tunisu [214] i tri u Sjedinjenim Američkim Državama [215]. Od 16 opisanih slučajeva u Evropi samo jedan pacijent je stvorio alo anti-D antitijelo [65], dok je preostalih 15 formiralo auto anti-D antitijelo. Zbog svega iznijetog Radna grupa je ograničila preporuke za primjenu RhD-pozitivne krvi isključivo osobama sa slabim D tipovima 1, 2 i 3 dok se ne prikupi više podataka.

Tokom izvođenja ove studije rađen je skrining antitijela svim davaocima krvi prilikom svakog davanja krvi, tehnikom indirektnog antiglobulinskog testa, kao i tipiziranim test eritrocitima za skrining antitijela davaocima, komercijalno pripremljenim, dostupnim na tržištu. Ni u jednom slučaju nije dokazano prisustvo anti-D antitijela kod ispitivanih davalaca sa varijantama antiga D, čak ni kod davaoca ženskog pola sa parcijalnim oblikom DNB. Obrazloženje se može naći u činjenici da je većina dokazanih tipova slabih D varijanti u ispitivanom uzorku davalaca krvi u Republici Srpskoj oni kod kojih se, na osnovu iznijetih podataka iz literature ne stvaraju alo i auto anti-D antitijelo.

Nema podataka da su primaoci krvi 7 RhD-negativnih osoba, C+/E+, koji su molekularnim metodama dokazani kao oblici slabog D (4-tipa 11, 2 tipa 1, 1 tipa 3) stvorili anti-D antitijelo kao reakciju na transfuziju ovih eritrocita. Razlog treba tražiti u činjenici da se u Zavodu za transfuzijsku medicinu Republike Srpske primjenjuje strategija da se krv RhD-negativnih davalaca, koji u fenotipu imaju Ci/ili E antigen primjenjuje isključivo D-pozitivnim osobama, odnosno, da se RhD-negativnim primaocima primjenjuje RhD-negativna krv fenotipa ccddee, kao što je preporučio i Internacionalni forum [182].

U Tabeli 21, Tabeli 22 i Tabeli 25 vide se distribucije krvnih grupa sistema ABO u odnosu na Rh fenotip, kao i tipova slabog D antiga u odnosu na Rh fenotip u ispitivanoj grupi od 85 davalaca koji imaju slabi D antigen. Uočava se da je najveći broj ispitanika krvne grupe A. Rh fenotipa CcDwee- njih 36, onda slijedi 25 osoba krvne grupe O, 14 ispitanika krvne grupe B i 4 krvne grupe AB, sa istim Rh fenotipom. Kao primaoci krvi, ove osobe bi trebalo da dobiju RhD-pozitivnu krv. Ukoliko se posmatraju rezultati prema molekularno određenim tipovima slabog D antiga, u Tabeli 26, 30 osoba tipa 1 i 50 osoba tipa 3, kao primaoci bi trebalo da dobiju D-pozitivnu krv, čime bi se čuvale rezerve uvijek dragocjene Rh-negativne krvi, a ako je riječ o osobama ženskog pola, njima bi bilo nepotrebno primjenjivati RhD zaštitu. Samo davalac ženskog pola sa fenotipom DNB bi trebalo da dobije RhD-negativnu krv, jer se radi o osobi sa parcijalnim oblikom antiga D, koja može da stvori anti-D antitijelo na epitope antiga koji joj nedostaju.

Ovom studijom su revidirana dosadašnja znanja i iskustva u određivanju RhD antigena serološkim metodama i *RHD* genotipizaciji. Dobijeni rezultati idu u prilog predlaganju selektivne integracije metode za molekulrnu tipizaciju *RHD* i *RHCE* gena u laboratorijsku praksu davaocima krvi i trudnicama, radi povećanja sigurnosti u testiranju i obezbjeđenju veće pouzdanosti rezultata prilikom određivanja RhD statusa. Tipovi 1 i 3 kao najčešći od mnogobrojnih varijanti slabog oblika RhD antigena ne stvaraju anti-D antitijelo poslije transfuzije D-pozitivne krvi ili trudnoće sa RhD-pozitivnim plodom. Zato selektivno molekularno testiranje RhD antigena ima klinički značaj, jer se utvrđivanjem tipova varijanti D antigena smanjuje nepotrebna primjena RhD imunoglobulina kod žena sa serološki slabo izraženim D antigenom i čuvaju rezerve RhD-negativnih jedinica krvi, koje bi se inače primijenile osobama sa weak D tipovima 1, 2, i 3. Uvođenje ovih laboratorijskih procedura u rutinski rad doprinijelo bi da se RhD-negativne osobe zaštite od nesmotrene aloimunizacije D antigenom poslije transfuzije RhD-pozitivnih eritrocita koji imaju slabo izražen antigen D, koji ne može da se dokaže standardnim serološkim tehnikama.

7.0 Zaključci

1. Kod svih od 85 ispitanih davalaca krvi, kojima je serološkim metodama dokazan slab oblik RhD antiga (weak RhD), molekularnom metodom je potvrđen neki od njegovih tipova, a kod jednog davaoca utvrđen je rijedak parcijalni oblik RhD antiga.
Zastupljenost registrovanih davalaca krvi u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci je 1,1%, za posmatrani period, od kojeg 20% čine osobe ženskog pola, što je duplo više u odnosu na posljednje prethodno ispitivanje;
2. U ispitanim uzorku davalaca krvi, od svih slabih oblika antiga RhD najčešći je slab oblik tip 3 (weak D tip 3), koga slijedi slab oblik tip 1 (weak D tip 1), a u jednom slučaju dokazan je rijedak tip DNB, što je u korelaciji sa rezultatima dobijenim u Hrvatskoj, kao i sa većinom drugih ispitanih naroda bijele rase;
3. Ni kod jednog davaoca krvi sa dokazanim slabim oblikom antiga D, nije dokazano anti-D antitijelo u serumu, ni prirodno, niti imuno, zato što dokazane varijante slabog D antiga tipova 3 i 1 ne stvaraju ni alo, niti auto anti-D antitijela;
4. Kod 9 (9,8%) od ukupno 92 ispitana RhD-negativna davaoca krvi, Rh fenotipova Ccddee, ccddEe, CCddee, molekularnim testiranjem utvrđeno je postojanje gena *RHD* i nekog od tipova slabih varijanti antiga D, što govori u prilog neophodnosti uvođenja rutinskog molekularnog ispitivanja prisustva gena *RHD* kod davalaca kojima serološkim metodama nije utvrđen RhD antigen, čime bi se spriječila primjena D-pozitivne krvi RhD-negativnim primaocima, kao i njihova imunizacija RhD antigenom;
5. Nijedan od RhD-negativnih primalaca nije stvorio anti-D antitijelo poslije primjene transfuzije RhD-negativne krvi, Rh fenotipova Ccddee i ccddEe, jer se krv sa ovim fenotipovima primjenjivala isključivo RhD-pozitivnim primaocima;
6. Rezultati sprovedenih ispitivanja pokazali su da je algoritam za serološko i molekularno dokazivanje RhD antiga, koji se primjenjuje u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci pouzdan, zahvaljujući primjeni savremenih stručnih preporuka, kvalitetnih reagenasa, preciznih metoda i automatizovane opreme;
7. Uvođenje metoda za molekularnu dijagnostiku tipova slabijih varijanti antiga D predstavlja osnov za razvoj Nacionalne laboratorije za imunohematologiju i imunogenetiku, gde će se razvijati i nestandardne tehnike za ispitivanje antiga i antitijela, iz domena serološke i molekularne imunohematologije;

8. Podaci o distribuciji varijanti antiga D imaju strateški značaj, jer se kao primaoci krvi, osobe sa slabim oblicima RhD antiga tipa 3 i 1, smatraju RhD-pozitivnima i mogu da dobiju RhD-pozitivnu krv, čime se čuvaju rezerve RhD-negativne krvi, a trudnice sa ovim RhD varijantama ne treba da dobijaju RhD imunoprofilaksu; pacijenti i trudnice sa nekim drugim tipovima varijanti antiga D tretiraju se kao RhD-negativni;
9. Uvođenje rutinskog molekularnog testiranja davalaca i trudnica sa serološki slabim oblikom D antiga i RhD-negativnih, koji imaju Ci/ili E u fenotipu u Nacionalnu laboratoriju za imunohematologiju i imunogenetiku, dovelo bi do uštete sredstava koja se izdvajaju za serološko određivanje krvnih grupa, jer se ono izvodi samo jednom, a ne kod svakog ispitivanja krvne grupe.

8.0 Literatura

1. Storry JR, Castilho G, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Cancun report. Vox Sanguinis 2014; 107: 90-6.
2. http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/Updates/Table_of_blood_group_antigens_within_systems_v5_151222.pdf.
3. Tormey CA, Fisk J, Stack G. Red blood cell alloantibody frequency, specificity, and properties in a population of male military veterans. Transfusion, 2008; 48: 209-76.
4. Thakral B, Saluja K, Sharma RR et al. Red cell alloimmunization in a transfused patient population: a study from a tertiary care hospital in north India. Hematology, 2008; 13:313-8.
5. Knight R. Fundamentals of Biomedical Science. Transfusion and Transplantation Science. Transfusion Science Consultant. Oxford, University Press, 2013.
6. Vichinsky EP. Current issues with blood transfusions in sickle cell disease. Seminars in hematology, 2001; 38:14-22.
7. Jovanović Srzentić S, Veljković D. Imunobiološki i klinički značaj krvnih grupa. Intra.Net Communication. Beograd, 2009.
8. Verduzco LA, Nathan DG. Sickle cell disease and stroke. Blood 2009; 114: 5117-25.
9. Spanos T, Karageorga M, Ladis V, et al. Red cell alloantibodies in patient with thalassemia. Vox Sanguinis 1990; 58: 50-5.
10. Natukunda B, Schonewille H, Ndugwa C, et al. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease patients in Uganda. Transfusion, 2010; 50: 20-5.
11. Srzentić Snežana, Djokić Milan, Bošković Darinka, Vučićević Zorica, Čalija Branko, Lazović Marija, et al. Anti- eritrocitna antitela u politransfundovanih obolelih od hematoloških oboljenja. Bilten za transfuziologiju 1994, 22(2): 35- 8.
12. Daniels G. Human Blood Groups, 3rd ed. Wiley Blackwell, 2013.
13. Hult A, Helberg A, Wester ES, et al. Blood group genotype analysis for the quality improvement of reagent test red blood cells. Vox Sang 2005; 88: 265-70.
14. Antić A, Stanojković Z. Automatizacija u pretransfuzijskim ispitivanjima. Bilt Transfuziol 2010; 56(1-2): 88-92.
15. Dovč-Drnovšek T., Klemenc P., Toplak N., Blejec T., Bricl I., Rožman P. Reliable Determination of Fetal RhD Status by RHD Genotyping from Maternal PlasmaTransfus Med Hemother. 2013 Feb; 40(1): 37-43. Published online 2013 Jan 3. doi: 10.1159/000345682.
16. Storry JR, Westhoff CM, Charles-Piere D, et al. DNA analysis for donor screening of Dombrock blood group antigens. Immunohematology 2003; 19: 73-6.
17. Ribeiro KR, Guarneri MH, da Costa DC, et al. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. Vox sanguinis 2009; 97:147-52.
18. Levine P, Burnham L, Katzin WM, Vogel P. The role of isoimmunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis. Am J Obstet Gynecol. 1941;42:925–937.

19. Mollison PL, Hughes-Jones NC, Lindsay M, Wessely J. Suppression of primary RH immunization by passively-administered antibody. Experiments in volunteers. *Vox Sang.* 1969;16:421–439. [\[PubMed\]](#)
20. Freda V, Gorman J, Pollack W. Rh factor: Prevention of isoimmunization and clinical trials in mothers. *Science.* 1966;151:828–830. [\[PubMed\]](#)
21. Ballas S, Clark MR, Mohandas N, et al. Red cell membranes and cation deficiency in Rhnull syndrome. *Blood.* 1984;63:1046–1055. [\[PubMed\]](#)
22. Bruce LJ, Ghosh S, King MJ, et al. Absence of CD47 in protein 4.2-deficient hereditary spherocytosis in man: an interaction between the Rh complex and the band 3 complex. *Blood.* 2002;100:1878–1885. [\[PubMed\]](#)
23. Dahl KN, Parthasarathy R, Westhoff CM, Layton DM, Discher DE. Protein 4.2 is critical to CD47-membrane skeleton attachment in human red cells. *Blood.* 2004;103:1131–1136. [\[PubMed\]](#)
24. Nicolas V, Le Van Kim C, Gane P, et al. Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation. *J Biol Chem.* 2003;278:25526–25533. [\[PubMed\]](#)
25. 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. [\[PubMed\]](#)
26. 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. [\[PubMed\]](#)
27. Khademi S, O'Connell J, 3rd, Remis J, Robles-Colmenares Y, Miercke LJ, Stroud RM. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science.* 2004;305:1587–1594. [\[PubMed\]](#)
28. 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. [\[PubMed\]](#)
29. Liu Z, Chen Y, Mo R, et al. 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. [\[PubMed\]](#)
30. 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. [\[PubMed\]](#)
31. 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. [\[PubMed\]](#)
32. 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. [\[PubMed\]](#)

33. Westhoff C. The Structure and Function of the Rh antigen Complex. *Semin Hematol.* 2007 Jan; 44(1): 42–50. doi: [10.1053/j.seminhematol.2006.09.010](https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2006.09.010)
34. Wagner FF, Flegel WA. *RHCE* represents the ancestral *RH* position, while *RHD* is the duplicated gene. *Blood.* 2002 Mar 15;99(6):2272–2273. [PubMed]
35. Wagner FF, Flegel WA. *RHD* gene deletion occurred in the *Rhesus box*. *Blood.* 2000;95(12):3662–3668. [PubMed]
36. Blancher A, Apoil PA. Evolution of RH genes in hominoids: characterization of a gorilla RHCE-like gene. *J.Hered.* 2000 May;91(3):205–210. [PubMed].
37. Flegr J, Novotna M, Lindova J, Havlicek J. Neurophysiological effect of the Rh factor. Protective role of the RhD molecule against Toxoplasma-induced impairment of reaction times in women. *Neuro.Endocrinol.Lett.* 2008 Aug;29(4):475–481. [PubMed]
38. Hatfield JS. The genetic basis of hair whorl, handedness, and other phenotypes. *Med.Hypotheses.* 2006;66(4):708–714. [PubMed]
39. Flegel W. Molecular genetics and clinical applications for RH. Edited form as: *Transfus Apher Sci.* 2011 Feb; 44(1): 81–91. Published online 2011 Jan 28. doi: [10.1016/j.transci.2010.12.013](https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.12.013).
40. Westhoff C. The Structure and Function of the Rh antigen Complex. *Semin Hematol.* 2007 Jan; 44(1): 42–50. doi: [10.1053/j.seminhematol.2006.09.010](https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2006.09.010)
41. Westhoff CM. Review: the Rh blood group D antigen... dominant, diverse, difficult. *Immunohematology* 2005; 21: 155-63.
42. Marini AM, Unrestarazu A, Beauwens R, Andre B. The Rh (rhesus) blood group polypeptides are related to NH₄⁺ transporters. *Trends Biochem.Sci.* 1997 Dec;22(12):460–461. [PubMed]
43. Flegel WA, von Zabern I, Doescher A, Wagner FF, Strathmann KP, Geisen C, Palfi M, Pisacka M, Poole J, Polin H, et al. D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian D clusters. *Transfusion.* 2009 Jun;49(6):1059–1069. [PubMed]
44. Flegel WA, von Zabern I, Doescher A, Wagner FF, Vytiskova J, Pisacka M. DCS-1, DCS-2, and DFV share amino acid substitutions at the extracellular RhD protein vestibule. *Transfusion.* 2008 Jan;48(1):25–33. [PubMed]
45. Tippett P, Sanger R. Observations on subdivisions of the Rh antigen D. *Vox Sang.* 1962;7:9–13. [PubMed].
46. Daniels G. Human Blood Groups.2nd ed.Wiley-Blackwell, 2002.
47. Reid ME, Lomas-Francis C. The Blood Group Antigen Facts Book. 2 ed. San Diego: Academic Press; 2003.
48. Daniels G. Variants of RhD-current testing and clinical consequences. *Br J Haematol* 2013; 161: 461-7.
49. Lubenko A, Burslem SJ, Tandy J, Contreras M, Garner SF, Wiener E. ISBT monoclonal antibody workshop: report on group 3 (anti-Rh) antibodies. *Rev.Fr.Transfus.Immunohematol.* 1988 Apr;31(2):145–152. [PubMed]

50. Rouillac C, Colin Y, Hughes-Jones NC, Beolet M, D'Ambrosio AM, Cartron JP, Le Van KC. Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid Rh D-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. *Blood*. 1995 May 15;85(10):2937– 2944. [PubMed]
51. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*. 1999 Jan 1;93(1):385–393. [PubMed]
52. Gane P, Le Van Kim C, Bony V, El Nemer W, Mouro I, Nicolas V, Colin Y, Cartron JP. Flow cytometric analysis of the association between blood group-related proteins and the detergent-insoluble material of K562 cells and erythroid precursors. *Br.J.Haematol.* 2001 Jun;113(3):680–688. [PubMed]
53. Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Le Pennec P-Y, Roussel M, Patereau C, Noizat-Pirenne F. RHD variants in whites: consequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion*. 2004;44(9):1282–1286. [PubMed]
54. Denomme GA, Wagner FF, Fernandes BJ, Li W, 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(10):1554–1560. [PubMed]
55. Gassner C, Doescher A, Drnovsek TD, Rozman P, Eicher NI, Legler TJ, Lukin S, Garritsen H, Kleinrath T, Egger B, et al. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion*. 2005 Apr;45(4):527–538. [PubMed]
56. . Kamesaki T, Kumada M, Omi T, Okuda H, Iwamoto S, Takahashi J, Kimura K, Hirayama H, Kamata H, Obara K, et al. A novel mutation in the *RHD* gene in Japanese individuals with weak D, encoding an amino acid change in the 11th transmembranous domain of the RhD protein [Letter] *Vox Sang*. 2003;84:141. [PubMed]
57. Kormoczi GF, Forstemann E, Gabriel C, Mayr WR, Schonitzer D, Gassner C. Novel weak D types 31 and 32: adsorption-elution-supported D antigen analysis and comparison to prevalent weak D types. *Transfusion*. 2005 Oct;45(10):1574–1580. [PubMed]
58. Lin IL, Shih MC, Hsieh MH, Liu TC, Chang SE, Lin CL, Chang JG. Molecular basis of weak D in Taiwanese. *Ann.Hematol.* 2003 Oct;82(10):617–620. [PubMed]
59. Muller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schonitzer D, Schunter F, Gassner C. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion*. 2001 Jan;41(1):45–52. [PubMed]
60. Shao CP, Maas JH, Su YQ, Kohler M, Legler TJ. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang*. 2002 Aug;83(2):156–161. [PubMed]
61. Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Le Pennec P-Y, Roussel M, Patereau C, Noizat-Pirenne F. RHD variants in whites: consequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion*. 2004;44(9):1282–1286. [PubMed]

62. Hemker MB, Ligthart PC, Berger L, van Rhenen DJ, van der Schoot CE, Wijk PA. DAR, a new RhD variant involving exons 4, 5, and 7, often in linkage with ceAR, a new rhce variant frequently found in African blacks. *Blood*. 1999;94(12):4337–4342. [PubMed]
63. 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 Oct;11(5):383–388. [PubMed]
64. Hasekura H, Ota M, Ito S, Hasegawa Y, Ichinose A, Fukushima H, Ogata H. Flow cytometric studies of the D antigen of various Rh phenotypes with particular reference to Du and Del. *Transfusion*. 1990 Mar;30(3):236–238. [PubMed]
65. Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet.* 2001;2(1):10. [PMC free article] [PubMed]
66. Kim JY, Kim SY, Kim CA, Yon GS, Park SS. Molecular characterization of D- Korean persons: development of a diagnostic strategy. *Transfusion*. 2005 Mar;45(3):345–352. [PubMed]
67. Kormoczi 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 Oct;45(10):1561–1567. [PubMed]
68. Wagner T, Kormoczi GF, Buchta C, Vadon M, Lanzer G, Mayr WR, Legler TJ. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*. 2005 Apr;45(4):520–526. [PubMed]
69. Flegel WA, Gabriel C, Gassner W, Ruff H, Wagner FF. RHD genotyping of blood donors may avoid anti-D immunization. *Blood*. 2004;104(11):739a.
70. Flegel WA. Homing in on D antigen immunogenicity. *Transfusion*. 2005 Apr;45(4):466–468. [PubMed]
71. Daniels GL, Faas BH, Green CA, Smart E, Maaskant-van Wijk PA, Avent ND, Zondervan HA, von dem Borne AE, van der Schoot CE. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. *Transfusion*. 1998;38(10):951–958. [PubMed]
72. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Oлага EG, Hawthorne LM, Daniels G. 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(1):12–18. [PubMed]
73. Shao CP, Xiong W. A new hybrid RHD-positive, D antigen-negative allele. *Transfus.Med.* 2004 Apr;14(2):185–186. [PubMed]
74. Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*. 2005;45(10):1581–1584. [PubMed]
75. Luettringhaus TA, Cho D, Ryang DW, Flegel WA. An easy RHD genotyping strategy for D- East Asian persons applied to Korean blood donors. *Transfusion*. 2006 Dec;46(12):2128–2137. [PubMed]

76. Flegel WA. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. *Curr.Opin.Hematol.* 2006 Nov;13(6):476–483. [PubMed]
77. Shao CP. Transfusion of RhD-positive blood in "Asia type" DEL recipients. *N Engl J Med.* 2010 Feb 4;362(5):472–473. [PubMed]
78. Carritt B, Blunt T, Avent N, Daniels G, Steers F. Rh null phenotypes are not due to a gross deletion and can occur on different Rh genetic backgrounds. *Ann.Hum.Genet.* 1993 Oct;57(Pt 4):273–279. [PubMed]
79. Kato-Yamazaki M, Okuda H, Kawano M, Omi T, Iwamoto T, Ishimori T, Hasekura H, Kajii E. Molecular genetic analysis of the Japanese amorph rh(null) phenotype. *Transfusion.* 2000 May;40(5):617–618. [PubMed]
80. Huang CH. The human Rh50 glycoprotein gene. Structural organization and associated splicing defect resulting in Rh(null) disease. *J.Biol.Chem.* 1998 Jan 23;273(4):2207–2213. [PubMed]
81. Denomme GA, Ryan G, Seaward PG, Kelly EN, Fernandes BJ. Maternal ABO-mismatched blood for intrauterine transfusion of severe hemolytic disease of the newborn due to anti-Rh17. *Transfusion.* 2004 Sep;44(9):1357–1360. [PubMed]
82. Wagner FF, Ladewig B, Angert KS, Heymann GA, Eicher NI, Flegel WA. The DAU allele cluster of the RHD gene. *Blood.* 2002 Jul 1;100(1):306–311. [PubMed]
83. Flegel WA, von Zabern I, Doescher A, Wagner FF, Strathmann KP, Geisen C, Palfi M, Pisacka M, Poole J, Polin H, et al. D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian D clusters. *Transfusion.* 2009 Jun;49(6):1059–1069. [PubMed]
84. Denomme GA, Dake LR, Vilensky D, Ramyar L, Judd WJ. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion* 2008;48:473-77.
85. Beck ML, Harding J. Incidence of D category VI among Du donors in the USA. *Transfusion.* 1991;31(S):25.
86. Lacey PA, Caskey CR, Werner DJ, Moulds JJ. Fatal hemolytic disease of a newborn due to anti-D in an Rh-positive Du variant mother. *Transfusion.* 1983;23:91–94. [PubMed]
87. Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM, editors. Technical Manual. 18th ed. Bethesda (MD): American Association of Blood Banks; 2014.
88. Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. *Transfusion.* 2005;45:1581–1584. [PubMed]
89. Wagner FF, Ladewig B, Flegel WA. The RHCE allele ceRT: D epitope 6 expression does not require D-specific amino acids. *Transfusion.* 2003;43:1248–1254. [PubMed]
90. Chen Q, Hustinx H, Flegel WA. The RHCE allele ceSL: the second example for D antigen expression without D-specific amino acids. *Transfusion.* 2006;46:766–772. [PubMed]

91. Beckers EA, Porcelijn L, Ligthart P, et al. The RoHar antigenic complex is associated with a limited number of D epitopes and alloanti-D production: a study of three unrelated persons and their families. *Transfusion*. 1996;36:104–108. [PubMed]
92. Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CMdenomme GA., delaney ., Keller M., Johnson ST., KatZ L., Queenan JT., VassalloRR., Simon CD. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion* 2015; 55(3):680–9.
93. Johnson S. Partial D& Weak D Picking up the Rhesus pieces.Heart of America Association of Blood Banks, 2012.
94. Joana Maira Valentini Zacarias, Elizangela Mendes de Figueiredo Pereira, Jeane Eliete Laguila Visentainer, Gláucia Andréia Soares Guelsin, Fabiano Cavalcante de Melo, Ana Maria Sell. Frequency of RHD variants in Brazilian blood donors from Parana State, Southern Brazil. *Transfusion and Apheresis Science*, 2016.
95. Mota M., Fonseca NL., Rodrigues A., Kutner JM., Castilho L. Anti-D alloimmunisation by weak D type 1red blood cells with a very lowantigen density. *Transfusion* 2008;88:130-5.
96. Flegel WA, Wagner FF, Müller TH, Gassner C. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transf Med*. 1998;8:281–302. [PubMed]
97. Nagl L. IMPROVING THE DETECTION OF DONATIONS WITHIN THE RHD NEGATIVE BLOOD DONOR PANEL WHICH WEAKLYEXPRESS THE RHD ANTIGEN.School of Biomedical Sciences Queensland University of Technology. Institute of Health and Biomedical Innovation, QUT Research and Development Division, Australian Red Cross Blood Service Submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Master of Applied Science (Research), 2014.
98. Anstee DJ. Goodbye to agglutination and all that? *Transfusion*. 2005 May;45(5):652–653. [PubMed]
99. Avent ND. High variability of the RH locus in different ethnic backgrounds. *Transfusion*. 2005 Mar;45(3):293–294. [PubMed]
100. Beiboer SH, Wieringa-Jelsma T, Maaskant-van Wijk PA, van der Schoot CE, van Zwieten R, Roos D, den Dunnen JT, de Haas M. Rapid genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. *Transfusion*. 2005 May;45(5):667–679. [PubMed]
101. Denomme GA, Van Oene M. High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion*. 2005 May;45(5):660–666. [PubMed]
102. Hashmi G, Shariff T, Seul M, Vissavajjhala P, Hue-Roye K, Charles-Pierre D, Lomas-Francis C, Chaudhuri A, Reid ME. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion*. 2005 May;45(5):680–688. [PubMed]

103. Flegel WA. Mannheim: DRK-Blutspendedienst Baden-Wurttemberg - Hessen; 2004. BloodGen consortium members, the future of blood grouping: mass genotyping for blood groups and beyond. <http://www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/SympDGTI20>
104. Singleton BK, Green CA, Avent ND, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*. 2000;95:12–18. [PubMed]
105. Chiu RW, Murphy MF, Fidler C, Zee BC, Wainscoat JS, Lo YM. Determination of RhD zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach. *Clin Chem*. 2001;47:667–672. [PubMed]
106. Denomme GA, Flegel WA. Applying molecular immunohematology discoveries to standards of practice in blood banks: now is the time. *Transfusion*. 2008 Nov;48(11):2461–2475. [PubMed]
107. The graphic appearance of The Rhesus Site, when visitors access its URL (www.uni-ulm.de/wflegel/RH/). Beneath the heading and a horizontal bar, the first section has links to 4 major areas of scientific research in the Rh blood group system.
108. Cannon M, Pierce R, Taber EB, Schucker J. Fatal hydrops fetalis caused by anti-D in a mother with partial D. *Obstet.Gynecol*. 2003 Nov;102(5 Pt 2):1143–1145. [PubMed]
109. Lurie S, Rotmensch S, Glezerman M. Prenatal management of women who have partial Rh (D) antigen. *Br.J.Obstet.Gynaecol*. 2001 Sep;108(9):895–897. [PubMed]
110. Flegel WA, Wagner FF. Molecular genetics of *RH*. *Vox Sang*. 2000;78 Suppl 2:109–115. [PubMed]
111. Bianchi DW, Avent ND, Costa JM, van der Schoot CE. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal Rhesus D: ready for prime(r) time. *Obstet.Gynecol*. 2005 Oct;106(4):841–844. [PubMed]
112. Daniels G, Finning K, Martin P, Soothill P. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang*. 2004 Nov;87(4):225–232. [PubMed]
113. Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, dem Borne AE, van der Schoot CE. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet*. 1998 Oct 10;352(9135):1196. [PubMed]
114. Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PMK, Redman CWG, Wainscoat JS. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N.Engl.J.Med*. 1998;339(24):1734–1738. [PubMed]
115. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo KW, Huang DW, Lo YM. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin.Chem*. 2004 Jan;50(1):88–92. [PubMed]

116. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin.Chem.* 2004 Jun;50(6):1002–1011. [PubMed]
117. Finning K, Martin P, Daniels G. A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2004 Jun;1022:119–123. 119-23. [PubMed]
118. Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal *RHD* genotyping service. *Transfusion.* 2002 Aug;42(8):1079–1085. [PubMed]
119. Legler TJ, Lynen R, Maas JH, Pindur G, Kulenkampff D, Suren A, Osmers R, Kohler M. Prediction of fetal Rh D and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. *Transfus.Apher.Sci.* 2002 Dec;27(3):217–223. [PubMed]
120. Rijnders RJ, Christiaens GC, de Haas M, van der Schoot CE. [Fetal DNA in maternal blood] *Ned.Tijdschr.Geneeskfd.* 2004 Jan 24;148(4):170–174. [PubMed]
121. Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R, Baulard C, Metral S, Le Van KC, Cartron JP, Colin Y, Brossard Y. Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women. *Mol.Diagn.* 2004;8(1):23–31. [PubMed]
122. Wagner F, Flegel WA. The Rhesus Site. *Transfus Med Hemother.* 2014 Oct; 41(5): 357–363. Published online 2014 Sep 15. doi: 10.1159/000366176
123. Čičković R. Popis stanovništva, domaćinstava i stanova u Republici Srpskoj 2013. Izdavač: Republički zavod za statistiku Republike Srpske, 2013.
124. Tijanić N, Jovanović- Srzentić S, Đokić M. Značaj laboratorijskih analiza u prenatalnoj zaštiti. *Bilt transfuziol* 1996; 42(1): 11–3.
125. Stansby D, Williamson L, Jones H, Cohen H. 6 Years of SHOT reporting—its influence on UK safety. *Transfusion and Apheresis Science* 2004; 31:123–31.
126. Dlinden JV, Paul B, Dresser KP. A report of 104 transfusion errors in New York State. *Transfusion* 1992; 32:601–4.
127. Sazama K. 355 reports of transfusion—associated death. *Transfusion* 1990; 30:583.
128. British Committe for Standards in Haematology. Guidelines for blood grouping and red cell antibody testing during pregnancy. *Transfus Med* 996;6:71–4.
129. British Committe for Standards in Haematology. Addendum for guidelines for blood grouping and red cell antibody testing during pregnancy. *Transfusion Medicine* 1999;9:99.
130. British Committe for Standards in Haematology. Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Transfus Med* 2004;14:59–73.
131. Voak D. The status of new methods for detection of red cell agglutination. *Transfusion* 1999; 39:1037:40.

132. Veljković D. Određivanje antiga i antitela eritrocitnih krvnogrupnih sistema mikrometodom aglutinacije u gelu. Magistarska teza, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1992.
133. Bromilow IM, Adams KE, Hope J, Egginton J, Duguid JKM. Evaluation of the ID-gel test antibody screening and identification. *Transf Med* 1991; 1:159–61.
134. Langston MM, Procter JL, Cipolone KM, Stroncek DF. Evaluation of the gel system for ABO grouping and D typing. *Transfusion* 1999; 39:300–5.
135. Eichler H, Boehler A, Hastka J, Richter E, Kerowgan M, Goldman SF. Microcolumn affinity test and gel test: comparative study of two techniques for red cell antibody screening. *Vox Sang* 1999; 77:154–8.
136. Andresen HO, Sprogøe-Jacobsen U, Kristensen T. Antibody identification—a comparison of two column agglutination techniques. *Vox Sang* 2000; 78(Suppl):22.
137. Rožman P, Šalinović UV. (Editors). 10 Years of Using Gel Agglutination Method for Transfusion Testing in Slovenia. Maribor: Mediapront d.o.o, 2006.
138. Knowles SM, Milkins EC, Chapman JF, Scoot M. The United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (Blood Transfusion Laboratory Practice): trends in proficiency and practice between 1985 and 2000. *Transfus Med* 2002;12:11–23.
139. Scott LM. The principles and applications of solid phase blood grouping serology. *Transf Med Rev* 1991;1:60–72.
140. Lai M, Mavilla G, d'Onofrio G, Leone G. Detection of weak D with fully automated solid-phase red cell adherence syste. *Transfusion* 2005; 45:689–93.
141. Sandler SG, Langeberg A, Rumsey DH, Novak SC. A solid phase and microplate hemagglutination method for pretransfusion compatibility testing. *Haematologia* 2000; 30:149–57.
142. Moore HH, Conradie JD. Solid phase indirect anti-human globulin test for identification of red blood cell antibodies in human sera. *Transfusion* 1982; 22:540–3.
143. Chung A, Birch P, Ilagan K. A microplate system for ABO and RhD blood Transfusion 1993; 33: 384–8.
144. Sevens ML, Schoeppener SL, Cozart MJ, Friedman LI, Schanfield MS. Automated determination of ABO/Rh in microplates. *Vox Sang* 1984; 47:293–6.
145. Judd J, Johnson S, Storry J. Judd's methods methods in immuhematology. 3rd ed. Bethesda, MD: AABB, 2008.
146. Price TH, ed. Standards for blood bankd and tranfusion services. 29th ed. Bethesda, MD: AABB, 2014.
147. Roback J, Combs MR, Grossman B, Hillyer, eds. Technical manual. 17th ed. Bethesda, MD: AABB, 2012.
148. Đokić M, Budišin Ž. Praktikum odabranih poglavlja iz transfuziologije. ITKS, Beograd, 1999.
149. Low B, Messeter L. Antiglobulin tests in lowionic strength salt solutions for rapid antibody screening and crossmatching. *Vox Sang* 1974;26: 53-61.ID-card

150. Liss/Coombs. Indirektni i direktni antiglobulinski test. Diamed GmbH, Switzerland(box insert).
151. Lapierre Y, Rigal D, Adam J, et al. The gel test: A new way to detect RBC antigen-antibodyreactions. Transfusion 1990; 30: 109-13.
152. Rudman SV, ed. Serologic problem solving: A systematic approach for improved practice.Bethesda, MD: AABB, 2005.
153. Judd WJ. Antibody elution from red cells. In: BellCA, ed. Seminar on antigen- antibody reactionsrevisited. Arlington, VA: AABB, 1982: 175-221.
154. Domen RE, Grattan J. Efficacy of performing red-cell antibody elutions in patients with a positive direct antiglobulin test. Vox Sang 1986; 51(4): 324-6.
155. Yazer MH, Triulzi DJ. The role of the elution in antibody investigations. Transfusion 2009;49(11): 2395-9.
156. Potvrđni test za negativne i/ili slabo pozitivne reakcije sa anti-D metodom u gelu [box insert B007531 02.13, BioRad, Switzerland].
157. Robb JS an Allan JC. (2005). Evaluation of a New Kit for the Identification of partial RhD Types by Heamagglutination. Transfusion medicine, 15, supplement 1: p51.
158. Potvrđni test za negativne i/ili slabo pozitivne reakcije sa anti-D[Box insertB110001 05 15BioRad].
159. Monoklonski test reagensi za određivanje ABO/RhD krvne grupe na mikropločama [Box insert 110001 05.15 BioRad].
160. Mikroploče sa liofilizovanim monoklonskim antitelima, spremnim za upotrebu, za ABO/RhD [Box insert B110003 10.13BioRad]
161. Mikroploče sa antitelima u suvom stanju, spremne za upotrebu, za određivanje fenotipova Rh i Kell [B110004 10.13BioRad].
162. Test za kiselu eluciju antieritrocitnih antitela [Box insert B108200 05.10 BioRad].
163. Techno Twin Station User manual V1.2-05/2013.
164. Marsh WL. Scoring of hemagglutinationreactions. Transfusion 1972; 12: 352-3.
165. Jovanović Srzentić S., Antić A., Radonjić Z. Imunohematološka dijagnostika aloimunizacija u trudnoći. Izdavač: Udruženje transfuziologa Srbije. Caligraf Soft, 2016.
166. Williams M, Boam S, Maley M, Nightingale MJ, Ash C, Fanning K: Assessment and Validation of Fluogene System for GenotypingPatients Referred to RCI Laboratories, Transfusion Medicine, 2014, 24, Suppl. 2, 33–75, P101.
167. Newton CR, Graham A, Heptinstall E, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Research 1989;17:2503-2516..
168. RBC-Fluogene, Instructions for use, version 2.5, Inno-train Diagnostik, Germany.

169. Kryndushkin DS, Alexandrov IM, Ter-Avanesyan MD, Kushnirov VV (2003). "Yeast [PSI+] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104". *Journal of Biological Chemistry*. 278 (49): 49636–43.
170. Alistair M. Stephen; Glyn O. Phillips, eds. (2006). *Food Polysaccharides and Their Applications*. CRC Press. p. 226.
171. Schwartz DC, Koval M (1989). "Conformational dynamics of individual DNA molecules during gel electrophoresis". *Nature*. 338 (6215): 520–2..
172. McConnell S, Syme L, Lockhart SD, Turner D: FluoGene HLA Typing for deceased donors, *Tissue Antigens* 2014, 84:5-164, P148.
173. Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 (16): 7276–7280.
174. Joseph Sambrook & David W. Russel (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
175. http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cel_l_Immunogenetics_and/Updates/Table_of_blood_group_antigens_within_systems_v5_151222.pdf.
176. Filbey D, Hanson U, Wesstrom G. The prevalence of red cell antibodies in pregnancy correlated to the outcome of the newborn:a 12 year study in central Sweden. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 1995;74:687–92.
177. Whitfield CR, Raafat A, Urbaniak SJ. Underreporting of mortality from RhD haemolytic disease in Scotland and its implications: retrospective review. *BMJ* 1997;315:1504–5.
178. Avent ND, Martinez A, Flegel WA, Olsson ML, Scott ML, Nogues N, et al. The Bloodgen Project of the European Union, 2003–2009. *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. 2009;36:162–7.
179. Flegel WA, von Zabern I, Wagner FF. Six years' experience performing RHD genotyping to confirm D-red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion* 2009;49:465–71.
180. Polin H, Danzer M, Hofer K, Gassner W, Gabriel C. Effective molecular RHD typing strategy for blood donations. *Transfusion* 2007;47:1350–5.
181. Polin H, Danzer M, Gaszner W, Broda D, St-Louis M, Proll J, et al. Identification of RHD alleles with the potential of anti-D immunization among seemingly D-blood donors in Upper Austria. *Transfusion* 2009;49:676–81.
182. Engelfriet C.P., Reesink H.W., Fontao-Wendel R., Kormoczi G.F., Mayr W.R., Panzer S. Testing for weak D. *Vox Sang*. 2006;90(2):140–153. [PubMed]
183. Data reported by WHO Global Database on Blood Safety, 2008 (updated: June 2011)

184. Bani M., Giussani B. Gender differences in giving blood: a review of the literature. *Blood Transfus.* 2010 Oct; 8(4): 278–287. doi: 10.2450/2010.0156-09.
185. Guzijan G. Distribucija klinički značajnih eritrocitnih antigena u populaciji davalaca krvi republike Srbije. Magistarski rad. Medicinski fakultet Univerziteta u Banja Luci, 2014.
186. Wiwanitkit V. Knowledge about blood donation among a sample of Thai university students. *Vox Sang.* 2002 Aug;83(2):97-99
187. Hossain GM, Anisuzzaman M, Begum A. Knowledge and attitude towards voluntary blood donation among Dhaka University students in Bangladesh. *East Afr Med J.* 1997 Sep;74(9):549-553.
188. Misje AH, Bosnes V, Heier HE. Gender differences in presentation rates, deferrals and return behaviour among Norwegian blood donors. *Vox Sang* 2010;98:e241–8.
189. Royse D, Doochin KE. Multi-gallon blood donors: who are they? *Transfusion* 2005;35:826–31.
190. Fernández-Montoya A, López-Berrio A, Luna del Castillo JD. How some attitudes, beliefs and motivations of Spanish blood donors evolve over time. *Vox Sang* 1998;74:140–7.
191. James RC, Matthews DE. Analysis of blood donor return behavior using survival regression methods. *Transfus Med* 1996;6:21–30.
192. Ringwald J, Lange N, Rabe C, et al. Why do some apheresis donors donate blood just once. *Vox Sang* 2007;93:354–62
193. Mallikarjuna S. Prevalence of ABO and Rhesus blood group among blood donors. Indian Journal of Public Health, Research and Development. 2011.
194. Giri P A, Yadav S, Parhar G S, Phalke D B. Frequency of ABO and Rhesus Blood Groups: A Study from a Rural Tertiary Care Teaching Hospital in India. *Int J Biol Med Res.* 2011; 2 (4):988–990.
195. Sharma R. Psychosocial profiling of blood donors and assessing source of awareness of blood donation through a blood donation camp at a medical college, Ahmadabad, Gujarat. *Asian Journal of Transfusion Science* 2011;5:183-4
196. Jovanović Srzentić S, Rodić I, Knežević M. The development of the program of voluntary blood donation promotion in students population of the University of Belgrade. Razvoj programa promocije dobrotoljnog davanja krvi u studenstkoj populaciji Univerziteta u Beogradu. *Vojnosanit Pregl* 2015; 72(6): 489–494.
197. Klein HG, Anstee DJ, The Rh blood group system (and LW) In: Klein HG, Anstee DJ. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 11th ed. Blackwell Publishing, 2007; p.163–208.
198. Lowe AD, Green SM, Voak D, et al. A human-human monoclonal anti-D by direct fusion with a lymphoblastoid line. *Vox Sang* 1986;51:212-6.

199. Jones J, Scott ML, Voak D. Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. *Transfus Med* 1995;5:171-84.
200. Jones J, Filbey D. Selection of monoclonal antibodies for the identification of D variants: ability to detect weak D and to split epD2, epD5 and epD6/7. *Vox Sang* 1996;70: 173-9.
201. Rodrigues, M.J., Rodrigues, F., Tilley, L., Poole, J., Chabert, T.&Sousa, G. (2006) Several new examples of weak D type 38 in the Portuguese population. *Transfusion*, 46(Suppl.), 141A–142A (*abstract*).
202. St-Louis M, Richard M, Cote M, Ethier C, Long A. Weak D type 42 cases found in individuals of European descent. *Immunohematology* 2011;27:20-24.
203. 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 Croatian population. *Transfusion Medicine* 2011, 21, 278–279.
204. McGann H, Wenk RE. Alloimmunization to the D antigen by a patient with weak type 21. *Immunohematology* 2010;26:27-29.
205. Wagner FF, Eicher NI, Jorgensen JR, et al. DNB: a partial D with anti-D frequent in Central Europe. *Blood* 2002; 100: 2253-56.
206. Jovanović Srzentić S, Dovč Drnovšek T, Rožman P, et al. DNB variant in a pregnant woman-first case report in Serbia. Abstract book. 5th Slovenian Congress of Transfusion Medicine. Hotel Park, Thermana Laško,Laško, April 7-9, 2016.
207. Wagner, F.F., Frohmajer, A., Ladewig, B., Eicher, N.I., Lonicer, C.B., Müller, T.H., Siegel, M.H.&Flegel, W.A.Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood* 2000, 95, 2699–2708.
208. Pham, B.-N., Roussel, M., Peyrard, T., Beolet, M., Jan-Lasserre, V., Gien, D., Ripaux, M., Bourgouin, S., Kappler-Gratias, S., Rouger, P.&Le Pennec, P.Y.Anti-D investigations in individuals expressing weak D type 1 or weak D type 2: allo- or autoantibodies? *Transfusion* 2011, 51, 2679–2685.
209. Cowley NM, Saul A, Hyland CA. RHD gene mutations and the weak D phenotype: an Australian blood donor study. *Vox Sang* 2000;79:251-252.
210. Krog GR, Clausen FB, Berkowicz A, et al. Is current serologic RhD typing of blood donors sufficient for avoiding immunization of recipient? *Transfusion* 2011;51:2278-2285.
211. McGann H, Wenk RE. Alloimmunization to the D antigen by a patient with weak D type 21. *Immunohematology* 2010; 26: 27-9.
212. Le Maréchal C, Guerry C, Benech C, et al. Identification of 12 novel RHD alleles in western France by denaturing highperformance liquid chromatography analysis. *Transfusion* 2007; 47: 858-63.
213. Yu X, Wagner FF, Witter B, et al. Outliers in RhD membrane integration are explained by variant RH haplotypes. *Transfusion* 2006;1343-51.

214. Ouchari M, Chakroun T, Abdelkefi S, et al. Anti-D- auto-immunization in a patient with weak D type 4.0. *Transfus Clin Biol* 2014;12:43-6.
215. Chou ST, Jackson T, Vege S, et al. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood* 2013;1062-71.

9.0 Prilozi

PRILOG 1.

Aleli Dw i DEL – preuzeto i adaptirano:
http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/redcells/blood_group_allele_terminology/allele_tables/weak_and_Del_Alleles_v2.01_10914.pdf

FENOTIP	Naziv alela	Oznaka naziva alela	Zamjena nukleotida	Zamjena aminokiselina	Broj egzona
Fenotip 1	RHD*01W.1 RHD*weak D tip 1	<i>RHD*809G</i>	809T>G	Val270Gly	6
Fenotip 1.1	RHD*01W.1.1 RHD*weak D tip 1.1	<i>RHD*52G, 809A</i>	52C>G 809G>A	Leu18Val Val270Gly	1,6
Fenotip 2	RHD*01W.2 RHD*weak D tip 2	<i>RHD*1154C</i>	1154 G>C	Gly385Ala	9
Fenotip 2.1	RHD*01W.2.1 RHD*weak D tip 2.1	<i>RHD*301T, 1154C</i>	301T>A 1154 G>C	Phe101Ile Gly385Ala	2 9
Fenotip 3	RHD*01W.3 RHD*weak D tip 3	<i>RHD*8G</i>	8C>G	Ser3Cys	1
Fenotip 4.0,4.1,4.2,4.2.2 weak partial	RHD*09.03, 04, 05 RHD*weak partial 4				
Fenotip 5	RHD*01W.5 RHD*weak D tip 5	<i>RHD*446A</i>	446C>A	Ala149Asp	3
Fenotip 6	RHD*01W.6 RHD*weak D tip 6	<i>RHD*29A</i>	29G>A	Arg10Gln	1
Fenotip 7	RHD*01W.7 RHD*weak D tip 7	<i>RHD*1016A</i>	1016G>A	Gly339Glu	7
Fenotip 8	RHD*01W.8 RHD*weak D tip 8	<i>RHD*919A</i>	919G>A	Gly307Arg	6
Fenotip 9	RHD*01W.9 RHD*weak D tip 9	<i>RHD*880C</i>	880G>C	Ala294Pro	6
Tip 10	RHD*01W.10 RHD*weak D tip 10	<i>RHD*1177C</i>	1177T>C	Trp393Arg	9
Fenotip 11 weak partial ili Del	RHD*11partial	<i>RHD*885T</i>	885G>T	Met295Ile	6
Fenotip 12	RHD*01W.12 RHD*weak D tip 12	<i>RHD*830A</i>	830G>A	Gly277Glu	6
Fenotip 13	RHD*01W.13 RHD*weak D tip 13	<i>RHD*826C</i>	826 G>C	Ala276Pro	6
Fenotip 14	RHD*01W.14 RHD*weak D tip 14	<i>RHD*544A, 594T, 602G</i>	544T>A 594A>T 602C>G	Ser182Thr Lys198Asn Thr201Arg	4
Fenotip 15 weak partial	partial RHD*15				
Fenotip 16	RHD*01W.16 RHD*weak D tip 16	<i>RHD*658C</i>	658T>C	Trp220Arg	5
Fenotip 17	RHD*01W.17 RHD*weak D tip 17	<i>RHD*340T</i>	340C>T	Arg114Trp	3
Fenotip 18	RHD*01W.18 RHD*weak D tip 18	<i>RHD*19T</i>	19C>T	Arg7Trp	1
Fenotip 19	RHD*01W.19 RHD*weak D tip 19	<i>RHD*611C</i>	611T>C	Ile204Thr	4
Fenotip 20	RHD*01W.20 RHD*weak D tip 20	<i>RHD*1250C</i>	1250T>C	Phe417Ser	10
Fenotip 21	RHD*21 partial				
Fenotip 22	RHD*01W.22	<i>RHD*1224C</i>	1224G>C	Trp408Cys	10

	RHD*weak D tip 22				
Fenotip 23	RHD*01W.23 RHD*weak D tip 23	<i>RHD*634T</i>	634G>T	Gly212Cys	4
Fenotip 24	RHD*01W.24 RHD*weak D tip 24	<i>RHD*1013C</i>	1013T>C	Leu338Pro	7
Fenotip 25	RHD*01W.25 RHD*weak D tip 25	<i>RHD*341A</i>	341G>A	Arg114Gln	3
Fenotip 26	RHD*01W.26 RHD*weak D tip 26	<i>RHD*26A</i>	26T>A	Val9Asp	1
Fenotip 27	RHD*01W.27 RHD*weak D tip 27	<i>RHD*661T</i>	661C>T	Pro221Ser	5
Fenotip 28	RHD*01W.28 RHD*weak D tip 28	<i>RHD*1152C</i>	1152A>C	Thr384Thr	8
Fenotip 29	RHD*01W.29 RHD*weak D tip 29	<i>RHD*178C, 201A, 203A, 594T, 667G, 744T, 957A, 1025C</i>	178A>C 201G>A 203G>A 594A>T 667T>G 744C>T 957G>A 1025T>C	Ile60Leu Ser68Asn Lys198Asn Phe223Val silent silent silent Ile342Thr	2,5,7
Fenotip 30	RHD*01W.30 RHD*weak D tip 30	<i>RHD*1018A, 1019T</i>	1018 G>A 1019 A>T	Glu340Met	7
Fenotip 31	RHD*01W.31 RHD*weak D tip 31	<i>RHD*17T</i>	17C>T	Leu6Pro	1
Fenotip 32	RHD*01W.32 RHD*weak D tip 32	<i>RHD*1121T</i>	1121A>T	Ile374Asn	8
Fenotip 33	RHD*01W.33 RHD*weak D tip 33	<i>RHD*520A</i>	520G>A	Val174Met	4
Fenotip 34	RHD*01W.34 RHD*weak D tip 34	<i>RHD*809A</i>	809T>A	Val270Glu	6
Fenotip 35	RHD*01W.35 RHD*weak D tip 35	<i>RHD*260A</i>	260G>A	Gly87Asp	2
Fenotip 36	RHD*01W.36 RHD*weak D tip 36	<i>RHD*842G</i>	842T>G	Val281Gly	6
Fenotip 37	RHD*01W.37 RHD*weak D tip 37	<i>RHD*399T</i>	399G>T	Lys133Asn	3
Fenotip 38	RHD*01W.38 RHD*weak D tip 38	<i>RHD*833A</i>	833G>A	Gly278Asp	6
Fenotip 39	RHD*01W.39 RHD*weak D tip 39	<i>RHD*1015A</i>	1015G>A	Gly339Arg	7
Fenotip 40	RHD*01W.40 RHD*weak D tip 40	<i>RHD*602G</i>	602C>G	Thr201Arg	4
Fenotip 41	RHD*01W.41 RHD*weak D tip 41	<i>RHD*1193T</i>	1193A>T	Glu398Val	9
Fenotip 42	RHD*01W.42 RHD*weak D tip 42	<i>RHD*1226T</i>	1226A>T	Lys409Met	9
Fenotip 43	RHD*01W.43 RHD*weak D tip 43	<i>RHD*605C</i>	605T>C	Ala202Val	4
Fenotip 44	RHD*01W.44 RHD*weak D tip 44	<i>RHD*728G</i>	728A>G	Tyr243Cys	5
Fenotip 45	RHD*01W.45 RHD*weak D tip 45	<i>RHD*1195A</i>	1195G>A	Ala399Thr	9
Fenotip 46	RHD*01W.46 RHD*weak D tip 46	<i>RHD*1221A</i>	1221C>A	Phe407Leu	9
Fenotip 47	RHD*01W.47 RHD*weak D tip 47	<i>RHD*340G</i>	340C>G	Arg114Gly	3
Fenotip 48	RHD*01W.48 RHD*weak D tip 48	<i>RHD*182T</i>	182G>T	Gly61Val	2

Fenotip 49	RHD*01W.49 RHD*weak D tip 49	<i>RHD*770T</i>	770C>T	Ser257Phe	5
Fenotip 50	RHD*01W.50 RHD*weak D tip 50	<i>RHD*727A</i>	727T>A	Tyr243Asn	5
Fenotip 51	RHD*01W.51 RHD*weak D tip 51	<i>RHD*594T, 602G</i>	594A>T 602C>G	Lys198Asn Thr201Arg	4
Fenotip 52	RHD*01W.52 RHD*weak D tip 52	<i>RHD*92C</i>	92T>C	Phe31Ser	1
Fenotip 53	RHD*01W.53 RHD*weak D tip 53	<i>RHD*740G</i>	740T>G	Val247Gly	5
Fenotip 54	RHD*01W.54 RHD*weak D tip 54	<i>RHD*365T</i>	365C>T	Ser122Leu	3
Fenotip 55	RHD*01W.55 RHD*weak D tip 55	<i>RHD*895G</i>	895C>G	Leu299Val	6
Fenotip 56	RHD*01W.56 RHD*weak D tip 56	<i>RHD*65A</i>	65C>A	Ala22Glu	1
Fenotip 57	RHD*01W.57 RHD*weak D tip 57	<i>RHD*640T</i>	640C>T	Leu214Phe	5
Fenotip 58	RHD*01W.58 RHD*weak D tip 58	<i>RHD*1006C</i>	1006G>C	Gly336Arg	7
Fenotip 59	RHD*01W.59 RHD*weak D tip 59	<i>RHD*1148C</i>	1148T>C	Leu383Pro	8
Fenotip 60	RHD*01W.60 RHD*weak D tip 60	<i>RHD* 1219- 1224 delecija</i>	1219-1224 del TTCTGG	Phe407, Trp408 del	9
Fenotip 61	RHD*01W.61 RHD*weak D tip 61	<i>RHD*28T</i>	28C>T	Arg10Trp	1
Fenotip 62	RHD*01W.62 RHD*weak D tip 62	<i>RHD*661A</i>	661C>A	Pro221Thr	5
Fenotip 63	RHD*01W.63 RHD*weak D tip 63	<i>RHD*758A</i>	758T>A	Ile253Asn	5
Fenotip 64	RHD*01W.64 RHD*weak D tip 64	<i>RHD*881T</i>	881C>T	Ala294Val	6
Fenotip 65	RHD*01W.65 RHD*weak D tip 65	<i>RHD*68A</i>	68C>A	Ala23Asp	1
Fenotip 66	RHD*01W.66 RHD*weak D tip 66	<i>RHD*916A</i>	916G>A	Val306Ile	6
Fenotip 67	RHD*01W.67 RHD*weak D tip 67	<i>RHD*722T</i>	722C>T	Thr241Ile	5
Fenotip 68	RHD*01W.68 RHD*weak D tip 68	<i>RHD*165C, 1213G</i>	165T>C 1213C>G	silent Gln405Glu	2,9
Fenotip 69	RHD*01W.69 RHD*weak D tip 69	<i>RHD*953A</i>	953G>A	Arg318Gln	7
Fenotip 70	RHD*01W.70 RHD*weak D tip 70	<i>RHD*1012G</i>	1012C>G	Leu338Val	7
Fenotip 71	RHD*01W.71 RHD*weak D tip 71	<i>RHD*29C</i>	29G>C	Arg10Pro	1
Fenotip 72	RHD*01W.72 RHD*weak D tip 72	<i>RHD*1212A</i>	1212C>A	Asp404Glu	9
Fenotip 73	RHD*01W.73 RHD*weak D tip 73	<i>RHD*1241T</i>	1241C>T	Ala414Val	10
Fenotip 74 RH: -12 (G)	RHD*01W.74 RHD*weak D tip 74	<i>RHD*D-CE(2)- D</i>	150T>C 178A>C 201G>A 203G>A 307T>C	CE egzon 2	2
Del	RHD*01EL.01 RHD*DEL1	<i>RHD*1227A</i>	1227G>A	Lys409Lys	9
Del	RHD*01EL.02 RHD*DEL2	<i>RHD*3A</i>	3G>A	Met1Ile	1

Del	RHD*01EL.03 RHD*DEL3	<i>RHD*53C</i>	53T>C	Leu18Pro	1
Del	RHD* RHD*DEL4	<i>RHD*147delA</i>	147delA	promena okvira čitanja	1
Del	RHD*205 RHD*DEL5	<i>RHD*IVS1+1G>A</i>	IVS1+1g>a	“splice site” Mutacija	Intron 1
Del ili Dweak	RHD*206 RHD*DEL6	<i>RHD*251C</i>	251T>C	Leu84Pro	2
Del ili Dweak	RHD*207 RHD*DEL7	<i>RHD*410A</i>	410C>A	Ala137E	3
Del	RHD*208 RHD*DEL8	<i>RHD*IVS3+1G>A</i>	IVS3+1g>a	“splice site” Mutacija	Intron 3
Del ili D neg.	RHD*209 RHD*DEL9	<i>RHD*IVS3+2T>A</i>	IVS3+2t>a	“splice site” Mutacija	Intron 3
Del	RHD* RHD*DEL10	<i>RHD*1222C</i>	1222T>C	Trp408Arg	9
Del	RHD*211 RHD*DEL11	<i>RHD*1252insT</i>	1252 insT	X418Leu 488 AA's	10
Del	RHD* RHD*DEL12	<i>RHD*458C</i>	458T>C	Leu153Pro	3

PRILOG 2.

Obrazac saglasnosti sa informacijom o pristanku na uzimanje uzorka krvi za molekularno ispitivanje varijanti antigena D

Klinički centar Banja Luka Telefon: +387 51 342 176

Naziv ispitivanja: „Molekularna dijagnostika varijanti slabijeg oblika antigena D u populaciji davalaca krvi Republike Srbije“

Ispitivač (istraživač): mr sc.med.dr Gordana Guzijan

Obrazac pristanaka za ispitane u klinickom istraživanju "Molekularna dijagnostika varijanti slabijeg oblika antigena D u populaciji davalaca krvi Republike Srbije"

Izjavljujem da sam upoznat/a sa svim aspektima učešća u istraživanju u okviru doktorske disertacije "Molekularna dijagnostika varijanti antigena D kod serološki slabije izraženih i negativnih formi u populaciji davalaca krvi Republike Srbije", koje će biti sprovedeno u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Banjoj Luci, sa ciljem sticanja novih saznanja o distribuciji eritrocitnih antigena, a posebno varijanti antigena D u populaciji Republike Srbije, kao i njihovim kliničkim primjenama. Upoznat/a sam sa činjenicom da će se meni u sklopu ovog istraživanja uraditi skrining i eventualna identifikacija antieritrocitnih antitijela, zato što sam primao/la transfuzije krvi, te postoji mogućnost da sam stvorio/stvorila antieritrocitna antitijela protiv antigena koje ne posjedujem. Biće mi uzet jedan uzorak venske krvi špricom u količini od od 5 ml i ova krv će biti korištena za navedene imunohematološke analize. U sklopu učešća u ovom istraživanju, koristiće se rezultati pretransfuzijskih testiranja i podaci o broju primljenih jedinica krvi iz istorije bolesti uzete iz Kliničkog centra u Banjoj Luci. Dajem saglasnost za ove postupke.

Potvrđujem da je moje sudjelovanje u ovom istraživanju dobrovoljno. Svi podaci dobiveni ovim ispitivanjem su povjerljivi i koristiće se isključivo u svrhu naučne publikacije. Ovi podaci se neće upotrebljavati radi ostvarivanja profita. Materijal se neće koristiti u svrhe genetičkog manipulisanja. Identitet osobe od koje se uzima uzorak se neće otkriti ni u jednom objavljenom izvještaju. Kao ispitnik ili njegov zastupnik mogu odbiti učešće ili se povući iz ovog istraživanja, kao i zabraniti upotrebu podataka u svako doba bez posljedica u pogledu zdravstvene zaštite. Omogućeno mi je da postavljam pitanja i na svako postavljeno pitanje sam dobio/la zadovoljavajući odgovor. Vrijednosti ovih nalaza i njihov klinički i drugi značaj će mi biti predviđeni ukoliko za to budem pokazivao interes. Znam da je davanje uzorka krvi za ovu studiju moj vlastiti izbor. Potvrđujem da sam primio kopiju ovog obrasca kao i da sam pročitao

Obavijest za ispitane u klinickom istraživanju: „Molekularna dijagnostika varijanti antigena D kod serološki slabije izraženih i negativnih formi u populaciji davalaca krvi Republike Srbije“

Ovaj obrazac je lično obrazložen i pružen od: -----, dana-----, u Banjoj Luci

Ime učesnika u istraživanju ili zastupnik

Datum -----

Potpis učesnika ili zastupnika u istraživanju -----

PRILOG 3.

SNPs i nomenklatura prema tabeli alela krvnih grupa Medunarodnog udruženja za transfuziju krvi, ISBT "Names for RH (ISBT 004) Blood Group Alleles v4.1", "Names for alleles encoding weak D phenotypes v4.0 170110", "Names for RHD (ISBT 004) negative null blood group alleles v3.1 170309" i "004 RHCE alleles v3.0 20160728"

(<http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>).

Prilagođeno prema tabeli uz RBC-Fluogene CDE kit, proizvođača *Inno-train Diagnostik, Njemačka*.

Reakcija	Pozicija jažice u ploči	Specifičnost	SNP	ISBT naziv alela	ISBT fenotip	RBC marker (boja)	Ic marker (boja)
c-1, c-2	F1, F3	C	201A 307C	RHCE*01 (RHCE*ce)/ RHCE*03 (RHCE*cE)	RH:4 (c)	2	3
C-1, C-2	G1, G3	C	i2-109 bp ins	RHCE*02 (RHCE*Ce)/ RHCE*04 (RHCE*CE)	RH:2 (C)	1	3
W-1, W-2	E1, E3	C ^W	(-132G) 122A>G	RHCE*02.08.01 (RHCE*Ce.08.01, RHCE*CeCW) RHCE*02.08.02 (RHCE*Ce.08.02, RHCE*CeNR)	RH:8 (C ^{W+})	2	3
e-1, e-2	F1, F3	E	676G (787A)	RHCE*01 (RHCE*ce)/ RHCE*02 (RHCE*Ce)	RH:5 (e)	1	3
E-1, E-2	G1, G3	E	676G>C (787A)	RHCE*03 (RHCE*cE)/ RHCE*04 (RHCE*CE)	RH:3 (E)	2	3

CE-733G	A3	RHCE-733G	733C>G (i5+170G)	RHCE*01.04.01/. 02/03 (RHCE*ce.04.01/. 02/03)/ RHCE*01.06.02/. 03 (RHCE*ce.06.02/. 03)/ RHCE*01.20.01/. 02/03/04/05/06/ .07/.08/.09/.10 (RHCE*ce.20.01/. 02/03/04/05/06/ .07/.08/.09/.10, RHCE*ceVS.01/.0 2/.03/.04/.05/.06/ .07/.08/.09/.10) RHCE*01.22 (RHCE*ce.22) RHCE*01.37 (RHCE*ce37) RHCE*02.04 (RHCE*ce.04) RHCE*02.30 (RHCE*ce.30) RHCE*03.03.02 (RHCE*cE.03. 02)	RH:10, -20 (V+wVS-)/ parcijalno e (RHCE*ceAR +697G)/ RHCE*ceAR+ 455A RHCE*ceAG. 02/03 parcijalno e, parcijalno c: RH:10,20 (V+VS+)/ RH:-10,20 (V- VS+)/ RH:20 (VS+)/ RH:48 (JAL+) e+ ^w c+ e+ parcijalnoC+ C+ e+ V+VS+ parcijalnoE	1	2
CE-1006T	H3	RHCE-1006T	(i6-159T) 1006G>T	RHCE*01.20.03 (RHCE*ce.20.03, RHCE*ceVS.03) RHCE*01.20.05 (RHCE*ce.20.05, RHCE*ceVS.05)	parcijalno c, parcijalno e, RH:-10, 20 (v- VS+) (RHCE*ceS	1	2
D-Ex1	D2	RHD ekson 1	-132A	RHD*01 ili RHD*01N.01	RH:1 (D) ili D -	1	3
D-Ex2	G2	RHD ekson 2	201G 307T			2	3
D-Ex3	F2	RHD ekson 3	455A			1	2
D-Ex4-1, D-Ex4-2	H2, E2,	RHD ekson 4	514A 602C			1	2
D-Ex5-1, D-Ex5-2	D2, A2	RHD ekson 5	676G 787G			2	3
D-Ex6	C2	RHD ekson 6	(826G) 916G			1	2
D-Ex7	B2	RHD ekson 7	1048G			1	2
D-Ex9	G2	RHD ekson 9	1193A			1	3
D-Ex10	A2	RHD ekson 10	+105A			1	3
D-psi-1, D-psi-2	E1, E3	RHDpsi	i3-37bp ins (602C)	RHD*08N.01 (RHD*Pseudogen e, RHD*Ψ)	D -	1	3

D-697A	A1	RHD-697A	697G>A (787G)	RHD*05.05 (RHD*DVA.05)/ RHD*10.04 (RHD*DAU4)	DV type 5/ DAU4	2	3
D-697C- 1, D-697C-2	D1, D3	RHD-697C	697G>C (787G)	RHD*05.01/.02/.0 3/.04/.06/.07/.08/ .09/.10 (RHD*DVA.1/.2/.3/ .4/.6/.7/.8/.9/.10) RHD*06.01/.02/.0 3.01/.04 (RHD*DVA.1/.2/.3 .4) RHD*09.02.00/.01 (RHD*DAR2.00/. 01) RHD*10.05/10.05. 01 (RHD*DAU5/DA U5.01) RHD*13.01/.02 (RHD*DBS1/2) RHD*14.01/.02 (RHD*DBT1/2) RHD*16.02 (RHD*DCS3) RHD*41 (RHD*DBU)	DV type 1/2/3/4/6/7/8/9/ 10 DVI type 1/2/3/4 DAR2 (DARE)/DAR 2.1 DAU5/5.1 DBS1/2 DBT1/2 DCS-3 DBU	2	3
D-DHMi- 1, D- DHMi-2	D1, D3	RHD-DHMi	848C>T (916G)	RHD*19 (RHD*DHMi)	DHMi	1	3
D-DNB	A1	RHD-DNB	(968C) 1063G>A	RHD*25 (RHD*DNB)	DNB	1	3
D-catVII- 1, D- catVII-2	C1, C3	RHD-catVII	(201G) 329T>C	RHD*07.01/.02 (RHD*DVI.1/.2)	DVII/DVII type 2	1	2
D-DAU- 1, D-DAU-2	B1, B3	RHD-DAU	1136C>T	RHD*10.00/.00.01 .00.02/.01/.02/.03/ .04/.05/.06/.07 (RHD*DAU0/0.0 1/0.02/1/2/3/4/5/6/ 7) RHD*01N.69	DAU0/0.01/0.0 2/1/2/3/4/5/6/7 D -	1	2

PRILOG 4.

SNPs i nomenklatura prema tabeli alela krvnih grupa Medunarodnog udruženja za transfuziju krvi, ISBT "Names for RH (ISBT 004) Blood Group Alleles v4.1", "Names for alleles encoding weak D phenotypes v4.0 170110", "Names for RHD (ISBT 004) negative null blood group alleles v3.1 170309" i "004 RHCE alleles v3.0 20160728" (<http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>).

Prilagođeno prema tabeli uz RBC-Fluogene D weak/variant kit,
proizvođača *Inno-train Diagnostik, Njemačka*.

Reakcija	Pozicija	Specifičnost	SNP	ISBT naziv alela	ISBT fenotip	RBC marker (boja)	Ic marker (boja)
Dwea_k_type_1-1.1	A2	weak_D_type_1	809T>G	RHD*0 1W.1/1. 1/1.2 (RHD* weakDt ype1/1. 1/1.2) RHD*6 2	Type1/1.1/1.2 DNT(V270G)	1	3
Dwea_k_type_1.1		weak_D_type_1.1	52C>G	RHD*0 1W.1.1 (RHD* weakDt ype1.1)	Type1.1	2	3
Dweak_type_2- 1,Dweak_type_# e_2-2	A1,B2	weak_D_type_2	1154G>C	RHD*0 1W.2/2. 1/2.2 (RHD* weakDt ype2/2. 1/2.2)	Type2/2.1/2.2	1	2
Dwea_k_type_3	B1	weak_D_type_3	8C>G	RHD*0 1W.3/3. 1 (RHD* weakDt ype3/3. 1)	Type3/3.1	1	2

Dwea k_type _4.2*	D2	weak_D_type 4.2.1/4.2.2	957G> A 1025T> C	RHD* 09.01/ 01.01/ 01.02(RHD* DAR/ DAR1 .01/1. .02) RHD* 09.02. 00/.01 (RHD *DAR 2.00/. 01)RH D*01 W.29(RHD* weak Dtype 29)	DAR(T203A) /DAR1.1/1.2 (weakD4.2.1/ 4.2.2) DAR2(DARE) /DAR2.1 Type29	1	2
-------------------------	----	----------------------------	---------------------------	--	---	---	---

Dweak_type_4-14**	C1	weak_D_type _4.0/4.1/ 4.2.1/4.2.2/D AR(weak_D_ type_4.2)/ 4.3/14	602C> G(514A)	RHD*0 9.01/01. 00/01.0 1/01.02/ 01.03(R HD*D AR/DA R1.00/1 .01/1.02 .01/03) RHD*0 9.02.00/ .01(RH D*DAR 2.00/.01)RHD* 09.03/.0 3.01 (RHD* DAR3/3 .01) RHD*0 9.04/.05 .06 (RHD* DAR4/5 /6) RHD*0 3.01/.06 .07 (RHD* DIIIa/D III.06/.0 7) RHD*0 1W.14 (RHD* weakDt ype14) RHD*0 1W.40/. 51 (RHD* weakDt ype40/5 1) RHD*0 1N.72	DAR(T203A) /DAR1/1.1/ 2/1.3 (weakD4.2/4. 2.1/4.2.2/4.2. 3) DAR2(DARE) /DAR2.1 DAR3/3.1(w eakpartialD4.0. 1/4.0) DAR4/5/6(w eakD4.1/4.3or Del/DAR(CE 2:V50V- S68N)) DIIIa/DIIItyp e6/7 Type14 Type40/51 RHDbnegative	1	2
-------------------	----	---	----------------------	--	--	---	---

				RHD*0 9.01/01. 00/01.0 1/01.02/ 01.03(R HD*D AR/DA R1.00/1 .01/1.02 /1.03) RHD*0 9.02.00/ .01(RH D*DAR 2.00/.01)RHD* 09.03/.0 3.01 (RHD* DAR3/3 .01) RHD*0 9.04/.05 .06 (RHD* DAR4/5 /6) RHD*0 3.01/.06 .07 (RHD* DIIIa/D III.06/.0 7) RHD*0 1W.40/. 51 (RHD* weakDt ype40/5 1) RHD*0	DAR(T203A) /DAR1/1.1/1. 2/1.3 (weakD4.2/4. 2.1/4.2.2/4.2. 3) DAR2(DARE 1 2)/DAR2.1 DAR3/3.1(we akpartialD4.0. 1/4.0) DAR4/5/6(we akD4.1/4.3or Del/DAR(CE 2:V50V- S68N)) DIIIa/DIIItyp e6/7 Type40/51 RHDnegative		
Dweak _type_ 4	C2	weak_D_type _4.0/4.1/ 4.2.1/4.2.2/D AR(weak_D_ type_4.2)/ 4.3	602C> G(544T)				

Dweak_type_5	D1	weak_D_type_5	446C>A	RHD*0 1W.5 (RHD* weakDtype5)	Type5	1	2
Dweak_type_11	E1	weak_D_type_11	885G>T	RHD*1 1 (RHD* weakpartial11)	Weakpartial11 (Del)	1	2
Dweak_type_15-1, Dweak_type_15-2	F1,E2	weak_D_type_15	845G>A	RHD*1 5 (RHD* weakpartial15)	WeakpartialType15	1	2
Dweak_type_17	F2	weak_D_type_17	340C>T	RHD*0 1W.17 (RHD* weakDtype17) RHD*1 0.08 (RHD* DAU8)	Type17 DAU8	1	2
Dweak_type_K_409K	G2	K409K	1227G>A	RHD*0 1EL.01/.36 (RHD* DEL1/3 6)	Del	1	2
Dweak_type_I_VS3-1,Dweak_type_IVS3-2	G1,H2	IVS3+1G>A	486+1G>A	RHD*0 1EL.08 (RHD* DEL8)	Del	1	2

PRILOG 5.

Tabela sa rezultatima reakcije aglutinacije uzoraka krvи davalaca koji su testirani sa anti-D test reagensima iz panela D-SCREEN

Rezultati reakcije uzoraka koji su testirani sa svih devet test seruma anti-D									
Broj uzorka	1 IgM	2 IgG	3 IgM	4 IgG	5 IgM	6 IgM	7 IgG	8 IgG	9 IgG
1. RHD 101	2+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
2. RHD 102	3+	3+	2+	3+	-	-	3+	4+	3+
3. RHD 103	2+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
4. RHD 104	-	3+	-	2+	-	-	2+	3+	3+
5. RHD 105	2+	3+	2+	3+	-	-	3+	3+	3+
6. RHD 106	-	3+	2+	3+	-	-	3+	3+	3+
7. RHD 107	3+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
8. RHD 108	-	3+	+	2+	-	-	2+	3+	+
9. RHD 109	-	3+	+	3+	-	-	3+	3+	3+
10.RHD 110	+	3+	2+	3+	-	-	3+	3+	3+
11.RHD 111	-	+	-	+	-	-	+	2+	2+
12.RHD 113	-	+	+	+	-	-	2+	2+	+
13.RHD 115	+	3+	2+	3+	-	-	3+	3+	3+
14.RHD 118	-	2+	+	3+	-	-	+	3+	2+
15.RHD 120	-	2+	-	+	-	-	2+	3+	+
16.RHD 122	2+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
17.RHD 123	2+	3+	2+	3+	-	-	3+	3+	3+
18.RHD 125	-	3+	+	3+	-	-	3+	4+	3+
19.RHD 130	+	2+	2+	2+	-	-	2+	2+	2+
20.RHD 131	-	3+	2+	3+	-	-	3+	3+	3+
21.RHD 137	4+	3+	4+	3+	2+	2+	3+	3+	3+
22.RHD 141	4+	4+	4+	4+	-	-	4+	4+	4+
23.RHD 142	4+	4+	4+	4+	-	-	4+	4+	4+
24.RHD 143	2+	3+	2+	3+	+	+	3+	3+	3+
25.RHD 145	2+	3+	2+	3+	-	-	3+	3+	3+
26.RHD 146	2+	4+	+	4+	+	+	4+	4+	3+
27.RHD 148	4+	4+	4+	4+	2+	+	4+	4+	4+
28.RHD	3+	3+	2+	3+	2+	2+	3+	3+	3+

149									
29.RHD									
150	+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
30.RHD									
151	2+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
31.RHD									
152	-	3+	2+	3+	-	-	3+	3+	3+
32.RHD									
159	2+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+

33.RHD 160	3+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
34.RHD 167	-	3+	2+	3+	-	-	3+	3+	3+
35.RHD 169	3+	3+	3+	3+	+	-	3+	3+	3+
36.RHD 170	3+	3+	4+	3+	2+	+	3+	3+	3+
37.RHD 171	+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
38.RHD 172	2+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
39.RHD 173	2+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
40.RHD 174	2+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	4+
41.RHD 175	3+	4+	3+	4+	-	-	4+	4+	4+
42.RHD 176	3+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
43.RHD 177	2+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
44.RHD 178	2+	2+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
45.RHD 179	-	3+	2+	3+	-	-	3+	3+	3+
46.RHD 180	2+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
47.RHD 181	2+	3+	3+	3+	+	-	3+	3+	3+
48.RHD 182	+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
49.RHD 183	3+	3+	4+	3+	-	-	3+	3+	3+
50.RHD 184	3+	3+	3+	3+	-	-	3+	4+	3+
51.RHD 185	2+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
52.RHD 186	+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
53.RHD 187	3+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
54.RHD 188	2+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+
55.RHD 189	3+	3+	3+	3+	-	-	3+	3+	3+

BIOGRAFIJA AUTORA

Gordana Guzijan je rođena 18.02.1961.godine u Banjoj Luci, gdje je završila osnovnu školu i Gimnaziju. Medicinski fakultet je završila 1988.god. u Banjoj Luci. Radni odnos je zasnovala u DZ Laktaši 1989.god. gdje je radila do 1991.god. kao ljekar opšte prakse. Nakon toga je radila u DZ Čelinac od 1991. do 1994. god. kao ljekar opšte prakse. U Klinički Centar Banja Luka je primljena na specijalizaciju iz transfuziologije 21.03.1994.god. u Zavod za transfuziju krvi. Specijalistički ispit je položila 26.12.1997.god. na Institutu za transfuziologiju Srbije – Beograd i stekla zvanje specijalista transfuziologije.

Na radno mjesto načelnika Zavoda za transfuziju krvi KC Banja Luka je raspoređena 15.05.2000.god. sve do 31.08.2008.god.

Od 01.09.2008.god. je obavljala dužnost v.d. direktora JU Zavoda za transfuzijsku medicinu RS, a od 30.01.2009.god. odlukom Vlade Republike Srpske je imenovana za direktora JZU Zavod za transfuzijsku medicinu Republike Srpske. Tu dužnost obavlja i danas.

Kao član radnih grupa Ministarstva zdravlja i socijalne zaštite Republike Srpske, učestvovala je u izradi „Zakona o transfuzijskoj medicini“, „Strategiji sigurne krvi u RS do 2015.“ i izradi podzakonskih dokumenata. Bila je zadužena za reorganizaciju transfuziološke službe u RS, za odvajanje u nacionalno koordinisanu službu, kao i za osnivanje Zavoda za transfuzijsku medicinu RS kao samostalne zdravstvene ustanove. Kao direktor Zavoda, nastojala je da u novoosnovanoj ustanovi standardizuje stručni rad u oblasti transfuzijske medicine, da se unaprijedi kvalitet rada, da se uvedu nove procedure i obezbijede dovoljne količine sigurne krvi za liječenje pacijenata u Republici Srpskoj. Ministarstvo zdravlja i socijalne zaštite Republike Srpske joj je dodijelilo titulu primarijusa 2009.god. Kao dugogodišnji predsjednik Sekcije transfuziologa RS, dala je svoj doprinos u stručnom usavršavanju kolega, organizovala je brojne stručne sastanke u RS, nosilac je brojnih radova na kongresima u zemlji i inostranstvu, učestvovala na brojnim edukacijama iz raznih oblasti transfuzijske medicine kao i za uvođenje sistema kvaliteta. Povelju Komore doktora medicine RS za organizaciju zdravstvene službe, dobila je 2010.god.

Postdiplomski studij na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci je upisala 2004.godine, a magistarski rad pod nazivom „Distribucija klinički značajnih eritrocitnih antigena u populaciji davalaca krvi Republike Srpske“ je odbranila 20.11.2014.god. i stekla naučno zvanje magistar medicinskih nauka.

Udata je i ima dvoje djec

Izjava 1

IZJAVA O AUTORSTVU

Izjavljujem

da je doktorska disertacija

Ovisnojem Univerzitetu Banjo Luci da moju doktorsku disertaciju predavanja

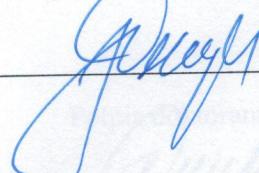
Molekularna dijagnostika varijanti slabijeg oblika antigena D u populaciji davalaca krvi Republike Srpske

Molecular diagnostic of weak D variants among the blood donor population of Republic of Srpska

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da doktorska disertacija, u cijelini ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci, _____

Potpis doktoranta



Izjava 2

Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci
da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom
**MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA VARIJANTI SLABIJEG OBЛИKA ANTIGENA D U
POPULACIJI DAVALACA KRVI REPUBLIKE SRPSKE**

koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

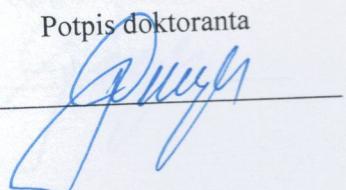
Doktorsku disertaciju sa svim prilozima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za
trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u
Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence
Kreativne zajednice (*Creative Commons*) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
- 4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima**
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

U Banjoj Luci,

Potpis doktoranta



Izjava 3

Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora **Gordana Guzijan**

Naslov rada **Molekularna dijagnostika varijanti slabijeg oblika antiga D u populaciji davalaca krvi Republike Srpske**

Mentor **Prof . dr Dragomir Marisavljević**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predala za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci, _____

Potpis doktoranta

