

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“

Медицински факултет, Скопје

Катедра за трансфузиологија



Проект: РЕТКИ КРВНИ ГРУПИ

(Елаборат)

Раководител на проект:

Татјана Макаровска Бојациева

Учесници:

Миленка Благоевска

Емилија Велкова

Кочо Димитровски

Елена Ристовска

Бојан Тодоровски

РЕТКИ КРВНИ ГРУПИ

Макаровска Бојадиева Т, Благоевска М, Велкова Е, Димитровски К, Ристовска Е, Годоровски Б, Ташковска М, Петковска Божиновска А.
Институт за трансфузиона медицина на РСМ, Медицински факултет, Скопје

Абстракт

Вовед. Крвнотрупните антигени се застапени со различна фреквенција во различни популации. Антигените кои се застапени со фреквенција <1% се наречени антигени со ниска фреквенција, а оние кои се застапени со >90% се наречени високо-фреквентни антигени. Поимот „ретка крвна група“ се дефинира според следниве критериуми: отсуство на високо-фреквентен антиген (< 1/1000) во рамките на општата популација (VeI-, k- или Lu^b-), отсуство на повеќе чести антигени во рамките на еден крвотрупен систем (D-c- или D+C+E+c-e-), отсуство на повеќе чести антигени во рамките на различни крвотрупни системи (O, e-, k-, Fy^b-, Jk^a-, s-).

Цел. Еритроцитна типизација на антигени од крвотрупните системи ABO, Rh (D, C, c, E, e), Kell (K, k, Kp^a, Kp^b), Duffy (Fy^a, Fy^b), Kidd (Jk^a, Jk^b) MNS (S, s) и Lutheran (Lu^a, Lu^b) и проценка на антигенската фреквенција со цел да се формира регистер на дарители со ретки крвни групи.

Материјал и методи. Кај 920 дарители на крв покрај рутинската типизација на антигените D, C, c, E, e, K со техника на директна аглутинација во микроплоча и употреба на моноклонални серуми, беше направена и проширена типизација на антигените Jk^a, Jk^b, k, Kp^a, Kp^b, Fy^a, Fy^b, S, s, Lu^a, и Lu^b со микроаглутинациска техника врз принцип на индиректна аглутинација со антихуман глобулин и употреба на поликлонални серуми. Фреквенциите на антигените и фенотиповите беа изразени во проценти.

Резултати. Фреквенцијата на антигените од Rh-системот изнесува: D (85.79%), C (71.7%), c (76.0%), E (26.0%) и e (97.95%). Најчест Rh-фенотип е DCcее (32.7%), а најредок е фенотипот ddCcEe (0.007%). Преваленцата на K и k антигенот од Kell системот изнесува 7.5% и 99.94%, соодветно. Реткиот фенотип Kell (K+k-) е застапен со 0.06%. За останатите клинички значајни антигени беше утврдена фреквенција од 1.1% (Kp^a), 100.0% (Kp^b), 60.3% (Jk^a), 76.2% (Jk^b), 65.5% (Fy^a), 79.5% (Fy^b), 59.8% (S), 86.5% (s), 7.2% (Lu^a) и 92.8% (Lu^b). Најголема фреквенција беше забележана за следните фенотипови: Jk(a+b+) со 41.5%, Fy(a+b+) со 48.5%, (S+s) со 46.3% и Lu(a-b+) со 92.8%. Од ретките null фенотипови, само Fy(a-b-) беше детектиран кај 0.21% од дарителите.

Заклучок. Вклучувањето на што поголем број дарители кои ќе бидат типизирани на повеќето клинички значајни еритроцитни антигени овозможува идентификација на ретки фенотипови и претставува основа за формирање на регистер на дарители со ретки крвни групи. Со тоа се овозможува навремено обезбедување на крв за потребите на пациентите со редок крвотрупен фенотип, како и за алоимунизираните пациенти кон високофреквентни антигени и за оние пациенти со мултипни антители кон два и повеќе чести антигени во рамките на ист или различни крвотрупни системи.

Клучни зборови: ретки крвни групи, дарители на крв, фреквенција на еритроцитни антигени, регистер на типизирани дарители

RARE BLOOD GROUPS

Makarovska Bojadjeva T, Blagoevska M, Velkova E, Dimitrovski K, Ristovska E, Todorovski B, Tashkovska M, Petkovska Bozinovska A.

Institute for transfusion medicine-Skopje, Medical faculty-Skopje, Republic of North Macedonia

Abstract

Background. Blood group antigen frequency differs among populations of different ethnic ancestry. The antigens which have an incidence of <1% are low-frequency antigens and those which have a frequency >90% are high-frequency antigens. The term rare blood group is defined upon the following criteria: absence of high-frequency antigen in general population (VeI-, k- или Lu^{b-}), absence of multiple frequent antigens within a single blood group system ((D-c- or D+C+E+c-e-), absence of multiple frequent antigens within different blood systems (O, e-, κ-, Fy^{b-}, Jk^{a-}, s-).

Aim. To perform red blood cell typing of the following systems: ABO, Rh (D, C, c, E, e), Kell (K, k, Kp^a, Kp^b), Duffy (Fy^a, Fy^b), Kidd (Jk^a, Jk^b) MNS (S, s) and Lutheran (Lu^a, Lu^b), as well as to calculate antigen and phenotype frequency in order to create register of rare blood group donors.

Material and Methods. In 920 blood donors apart from the routine ABO and Rh (D, C, c, E, e) and K antigen typization with monoclonal antisera in microplate (MP), extended typization for k, Kp^a, Kp^b, Fy^a, Fy^b, Jk^b, S, s, Lu^a, and Lu^b antigens was performed using polyclonal antisera employing Indirect Antiglobulin Test (IAT) and column agglutination mikrogel technique. Antigen and phenotype frequencies were expressed as percentages.

Results. Rh system antigen frequency is as follows: D (85.79%), C (71.7%), c (76.0%), E (26.0%) and e (97.95%). Most common Rh phenotype is DCcee (32.7%) while the rarest one is ddCcEe (0.007%). The prevalence of Kell antigens is 7.5% for K and 99.94% for k. The rare Kell phenotype (K+k-) is present in 21 (0.06%) blood donors. The estimated frequency of other clinically significant antigens was as follows: 1.1% (Kp^a), 100.0% (Kp^b), 60.3% (Jk^a), 76.2% (Jk^b), 65.5% (Fy^a), 79.5% (Fy^b), 59.8% (S), 86.5% (s), 7.2% (Lu^a) and 92.8% (Lu^b). Most frequent phenotypes were Jk(a+b+) with 41.5%, Fy(a+b+) with 48.5%, (S+ s+) with 46.3% and Lu(a-b+) with 92.8%. Rare null phenotyp Fy(a-b-) was detected in 0.21% of blood donors.

Conclusion. Large scale phenotyping of most clinically important blood group antigens enables identification of blood donors with rare blood groups. Data base for antigen frequency of various blood group systems in local donors helps to provide antigen negative compatible blood units for patients with rare blood groups, and for alloimmunized patients to high-frequency antigens, as well for the patients with multiple antibodies to frequent antigens within one or more blood group systems.

Key words: Rare blood group, blood donors, red cell antigen frequency, blood donor registry

Вовед

Крвните групи претставуваат молекули на еритроцитната мембрана со одреден биохемиски состав (олигосахариди врзани за гликопротеини и гликолипиди или аминокиселини од одреден протеин) кои се дефинирани со специфично антитело што укажува на фактот дека некои индивидуи не го поседуваат соодветниот антиген.

Терминот „крвна група” се однесува на одреден крвогрупен систем, кој се состои од еритроцитни антигени, чија специфичност е контролирана од серија гени кои може да бидат алели или се многу блиску поврзани на истиот хромозом.

Терминот „крвогрупен фенотип” се однесува на специфичен образец на реакција на антигените од одреден систем со соодветните тест-серуми.

Интернационалното здружение на крвната трансфузија (ISBT) ги класифицира досега познатите, повеќе од 340 еритроцитни антигени, во 38 крвогрупни системи. За продукција на овие антигени се одговорни 45 гени, од кои сите се секвенционирани, така што се познати полиморфизмите асоцирани со крвогрупните антигени. Повеќето полиморфизми настануваат како резултат на единечен нуклеотиден полиморфизам (Single nucleotid polymorphism-SNP), кој условува замена на една аминокиселина со друга кај одредена гликозилтрансфераза или кај екстрацелуларниот домен на одреден протеин во составот на еритроцитната мембрана. Гените за системите ABO, H, I, Lewis, Globoside и P кодираат гликозилтрансферази, а преостанатите гени кодираат протеини на еритроцитната мембрана. Така, секој крвогрупен систем претставува генетски посебен ентитет. Ph и MNS се најкомплексни крвогрупни системи, претставени со 50 и 46 антигени, а 13 крвогрупни системи се претставени само со по еден антиген [1, 2].

Табела 1. Крвогрупни системи според ISBT-класификацијата

Број/Име	Симбол	Број на антигени	Име на генот	Chr
001 ABO	ABO	4	<i>ABO</i>	9
002 MNS	MNS	49	<i>GYP A, GYP B, GYP E</i>	4
003 P1PK	P1PK	3	<i>A4GALT</i>	22
004 Rh	RH	55	<i>RHD, RHCE</i>	1
005 Lutheran	LU	25	<i>BCAM</i>	19
006 Kell	KEL	36	<i>KEL</i>	7
007 Lewis	LE	6	<i>FUT3</i>	19
008 Duffy	FY	5	<i>ACKR1</i>	1
009 Kidd	JK	3	<i>SLC14A1</i>	18
010 Diego	DI	22	<i>SLC4A1</i>	17
011 Yt	YT	5	<i>ACHE</i>	7
012 Xg	XG	2	<i>XG, MIC2</i>	X
013 Scianna	SC	7	<i>ERMAP</i>	1
014 Dombrock	DO	10	<i>ART4</i>	12
015 Colton	CO	4	<i>AQP1</i>	7
016 Landsteiner-Wiener	LW	3	<i>ICAM4</i>	19
017 Chido/Rogers	CH/RG	9	<i>C4A, C4B</i>	6
018 H	H	1	<i>FUT1</i>	19
019 Kx	XK	1	<i>XK</i>	X
020 Gerbich	GE	11	<i>GYP C</i>	2
021 Cromer	CROM	20	<i>CD55</i>	1

022 Knops	KN	9	<i>CR1</i>	1
023 Indian	IN	6	<i>CD44</i>	11
024 Ok	OK	3	<i>BSG</i>	19
025 Raph	RAPH	1	<i>CD151</i>	11
026 John Milton Hagen	JMH	6	<i>SEMA7A</i>	15
027 I	I	1	<i>GCNT2</i>	6
028 Globoside	GLOB	1	<i>B3GALNT1</i>	3
029 Gill	GIL	1	<i>AQP3</i>	9
30 Rh-врзан гликопротеин	RHAG	3	<i>RHAG</i>	6
031 FORS	FORS	1	<i>GBTGBT1</i>	9
032 JR	JR	1	<i>ABCG2</i>	4
033 LAN	LAN	1	<i>ABCB6</i>	2
034 Vel	VEL	1	<i>SMIM1</i>	1
035 CD59	CD59	1	<i>CD59</i>	11
036 Augustine	AUG	4	<i>SLC29A1</i>	6
037 KANNO	KANNO	1	<i>PRNP</i>	20
038 Sid	SID	1	<i>B4GALNT2</i>	17

Според биохемискиот состав крвнотрупните антигени може да бидат олигосахаридни, какви што се А, В и Н (АВО систем) и Lea, Leb (Lewis систем); антигените D, С, с, Е, е и Сw од Ph системот и антигените Јка и Јкб од Kidd системот се протеини; антигените М, N, S и s од MNS системот се сијалогликопротеини; антигените К, к, Јsa, Јsb, Кра и Крб од Kell системот, антигените Lua, Lub од Lutheran системот и антигените Fya, Fyb од Duffy системот се гликопротеини; P1 антигенот од P системот е гликолипид. Крвнотрупните антигени од системите Diego, Scianna, Dombrock, Colton, Chido/Rodgers се гликопротеини на еритроцитната мембрана [3, 4, 5]. Биолошкото и клиничкото значење на еритроцитните антигени е во зависност од биохемискиот состав, молекуларната структура и поставеноста во рамките на еритроцитната мембрана [6].

Биолошкото значење на крвнотрупните антигени произлегува од нивните бројни функции кои се важни како за вијабилноста на самите еритроцити, така и за организмот во целина. Функција на мембрански транспортери и јонски канали имаат антигенските системи Rh (за јони на амонијак), Kidd (за уреа) и Colton (за молекули на вода) [7,8,9,10]. Функција на рецептори и лиганди имаат системите Lewis (Leb е рецептор за *Helicobacter pylori*), P (Parvovirus B19), Duffy (*Plasmodium vivax*, IL-8), Knops (комплемент-рецептор) [11,12]. Како адхезивни молекули се познати антигенските комплекси Lutheran систем/В-САМ антиген-CD29, Landsteiner Wiener/ICAM-4 CD242, CD44 и др.) [13,14]. Основни протеини за структурниот интегритет на еритроцитната мембрана се протеините од Rh-системот и протеинот 3 [15,16]. Протеинот Kell се смета за дел од M13 цинк-ендопептидазите и го конвертира ендотелинот 3 во неговата биолошки активна форма, која има улога во регулацијата на васкуларниот тонус, како и во контрактибилноста и пролиферацијата на мазната мускулатура на крвните садови [17].

Имајќи ја предвид структурата и функцијата на еритроцитните антигени, податоците од литературата ја покажале поврзаноста на крвнотрупните антигени, а особено оние од АВО системот, со некои состојби и заболувања [18].

Крвнотрупниот систем АВО има големо влијание на хемостатскиот систем [19]. АВО-крвната група го детерминира плазматското ниво на von Willebrand (vWF), гликопротеин кој учествува во коагулацијата на крвта, кое е за 25-30% пониско кај крвната група О во однос на останатите крвни групи, при што не е утврдена поголема

склоност кон крвавење [20]. Кај индивидуите кои не се крвна група О утврден е зголемен ризик за артериски и венски тромбоемболизам, особено во зависност од одредениот АВО-генотип [21, 22]. АВ крвната група е поврзана со два пати поголем ризик за прееклампија [23]. Одредени студии укажуваат на поврзаноста на АВО системот со малигни заболувања [24]. Крвната група А е поврзана со зголемен ризик од карцином на желудникот и дебелото црево [25]. Крвната група О е асоцирана со помал ризик за карцином на панкреас [26]. В-антигенот е поврзан со зголемен ризик за оваријален карцином [27]. Во ретки случаи, индивидуи кои се крвна група А може да стекнат В-антиген и да станат АВ-крвна група. Во повеќето случаи, овој феномен се случува кај пациенти со заболувања на дигестивниот тракт, обично карцином на дебелото црево [28]. Кај некои малигни заболувања на крвта доаѓа до променета експресија на антигените од АВО системот. Слабењето на А-антигенот често се случува кај пациенти со дијагноза на акутна миелоидна леукемија. Помеѓу 17% и 37% од случаите со леукемија имаат значително пониска експресија на А, В и Н-антигените во споредба со здравата популација [29,30].

Се поголем број на студии укажуваат на поврзаноста на крвнотрупните антигени и склоноста кон инфекции. Индивидуите кои се О-крвна група се заштитени од тешка форма на маларија предизвикана од *plasmodium falciparum*, но крвната група О, сепак, не е почеста во ендемските подрачја за маларија. Се смета дека ова се должи на фактот што индивидуите со крвна група О имаат поголем ризик од колера предизвикана од *Vibrio cholerae* тип 01, додека индивидуите со АВ-крвна група се најмалку склони на инфекцијата [31, 32]. Исто така, голем број студии го потврдија модулаторниот ефект на антигените и антителата од АВО системот (заштитен ефект на крвната група О и присуство на природните анти-А антитела) во однос на инфекцијата со SARS-Cov-2 вирусот и тежината на клиничката слика на COVID-19 [33].

Одредени ретки крвнотрупни фенотипови, настанати како резултат на делеции или инактивиращки мутации во гените одговорни за синтеза на крвнотрупни антигени кои имаат функција на структурни мембрански протеини (Rh, Kx), се поврзани со појава на стоматоцитоза, акантоцитоза и хемолитичка анемија. Кај Rh-null фенотипот еритроцитите не експримираат Rh-антигени како резултат на хомозиготни инактивиращки мутации на *RHD* и *RHCE* или *RHAG*-гените [34]. Rh-null еритроцитите се морфолошки и функционално абнормални. Повеќето Rh-null индивидуи манифестираат одреден степен на хемолитичка анемија, која може да биде доволно изразена за да доведе до потреба од спленектомија. McLeod-синдромот, кој е поврзан со акантоцитоза и различни мускулни и невролошки дефекти, е многу редок. Се наследува преку X-хромозомот како резултат на инактивирачки мутации и делеции на *XK*-генот во хетерозиготна состојба, што доведува до отсуство на XK-протеин, носач на Kx-антигенот како единствен антиген на Kx-системот, кој е важен структурен протеин на еритроцитната мембрана [35]. Пациентите кои имаат редок null-фенотип, во случај на трансфузија, имаат потреба од дарител чии еритроцити го поседуваат истиот редок фенотип.

Клиничкото значење на еритроцитните антигени е поврзано со трансфузијата на крв, бременоста и трансплантацијата на ткива и органи. Имунолошкиот систем на примателот е предизвикан од крвни клетки кои се разликуваат од неговите во однос на различните антигенски системи (еритроцитни, леукоцитни, тромбоцитни антигени итн.) и одреден број приматели ќе создадат алоантитела. Инциденцата на алоимунизација кон еритроцитните антигени во светски рамки изнесува околу 2-10% и достигнува до 60% кај некои групи политрансфундирани пациенти [36]. Антителата кои најчесто се среќаваат имаат специфичност на E, K, Fya, Kidd, c и C. Пациентите со постојно алоантитело имаат 3-4 пати поголем ризик да создадат и други антитела. Клинички, еритроцитната

алоимунизација доведува до одложено трансфузиско лекување, хемолитички трансфузиски реакции (ХТР), хемолитичка болест на фетусот и новороденото и зголемен морбидитет при органската трансплантација. Хемолитичките трансфузиски реакции се меѓу најчестите причини кои доведуваат до непосредни животнoзагрозувачки настани поврзани со трансфузијата. Нивната инциденца во светски размери изнесува околу 1:4000-12000 единици крв [37].

Клиничкото значење на еритроцитните антигени се должи на нивниот имуноген потенцијал за создавање на алоантитела што особено доаѓа до израз кај пациентите кои се на хронична програма за еритроцитна трансфузија поради вродени или стекнати хематолошки заболувања, хронична бубрежна инсуфициенција, малигни заболувања и други политрансфундирани пациенти. Кај нив често се детектира едно или комплексна мешавина од специфични еритроцитни алоантитела, особено ако поседуваат редок крвнoгрупен фенотип.

Крвнoгрупните антигени се застапени со различна фреквенција во различни популации. Антигените кои се застапени со фреквенција <1% се наречени антигени со ниска фреквенција, а оние кои се застапени со >90% се наречени високо-фреквентни антигени [38]. Околу 160 од 340 крвнoгрупни антигени се со висока фреквенција, како на пример Cellano (k) антигенот чија фреквенција изнесува 99.8% [39]. За индивидуите кои не поседуваат k-антиген и го поседуваат неговиот алел, антигенот Kell (K), во хомозиготна форма (KK), се смета дека имаат ретка крвна група. Во случај на трансфузија, ваквите индивидуи треба да примат еритроцити кои не поседуваат k-антиген бидејќи е голема веројатноста еритроцитите дадени по случаен избор да поседуваат k-антиген и да доведат до создавање на анти-k антитела. Во отсуство на датотека на типизирани дарители (хомозиготи на K-антиген) пронаоѓањето на компатибилна крв за пациент со антитело кон високофреквентен антиген е долготраен процес што во голема мерка го отежнува трансфузиското лекување и го зголемува морбидитетот.

Поимот „ретка крвна група“ се дефинира според следниве критериуми:

1) отсуство на високо-фреквентен антиген (< 1/1000) во рамките на општата популација (Vel-, Lan-, k- или Lu^b-),

2) отсуство на повеќе чести антигени во рамките на еден крвнoгрупен систем (D-с- или D+C+E+c-e-),

3) отсуство на повеќе чести антигени во рамките на различни крвнoгрупни системи (O, e-, k-, Fy^b-, Jk^a-, s-) [40, 41],

4) присуство на т.н. null-фенотип кој се карактеризира со отсуство на дел или на сите еритроцитни антигени од одреден систем како последица на инактивиращки мутации на соодветните гени во хомозиготна состојба. Ваквите индивидуи создаваат вкрстено реактивни алоантитела кои реагираат со сите човечки еритроцити освен со оние кои го имаат истиот редок фенотип што во значителна мерка го отежнува обезбедувањето на компатибилна крв за трансфузија [42].

Rh-null фенотипот се смета за најретка крвна група која ја поседуваат околу 50 индивидуи ширум светот. За прв пат е откриена во 1961 година кај Аборицините во Австралија. Донациите на крв со овој фенотип потекнуваат од мала мрежа на редовни дарители со Rh-null фенотипот (регистрирани се 9 дарители) и се наменети за пациенти со истиот фенотип [43,44]. Еритроцитите на Rh-null индивидуи не поседуваат антигени од Rh системот. Како резултат на имунизација, тие може да создадат анти-Rh29 антитело кон епитопи заеднички за двата Rh-протеина (RhD и RhCE) кое реагира со сите човечки еритроцити освен со оние со Rh-null фенотип [42,45]. Ова антитело може да доведе до тешка хемолитичка трансфузиска реакција и хемолитичка болест на новороденото [46].

Kell-системот има null фенотип (Ko) кај кој ниеден од Kell-антигените не е присутен. Како резултат на трансфузија, Ko-индивидуите може да создадат анти-Ku антитело кое реагира со сите еритроцити освен со оние со Ko-фенотип и може да предизвика фатална хемолитичка трансфузиска реакција [47,48].

Кај реткиот McLeod-фенотип, во склоп на McLeod синдромот, антигените од Kell-системот се со многу слаба експресија, додека Km и Kx-антигенот се отсутни. Како резултат на трансфузија, пациентите со McLeod-синдром обично создаваат анти-Kx и анти-Km антитела поради што е практично невозможно да се најде компатибилен дарител [49].

Посебен пример за редок фенотип е т.н. Bombay-фенотип или Oh. Во општата популација е застапен со честота од 0.0004%, додека во некои делови од Индија честотата достига 0.01% или 1 на 10,000 жители [50]. Инактивациските мутации на генот FUT1 во хомозиготна форма се причина за отсуство на H-антиген кој е единствениот антиген на крвогрупниот систем H. Еритроцитите кои не поседуваат H-антиген, неопходен за формирање на A и/или B антиген, фенотипски се O-крвна група. На еритроцитите и во секретитите на индивидуите со Bombay (Oh) фенотип не се присутни H, A и B-антигени, додека во серумот се присутни природни анти-H, анти-A и анти-B антитела. Анти-H антителото е клинички значајно со потенцијал да предизвика силна ХТР [51]. Во случај на потреба од трансфузија, компатибилна крв со Oh-фенотип е тешко да се најде поради неговата ретка застапеност.

Воопштено, антителата кон високо-фреквентни антигени претставуваат проблем за трансфузијата на крв поради достапноста на компатибилна ретка крв. Анти-k, -Lan и анти-Vel се особено опасни антитела кои може да предизвикаат непосредна и тешка хемолитичка трансфузиска реакција [6].

Со цел да се обезбеди крв за потребите на пациентите со ретки крвни групи, во 1965 година, по препорака на ISBT, Светската здравствена организација (WHO) го основа т.н. Интернационален панел на крводарители со ретки крвни групи (IRDП) во рамките на Интернационалната референтна лабораторија за крвни групи (IBGRL) во Велика Британија. Целта на IRDP е да се идентифицираат дарители со ретки крвни групи и да се олесни меѓународната размена за пациентите кои имаат потреба од трансфузија на ретка крв [52]. Првиот панел кој се состоел од 300 дарители од 10 земји е објавен во 1968 годиа [53]. Денес, IRDP се состои од околу 8000 крводарители од 27 земји во кои се лоцирани крвни банки во кои се чуваат замрзнати еритроцити со ретки фенотипови [54].

Во Институтот за трансфузиона медицина во Скопје, регистрирани се околу 70.000 доброволни дарители на крв. Кај околу 35% од дарителите, направена е проширена крвогрупа типизација која покрај рутинското одредување на антигените A, B и D ги опфаќа и клинички најзначајните антигени од Rh (C, c, E, e) системот и K антигенот од Kell системот. Ваквата стратегија на еритроцитна типизација е доволна за поголемиот број на алоимунизирани пациенти бидејќи оклу 60% од сите идентифицирани антитела се насочени кон антигени од Rh и Kell крвогрупниот систем [55].

Еритроцитната алоимунизација и хемолитичките трансфузиски реакции претставуваат актуелен проблем, како во светската така и во нашата трансфузиска практика. Детекцијата и идентификацијата на еритроцитните алоантитела обезбедува информација за изборот на компатибилна крв за трансфузија. Поради тоа, тест-еритроцитите добиени од хумана крв се основа за сигурна дијагностика на еритроцитни антитела во имунохематолошките лаборатории. Тест-еритроцитите, комерцијални или од сопствено потекло, треба да поседуваат антигенски профил кој ги задоволува основните принципи за застапеност на клинички значајните еритроцитни антигени

воопшто, како и во однос на потребите на конкретната популација. Во таа насока, покрај рутинската еритроцитна типизација на дарителите на крв, потребна е проширена типизација со цел да се создаде регистар на потенцијални дарители со ретки крвни групи не само за трансфузиските потреби на одредени пациенти, туку и за изготвување на сопствен панел на тест-еритроцити за потребите на имунохематолошката лабораторија.

Водечкиот мотив за проектот насловен „Ретки крвни групи“ е обезбедување компатибилна крв за пациенти со редок крвнотипен фенотип и за пациенти кои се алоимунизирани кон еден или повеќе високо-фреквентни еритроцитни антигени. Тоа претставува долготраен процес кој вклучува сложени лабораториски процедури и значително одложување на трансфузијата. Постоечкиот регистар при Институтот за трансфузиона медицина на РСМ не располага со дарители кои се типизирани на останатите клинички значајни еритроцитни антигени како што се антигените од системите: Kell (Kp^a, Kp^b), Duffy (Fy^a, Fy^b), Kidd (Jk^a, Jk^b) MNS (S, s) и Lutheran (Lu^a, Lu^b). Поради тоа, пронаоѓањето на компатибилна крв за споменатите пациенти претставува предизвик за секоја трансфузиолошка установа. Во изминатите години се соочивме со потребата да се обезбеди компатибилна ретка крв за конкретни пациенти преку меѓународна размена што вклучува сложени административни и медико-легални процедури.

Проектот е мотивиран и од потребата за про-активен пристап кон еритроцитната типизација и формирање на регистар на дарители со ретки крвни групи со што ќе се овозможи крвта да го чека пациентот, а не обратно.

Оваа студија за цел го има следново:

1. Одредување на присуство на еритроцитните антигени од крвнотипните системи: ABO, Rh (D, C, c, E, e), Kell (K, k, Kp^a, Kp^b), Duffy (Fy^a, Fy^b), Kidd (Jk^a, Jk^b) MNS (S, s) и Lutheran (Lu^a, Lu^b) кај дарители на крв.
2. Приказ на фреквенцијата на антигените кои рутински се одредуваат (ABO и Rh и Kell-систем) кај дарителите на крв и тоа во периодот од 2016 година до август 2021 година.
3. Проценка на фреквенцијата на антигените Kp^a, Kp^b, Jk^a, Jk^b, Fy^a, Fy^b, S, s, Lu^a и Lu^b, поединечно и во комбинација на одредени фенотипови, кои дополнително беа одредени кај дарители на крв во периодот од 2018 година до август 2021 година.
4. Идентификација на дарители со ретки крвни групи во рамките на горенаведените еритроцитни антигени.
5. Формирање на регистар на дарители со ретки крвни групи.

Материјал и методи

Направена е рутинска и проширена еритроцитна типизација кај околу 1000 доброволни дарители на крв. Критериумите за избор на дарители кои ќе бидат вклучени во студијата се во согласност со Законот за безбедност во крвоснабдувањето на Р. Македонија од 2007 година, како и со препораките за селекција на доброволни дарители на крв на Европскиот директорат за квалитет на медицинските продукти (EDQM) при Советот на Европа (СЕ).

Во студијата не се вклучени дарители помлади од 18 години и постари од 65 години, како и дарители кај кои е утврдена реактивност на крвнопреносливи микроорганизми, како што се HBV, HCV, HIV и *Treponema palidum*.

Постапка за регистрација на дарител и земање на крвни примероци

1. Регистрацијата на дарителот и крвните примероци наменети за тестирање во информатичкиот систем за дарители на крв, наречен „eDelphyn“, е првиот чекор и неопходен чекор за понатамошен внес на резултатите од еритроцитната типизација.
2. Земање на крвен примерок во согласност со востановените стандардни оперативни процедури (СОП) за венепункција на дарител. Примероците на крв за еритроцитна типизација се земени во епрувета со EDTA во количина од 4 мл. Примероците се соодветно одбележани со бар-код кој ги поврзува со идентификациониот број на дарителот.

Метода

Рутинската еритроцитна типизација се изврши со серолошки методи кои вклучуваат:

1. Одредување на антигените А, В, D, С, с, Е, е, К и к со автоматизирана техника со употреба на автоанализатор TechnoTwinStation и автоматски читач за микроплочи Lyra (DiaMed). За таа цел се користат три профили на микроплочи (MP) со соодветни специфични моноклонални серуми во лиофилизирана состојба и тоа:
 - а) DiaMed-MP Test A, B, AB, DVI-, DVI+, ctl/A1, B
 - б) DiaMed-MP Test A, B, DVI+, ctl/A, B, DVI+, ctl
 - в) DiaMed-MP Test C, c, E, e, K, ctl/C, c, E, e, K, ctl

Тестот се базира на принцип на директна аглутинација на испитуваните еритроцити.

Процедура:

- Се подготвува 0.8% еритроцитна суспензија така што се пипетира 10µl пакувани еритроцити во 1.0 ml Бромелин.
- Се пипетира 50 µl од еритроцитната суспензија во соодветната алвеола од микроплочата.
- Микроплочата се инкубира 10-15мин. на 18-25°C.
- Микроплочата се центрифугира 1.5мин на 900 грм.
- Микроплочата се агитира 15-30 секунди на 800 грм до комплетна ресуспензија на негативните реакции, а потоа се агитира 2 до 3 минути на 300 грм за да се овозможи групирање на аглутинатите на дното на алвеолата кај позитивните реакции.
- Се врши читање и интерпретација на резултатите:

- Присуство на аглутинација означува позитивен резултат (реакција на испитуваните еритроцити со специфичниот серум и присуство на коресподентниот антиген на еритроцитите).
 - Отсуство на аглутинација означува негативен резултат (отсуство на реакција на испитуваните еритроцити со специфичниот серум и отсуство на коресподентниот антиген на еритроцитите).
- Резултатите се сметаат за валидни, само ако негативната контрола покажува негативна реакција.
2. Проширената еритроцитна типизација опфати одредување на антигените Kp^a, Kp^b, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, Lu^a и Lu^b со микрогел техника во микроепрувета или т.н. Column agglutination technique (CAT). Се користеа соодветни специфични серуми од хумано или моноклонално потекло и микрогел картички кои содржат полиспецифичен моноклонален антихуман глобулин (AHG) со профил LISS/Coombs 6 x AHG (Anti-IgG + C3d) (ID-Microtyping system DiaMed). Тестот се базира врз принцип на индиректна аглутинација на испитуваните еритроцити со помош на антихуман глобулин, т.н. индиректен антиглобулински тест (IAT).
- Процедура:*
- а) Се приготвува 1.0 % еритроцитна суспензија така што се додаваат 10 µl полна крв во 1000 µl раствор со ниска јонска јачина (LISS).
 - б) Се пипетира 50 µl од еритроцитната суспензија во комората од микроепруветата на картичката и се додава 25 µl од соодветниот серум.
 - в) Картичката се инкубира во тек на 15 минути, температура од 22°C или 37°C во зависност од карактеристиките на серумот и се центрифугира 10 минути на 1000 вртежи во минута (rpm).
3. Интерпретацијата на серолошките реакции се врши врз основа на присуство на аглутинација (т.е. присуство на антиген) или отсуство на аглутинација (т.е. отсуство на антиген) на мембраната на испитуваните еритроцити со соодветниот серум.
4. Резултатите се сметаат за валидни само ако позитивната и негативната контрола на серумот покажува позитивна и негативна реакција соодветно. Кај методите на еритроцитна типизација кои се врз принцип на IAT, еритроцитите кои се тестираат мора да имаат негативен директен антиглобулински тест (DAT), што е услов за точноста на добиените резултати.

По направената интерпретација и валидација, резултатите беа внесени во информатичкиот систем за дарители на крв. Потоа, се изврши проценка на фреквенцијата на поедини антигени и фенотипови со помош на модулите за статистичка обработка во состав на информатичкиот систем.

Резултати

Прикажани се резултатите од рутинската крвогрупна типизација на антигените од системот ABO (A, B), Rh (D-RH1, C-RH2, c-RH4, E-RH3, e-RH5) и Kell (K-KEL1, k-KEL2), како и резултатите од проширената крвогрупна типизација на антигените Kp^a-KEL3, Kp^b-KEL4, Kidd (Jk^a-JK1, Jk^b-JK2); Duffy (Fy^a-FY1, Fy^b-FY2); Lutheran (Lu^a-LU1, Lu^b-LU2) и MNS (S-MNS3, s-MNS4).

Фреквенцијата на крвните групи од ABO системот кај 75.528 дарители на крв е прикажана на Табела 1. Од нив 57197 (75.73%) се мажи, а 18331 (24.27%) се жени. RhD антигенот е присутен кај 64793 (85.79%) дарители кои се D-антиген позитивни, а отсутен е кај 10734 (14.21%) дарители кои се D-антиген негативни.

Табела 1. Фреквенција на ABO-крвни групи кај дарители на крв

Крвна група	Фреквенција (%)
A	40.89
O	34.22
B	16.97
AB	7.92

Фреквенцијата на клинички најзначајните антигени од Rh системот кај 28946 типизирани дарители е прикажана на Табела 2.

Табела 2. Фреквенција на Rh-антигени кај дарители на крв

Антиген	Фреквенција (%)
D (RH1)	85.79
C (RH2)	71.7
c (RH4)	76.0
E (RH3)	26.0
e (RH5)	97.95

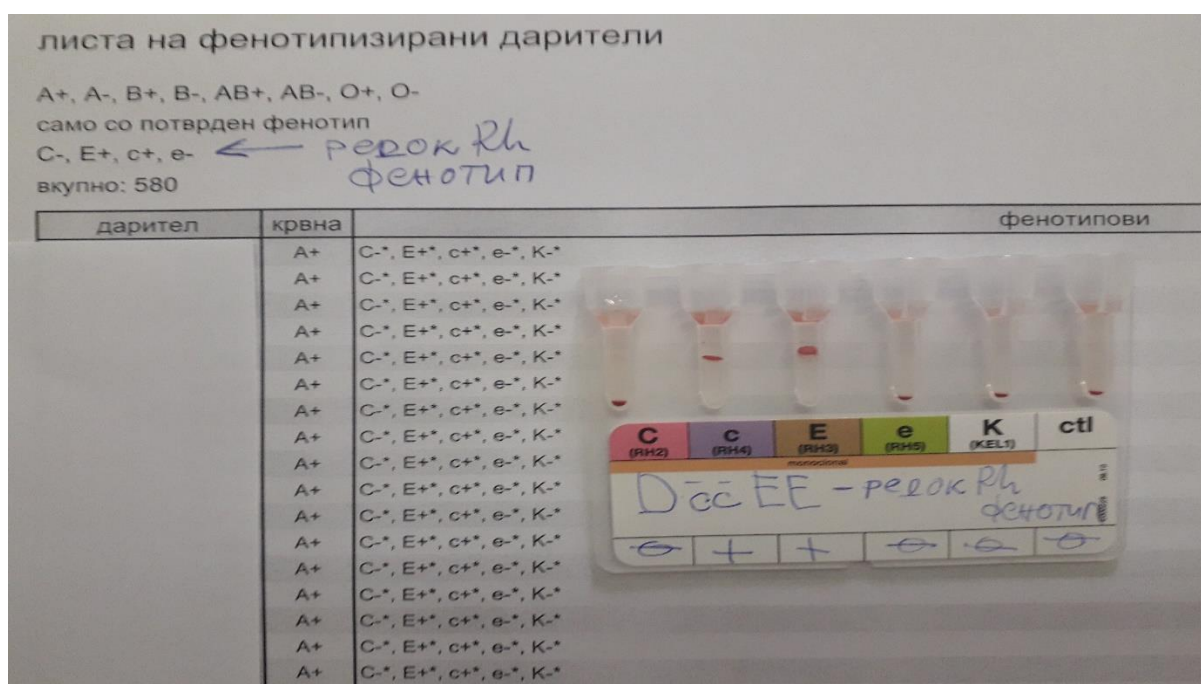
Фреквенцијата на Rh-фенотиповите кај кои е присутен D, C или E антиген варира од 32.7% за фенотипот DCsee, како најфреквентен, до 0.003% за фенотипот DCCee, кој има најниска фреквенција. Rh-негативниот фенотип ddcsee е застапен со 15.1% кај дарителите на крв како што е прикажано на Табела 3.

Табела 3. Фреквенција на Rh-фенотипови кај дарители на крв

Rh-фенотип	Фреквенција (%)	Rh-фенотип	Фреквенција (%)
DCsee	32.7	ddcsee	15.1
DCCee	23.7	ddCsee	1.28
DCcEe	13.7	ddccEe	0.2
DccEe	9.7	ddCCee	0.03
DccEE	1.9	ddCcEe	0.007
Dcsee	1.2	ddccEE	0

DCCEe	0.2	ddCcEE	0
DCcEE	0.04	ddCCEE	0
DCCEE	0.003	ddCCEe	0

Rh-фенотиповите со хомозиготна експресија на E антигенот се сметаат за ретки бидејќи нивната фреквенција во присуство на D и C антигенот изнесува < 1%. Еритроцити со овој фенотип се неопходни за трансфузија на алоимунизирани пациенти кои создале анти-е антитела, што претставува проблем за обезбедување на компатибилна крв, особено ако пациентот е D-негативен. D-негативните фенотипови кај кои е присутен антигенот C или E во хомозиготна или хетерозиготна форма се исклучително ретки, како што е прикажано на Табела 3.



Слика 1. Пример за еден од ретките Rh фенотипови

Фреквенцијата на антигените Kell (K или K1) и Cellano (k или K2) од крвогрупниот систем Kell кај 35017 типизирани дарители на крв, како и екстремно ретката експресија на антигенот K во хомозиготна форма (K+k-) е прикажана на Табела 4.

Табела 4. Фреквенција на Kell-антигени и фенотипови

Kell-антиген	Фреквенција (%)	Kell-фенотип	Фреквенција (%)
K (KEL1)	7.5	K+k-	0.06
k (KEL2)	99.94	K+k+	7.44
		K-k+	92.5

Kell-фенотиповите со хомозиготна експресија на K антигенот (K+k-) се сметаат за ретки, бидејќи нивната фреквенција изнесува < 1% (Табела 4). Еритроцити со овој фенотип се неопходни за трансфузија на алоимунизирани пациенти кои создале анти-k антитела.

Фреквенцијата на антигените од останатите клинички значајни крвнотрупни системи, како што се Kell (Kp^a-KEL3, Kp^b-KEL4), Kidd (Jk^a-JK1, Jk^b-JK2), Duffy (Fy^a-FY1, Fy^b-FY2), MNS (S-MNS3, s-MNS4) и Lutheran (Lu^a-LU1, Lu^b-LU2) кај 920 дарители на крв е прикажана на Табела 5. Од испитаните дарители 736 (80%) се мажи, а 184 (20%) се жени. Просечната возраст на дарителите изнесува 35.4 години.

Табела 5. Фреквенција на останати клинички значајни крвнотрупни антигени кај дарители на крв

Антиген	Фреквенција (%)
Kp ^a	1.1
Kp ^b	100.0
Jk ^a	60.26
Jk ^b	76.2
Fy ^a	65.5
Fy ^b	79.5
S	59.8
s	86.5
Lu ^a	7.2
Lu ^b	92.8



Слика 2. Позитивни и негативни реакции на аглутинација кај типизирани еритроцити со специфични серуми (анти-Kp^a, -Kp^b, -Jk^a, -Jk^b, -Fy^a, -Fy^b, -S, -s, -Lu^a, -Lu^b)

Фреквенциите на одредени фенотипови во рамките на споменатите крвнотипни системи се прикажани на Табела 6, 7, 8, 9 и 10.

Табела 6. Фреквенција на останати Kell-фенотипови

Фенотип	Kp(a+b ⁻)	Kp(a ⁻ b ⁺)	Kp(a+b ⁺)	Kp(a ⁻ b ⁻)
Фреквенција (%)	0	98.9	1.1	0

Табела 7. Фреквенција на Kidd-фенотипови

Фенотип	Jk(a+b ⁻)	Jk(a ⁻ b ⁺)	Jk(a+b ⁺)	Jk(a ⁻ b ⁻)
Фреквенција (%)	23.58	34.9	41.48	0

Табела 8. Фреквенција на Duffy-фенотипови

Фенотип	Fy(a+b ⁻)	Fy(a ⁻ b ⁺)	Fy(a+b ⁺)	Fy(a ⁻ b ⁻)
Фреквенција (%)	20.32	31.0	48.47	0.21

Табела 9. Фреквенција на MNS-фенотипови

Фенотип	(S+s ⁻)	(S ⁻ s ⁺)	(S+s ⁺)	(S ⁻ s ⁻)
Фреквенција (%)	13.5	40.2	46.3	0

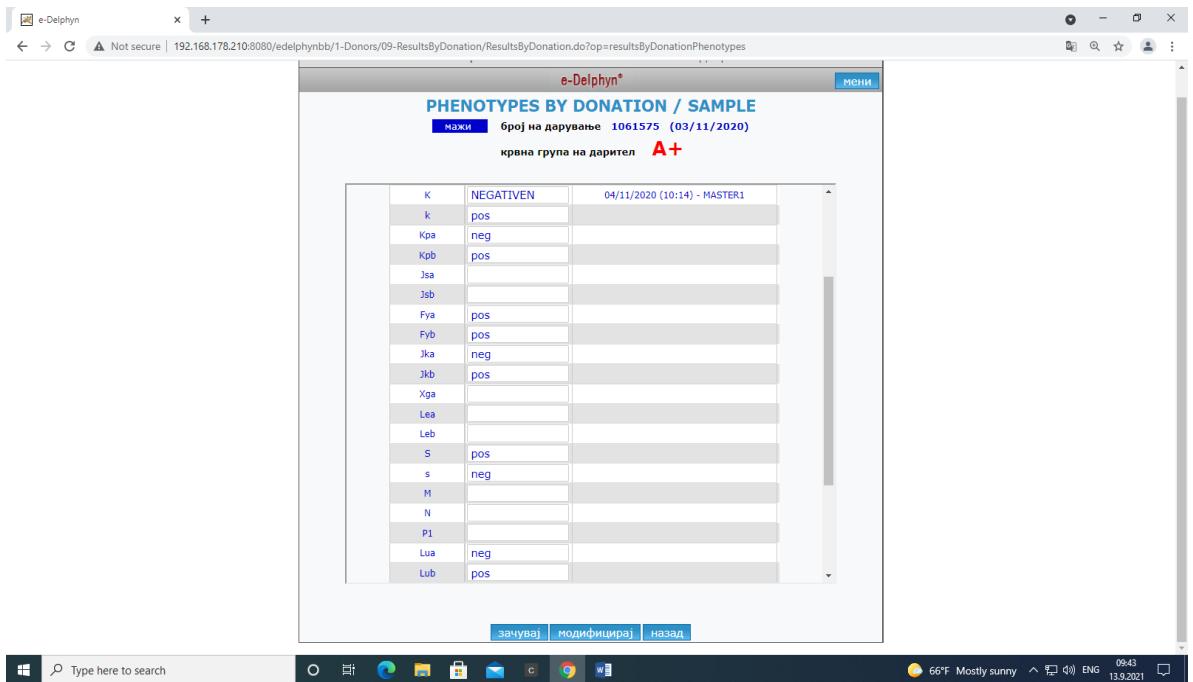
Табела 10. Фреквенција на Lutheran-фенотипови

Фенотип	Lu(a+b ⁻)	Lu(a ⁻ b ⁺)	Lu(a+b ⁺)	Lu(a ⁻ b ⁻)
Фреквенција (%)	0	92.8	7.2	0

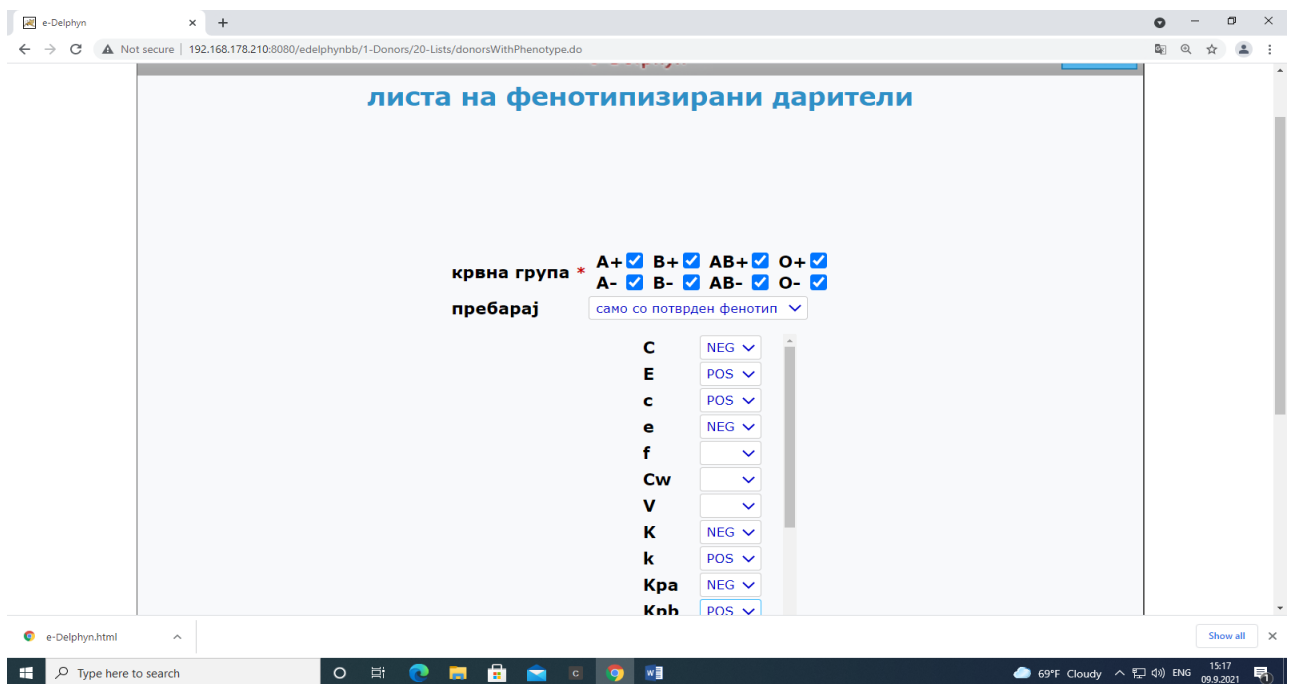
Кај сите крвни примероци кои беа предмет на серолошка крвнотипна типизација врз принцип на IAT, директниот антиглобулински тест (DAT) беше негативен, што е предуслов за точноста на добиените резултати.

Секоја серија тестирани крвни примероци вклучува позитивна и негативна контрола, на користениот специфичен серум, со тест еритроцити кои соодветно се антиген-позитивни, во хетерозиготна форма и антиген-негативни за тестираниот антиген.

Резултатите од проширената крвнотипна типизација беа внесени во информатичкиот систем за дарители, како што е прикажано на Слика 3. Тоа овозможува пребарување на регистрот на фенотипизирани дарители, на тој начин што во соодветниот модул се внесува потребниот антигенски профил (Слика 4). Потоа се генерира листа на потенцијални дарители на крв за потребите на алоимунизирани пациенти и пациенти со ретки крвни групи (Слика 1).



Слика 3. Внес на резултати од проширената крвногрупна типизација на дарителот на крв во информатичкиот систем.



Слика 4. Пребарување на дарител со одреден крвногрупен фенотип

Дискусија

Популационата генетика покажала дека постојат значајни разлики во дистрибуцијата на еритроцитните антигени кај различни етнички групи. Резултатите од нашата студија исто така покажаа дека постои разлика во утврдената фреквенцијата на одредени еритроцитни антигени во однос на Афричката, Индиската, Кинеската и Европската популација. Така, дистрибуцијата на АВО-крвните групи кај нашата популација значително се разликува во однос на некои популации како што е прикажано на Табела 11 [56, 6].

Табела 11. АВО-крвногрупа дистрибуција кај различни популации

Фенотип	Македонија (%)	Британија (%)	Бела раса (%)	Црна раса (%)	Латино (%)	Азијати (%)
O	33	47	45	50	57	43
A	41	42	43	26	31	27
B	18	8	9	20	10	25
AB	8	3	4	4	3	5

Фреквенцијата на антигените од Rh системот кај нашата популација е слична на онаа кај Белата раса, кај која изнесува 85% за D, 70% за C, 80% за c, 30% за E и 98% за e-антигенот [57]. Во популацијата во Индија фреквенцијата на Rh-антигените, освен за e-антигенот (98.0%), значително се разликува во однос на нашата популација и изнесува 93.6% за D, 87% за C, 20.0% за E, 58% за c антигенот [58]. Најчест Rh-фенотип во нашата популација е DCsee, застапен со 32.7%, кој во Индиската популација изнесува 23.5%. Најчест Rh-фенотип во Индиската популација е DCSee (40.87%) [59].

Преваленцата на K антигенот во нашата студија изнесува 7.5% и е пониска во однос на преваленцата од 9% кај Белата раса. Таа значително се разликува во однос на Црната раса (2%) и Арапската популација, кај која K антигенот е застапен со дури 25% [60]. Застапеноста на фенотипот K-k+ (kk) во нашата студија изнесува 92.5%, со 91% е застапен кај Белата раса и со 98% кај Црната раса. Фенотипот K+k- (KK) е застапен со 0.06% во нашата популација и е многу поредок во споредба со застапеноста од 0.2% кај Белата раса, додека кај Црната раса скоро и да не е присутен. Слично како и кај нашата дарителска популација, високо-фреквентниот Kрb антиген, како Kр (a-b+) фенотип, е застапен со 97.7% кај Белата раса и со 100% кај Црната раса. Кра антигенот во хомозиготна форма е многу редок, а во комбинација со Kрb антигенот е застапен со 2.3% кај Белата раса [60]. Кај Јапонците е карактеристично отсуството на K-антигенот, така што неговиот алелски антиген k (фенотип K-k+) е застапен со 100%, слично како и кај Кинеската популација [61].

Антигените Jка и Jкb имаат слична преваленца кај Белата раса и Азиската популација. Jка е многу почест кај Црната раса во однос на Jкb. Jк(a-b-) претставува null фенотип кој е редок кај повеќето популации, но има зголемена преваленца од 0.9% до 1.4% во Полинезија [60, 62]. Анти-Jк3 е многу ретко антители кое се среќава кај алоимунизирани пациенти со Jк(a-b-) фенотип и кое може да доведе до акутна и одложена хемолитичка трансфузиска реакција (ХТР), поради што за трансфузија мора да се обезбеди ретка крв со фенотип Jк(a-b-) [42]. Според резултатите од нашата студија, Jк (a-b+) фенотипот е застапен значително почесто (35%) во споредба со фреквенцијата кај Белата раса.

Табела 12. Фреквенција на Kidd-фенотип кај различни популации

Фенотип	Бела раса (%)	Црна раса (%)	Азија (%)
Jk ^a + Jk ^{b-}	26	52	23
Jk ^a + Jk ^{b+}	50	40	50
Jk ^{a-} Jk ^{b+}	24	8	27

За разликите во дистрибуцијата на Duffy-антигените се осознава во 1954 година со откритието дека кај 68% од Американците со афричко потекло и кај 88-100% кај Африканците е присутен фенотипот Fy(a-b-) [60]. Duffy-null фенотип Fy(a-b-) е присутен кај 61% од дарителите на крв во Саудиска Арабија [64]. Овој фенотип е исклучително редок кај Белата раса. Во нашата дарителска популација фенотипот Fy(a-b-) е застапен со 0.21%. Ваквите индивидуи може да создадата ретко анти-Fy3 антители кое реагира со сите еритроцити освен со оние со Fy(a-b-) фенотип. Ова антители предизвикува акутна или одложена ХТР, поради што за трансфузија мора да се обезбеди ретка Duffy-антиген негативна крв. Анти-Fy5 е ретко антители кое не реагира со еритроцити кои имаат фенотип Fy(a-b-) и кое дополнително не реагира со Rh-null еритроцити. Познато е дека анти-Fy5 може да доведе до одложена ХТР, така што за трансфузија е неопходна крв со фенотип Fy(a-b-) [42].

Фреквенцијата на антигенот Fya и Fyb кај нашата популација е слична како кај Белата раса кај која изнесува околу 66% и 83%, кај Азијатите изнесува 99% и 18.5%, а кај Црната раса изнесува 10% и 23% соодветно [63]. Фреквенцијата на фенотипот Fy(a+b+) изнесува 49% кај Белата раса, 1% кај Црната раса и 9% кај Кинезите. Фреквенцијата на фенотипот Fy(a-b+) изнесува 34% кај Белата раса, 22% кај Црната раса и <1% кај Кинезите. Фреквенцијата на фенотипот Fy(a+b-) изнесува 17% кај Белата раса, 9% кај Црната раса и 91% кај Кинезите [61].

Фреквенцијата на антигените од MNS системот кај Белата раса изнесува: M-78%, N-72%, S-55%, s-89%, додека кај Црната раса таа изнесува: M-74%, N-75%, S-31% и s-93% [60]. Фенотиповите M+N-S-s-, M+N+S-s-, and M-N+S-s- се ретки кај Белата раса, но се среќаваат со фреквенција од околу 0.5% кај Црната раса [60]. Во Индиската популација, фенотипот S+s+ се среќава кај 24.35% од дарителите на крв, фенотипот S+s- кај 8.69%, а фенотипот S-s+ е најчест и се среќава кај 66.96% од дарителите на крв [59].

Во нашата студија, фенотипот Lu(a+b+) е застапен со 7.2%, што е многу слично со фреквенцијата кај Белата раса кај која е застапен со 7.5% [60]. Фенотипот Lu(a-b+), со фреквенција од 92.8%, е најчест во нашата популација и може да се спореди со фреквенцијата од 92.35% кај Белата раса и со 95.9% во некои области од Индија [65]. Фенотипот Lu(a+b-) е многу редок и изнесува 0% во нашата студија и 0,15% кај Белата раса. Па така, вкупната фреквенција на антигенот Lub во нашата студија изнесува 100%, што е многу слично како и кај припадниците на Белата раса (99.85%) [60]. Фенотипот Lu(a-b-) кај Белата раса е многу редок, додека различни Индиски студии пријавуваат фреквенција од 2.61% и 3.15% [59, 65].

Дарителите на крв се одраз на општата популација како во однос на демографските карактеристики, така и во однос на наследните биолошки карактеристики кои не се менуваат во текот на животот, како што се крвните групи. Па така, промените во демографската структура на населението може да влијаат на фреквенцијата на еритроцитните антигени во популацијата, за што сведочат две поголеми студии, студија од 2009 година (1600 дарители на крв) и студија од 1992 година (1000 дарители на крв), во кои е направена еритроцитна типизација на антигените

од ABO, Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS и Lutheran системот кај дарителите на крв од Македонија [55, 66, 67].

Табела. 13. Споредба на фреквенцијата на ABO-крвни групи

Крвна група	Актуелна студија (%)	Студија (2009 г.) (%)	Студија (1992 г.) (%)	Бела раса (%)
O	33	38	35	45
A	41	39	40	43
B	18	14	16	9
AB	8	7	8	4

Застапеноста на крвната група O е значително помала кај нашата популација во однос на истата кај Белата раса, додека застапеноста на крвната група B и AB е значително поголема. Според резултатите од актуелната студија, фреквенцијата на крвната група B кај нашата дарителска популација и понатаму е во пораст.

Табела 14. Споредба на фреквенција на Rh-антигени

Антиген	Актуелна студија (%)	Студија (2009 г.) (%)	Студија (1992 г.) (%)	Бела раса (%)
D (RH1)	86	79	86	85
C (RH2)	72	58	73	70
c (RH4)	76	82	80	80
E (RH3)	26	21	31	30
e (RH5)	98	97	95	98

Фреквенцијата на антигените од Rh системот кај нашата популација покажува одредени варијации во последните 30 години. При тоа, треба да се има предвид дека во студијата од 2009 година беа вклучени поголем број на RhD негативни дарители за потребата од изработка на сопствен еритроцитен панел, а во актуелната студија е вклучен најголем број на типизирани дарители.

Фреквенцијата на K-антигенот не покажа значителни варијации во нашата дарителска популација, но неговата хомозиготна експресија (K+k-) е значително намалена како што е утврдено со еритроцитната типизација во рамките на актуелната студија спроведена од 2018 година до август, 2021 година. Во оваа студија, кај 21 (0.06%) дарител на крв утврден е фенотипот (K+k-), како што е прикажано на Табела 16. Дарителите со овој редок еритроцитен фенотип може да бидат повикани во случаите кога е потребна крв за пациенти кои создале анти-k антитело. Ова антитело е специфично за високофреквентниот антиген Cellano (k) кој е присутен на еритроцитите од 99.94% од дарителите на крв во нашата популација.

Табела 15. Споредба на фреквенција на Kell-антигени

Kell-антиген	Актуелна студија (%)	Студија (2009 г.) (%)	Студија (1992 г.) (%)	Бела раса (%)
K (KEL1)	7.5	6.31	8.1	9.0
k (KEL2)	99.94	99.49	99.0	99.8

Табела 16. Споредба на фреквенција на Kell-фенотипови

Kell-Фенотип	Актуелна студија (%)	Студија (2009 г.) (%)	Студија (1992 г.) (%)	Бела раса (%)
(K+ k-)	0.06	0.5	1.0	0.2
(K+ k+)	7.44	5.81	7.1	8.8
(K- k+)	92.5	93.68	91.9	91.0

Табела 17. Споредба на фреквенција на останатите клинички значајни крвногрупни антигени

Антиген	Актуелна студија (%)	Студија (2009 г.) (%)
Kp ^a	1.1	/
Kp ^b	100.0	/
Jk ^a	60.26	73.1
Jk ^b	76.2	75.8
Fy ^a	65.5	65.3
Fy ^b	79.5	77.3
S	59.8	57.9
s	86.5	85.3
Lu ^a	7.2	6.1
Lu ^b	92.8	95.3

Постојат и други крвногрупни системи, како што се системите Dombrock и Colton, со помало клиничко значење бидејќи антителата ретко се причина за појава на хемолитичка трансфузиска реакција. Крвногрупните системи Landsteiner-Wiener, Sciana, Yt, Gerbich, Cromer, Snops, Indian не се клинички значајни за трансфузијата на крв и бременоста бидејќи не се опишани алоантитела кои биле причина за хемолитичка реакција. Поради тоа, антигените од системите кои немаат клиничко значење не се вклучени во рутинските панели на тест-еритроцити за идентификација на антитела, ниту пак се предмет на проширена еритроцитна типизација кај дарители на крв.

Крвногрупниот систем Diego (Dia и Dib) е клинички значаен за Бразилската популација. Кај Јужноамериканските индијанци Dib антигенот е застапен со 64%, а Dia антигенот со 36% што создава можност за алоимунизација [60]. Анти-Dia антителата се присутни кај 3,6% од политрансфундираните пациенти во Бразил и се одговорни за хемолитичка трансфузиска реакција и тешка хемолитичка болест на новороденото [6,36]. Кај Белата раса, Dib антигенот, како фенотип Di (a-b+), е застапен со >99.9%, додека Dia антигенот, како Di (a+b-) фенотип, е застапен со <0.01% [60]. Поради ваквата

дистрибуција на Diego-антигените, можноста за алоимунизација е практично непостоечка, а со тоа и потребата за негова типизација во рамките на оваа популација.

Со цел да се превенира имунолошкото препознавање на некомпатибилните еритроцити и да се избегнат хемолитичките рансфузиски реакции како резултат на алоимунизација, предложени се неколку модулаторни стратегии. Една од нив се базира на технологија која применува ензимска конверзија на антигените А и В во О, со цел да се добијат „универзални“ ензимски конвертирани О еритроцити со користење на ензими како што се галактозидаза и N-ацетилгалактозаминидаза [68,69,70]. Ензим-конвертирачка стратегија била предложена и за надминување на бариерата на АВО-некомпатибилноста при органската трансплантација [71]. Ензимскиот третман на еритроцитите не влијае на еластичноста и пермеабилноста за гасови на еритроцитната мембрана, но, исто така не влијае на имуногеноста и експресијата на антигените од крвнотрупните системи Rh (D, C и E), MNS, Lewis, Kell, Lutheran, Duffy, Kidd, така што и понатаму останува можноста за алоимунизација кон овие клинички значајни антигени. За добивање на универзално-компатибилни еритроцити била предложена стратегија за маскирање на антигените со користење на полиетилен гликол, како и *in vitro* продукција на еритроцити со претходно дефриниран антигенски профил, од генетски модифицирани матични клетки [72].

Ваквите приоди за надминување на разликите во еритроцитниот антигенски профил помеѓу дарителот и примателот се сеуште во експериментална фаза, па затоа вниманието на денешната трансфузиолошка практика е насочено кон што попрецизна еритроцитна типизација. Молекуларното тестирање е попрецизно во споредна со серолошкото и денес има широка примена во генотипизацијата на крвнотрупните антигени. Единечните нуклеотидни полиморфизми кои се најчесто причина за алелските варијации на еритроцитните антигени може да се определат со полимеразата верижна реакција, со специфични прајмери за секвенца (PCR-SSP). Со оваа техника може истовремено да се тестираат повеќе клинички значајни антигени кои не се вклучени во рутинската АВО и Rh типизација, што ја прави практична и се подостапна, особено кога станува збор за политрансфундирани и алоимунизирани пациенти [73,74]. Молекуларните тестови, исто така, се почесто се користат за идентификација на ретки крвнотрупни антигени [75].

Компаративните студии покажале дека резултатите од серолошката типизација се во согласност со оние од молекуларната типизација во зависност од достапноста на квалитетни специфични серуми [76]. Но, во случаи кога во исто време е потребно тестирање на голем број антигени и на голем број примероци, како што е во случај на типизација на дарители за регистар на ретки крвни групи, тогаш молекуларната метода е далеку попрактична и поисплатлива [77].

Постоењето на регистар на дарители со ретки крвни групи кои се типизирани со молекуларна метода, за крвните банки исто така нуди можност за создавање на сопствен панел на тест еритроцити за скрининг и идентификација на антиеритроцитни антители. Предноста на домашно-приготвените панели во однос на комерцијалните се состои во застапеноста на еритроцитни антигени кои се соодветни на антигенската дистрибуција и специфика на локалната популација, со што се постигнува повисока стапка на детекција и идентификација на постоечки антители.

Крвните групи се различно застапени кај различни популации и различни етнички групи поради што пронаоѓањето на дарител со соодветен фенотип може да претставува голем предизвик. Дарител со редок фенотип, кој подразбира отсуство на антиген со висока фреквенција или истовремено отсуство на повеќе антигени кои се често присутни во дадената популација, се јавува со фреквенција од 1/1000. Крвните единици (еритроцити) од ваквите дарители може да се чуваат замрзнати за идна

употреба. За таа цел, неопходно е постоење на интернационална датотека на дарители со ретки крвни групи за навремено задоволување на потребата од трансфузија кај пациентите кои имаат потреба од ретка крв.

Имајќи ги предвид поставените цели и добиените резултати од студијата, сметаме дека е создадена значајна датотека на типизирани дарители во однос на клинички значајни еритроцитни антигени за нашата популација. Регистрирани се дарители со ретки крвни групи од системите Rh, Kell и др. што претставува почеток во формирањето на национален регистер на дарители со ретки крвни групи.

Заклучок

Вклучувањето на што поголем број дарители кои ќе бидат типизирани на повеќето клинички значајни еритроцитни антигени овозможува идентификација на ретки фенотипови и претставува основа за формирање на регистер на дарители со ретки крвни групи.

Постоењето на национален регистер нуди можност за вклучување во Интернационалниот панел на дарители со ретки крвни групи, а со тоа се зголемува можноста за пронаоѓање на компатибилна крв за алоимунизирани пациентите со редок фенотип и се олеснуваат процедурите за обезбедување на истата.

Со идентификација на дарителите со ретки крвни групи се зголемува веројатноста дека во резервите на крв ќе се најдат компатибилни еритроцити со одреден фенотип за најголемиот број алоимунизирани пациенти. За пациентите кои имаат потреба од хронична трансфузија, регистерот на типизирани дарители на крв ќе обезбеди редовно и навремено прибирање на компатибилни крвни единици, уште од првата трансфузија, со што значително ќе се намали стапката на еритроцитна алоимунизација.

Литература

1. Lögdberg L, Reid ME, Zelinski T. Human blood group genes 2010: Chromosomal locations and cloning strategies revisited. *Transfus Med Rev.* 2011;25:36–46.
2. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transpl Immunol* 2005; 14 (3-4) 143-53.
3. Cartron JP. Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfus Clin Biol* 2001; 8: 163-99.
4. Denomme GA. The structure and function of the molecules that carry human red blood cell and platelet antigens. *Transf Med Rev* 2004;18: 203-231.
5. Reid ME, Mohandas N. Red blood cell blood group antigens: structure and function. *Semin Hematol* 2004; 41: 93-117.
6. Daniels G, Bromilow I. *Essential Guide to Blood Groups*, 2nd Edition. 2011, Wiley-Blackwell.
7. Anstee DJ. The functional importance of blood group-active molecules in human red blood cells. *Vox Sang.* 2011 Jan;100(1):140-9.
8. Daniels G. Functions of red cell surface proteins. *Vox Sang* 2007; 93:331-340.
9. Hemker MB, Cheroute G, van Zwieten R, Maaskant-van Wijk PA, Roos D, Loos JA, van der Schoot CE, von dem Borne AE. The Rh complex exports ammonium from human red blood cells. *Br J Haematol.* 2003; 122(2): 333-40.
10. Proceeding of the International conference on the Rh protein superfamily. *Transfus Clin Biol* 2006; 13 (1-2): 1-178.
11. Storry JR. Review: the function of blood group-specific RBC membrane components. *Immunohaematology* 2004; 20: 206-216.
12. Hadley TJ, Peoper SC, From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood* 1997; 89:3077-3091.
13. Eylar CE, Telen MJ. "The Lutheran glycoprotein: a multifunctional adhesion receptor". *Transfusion.* 2006; 46 (4): 668–77.
14. Zhang J, Abiraman K, Jones SM, Lykotrafitis G, Andemariam B. *Biophys J.* Regulation of Active ICAM-4 on Normal and Sick Cell Disease RBCs via AKAPs Is Revealed by AFM. 2017 Jan 10;112(1):143-15.
15. Tanner MJA. Band 3 anion exchanger and its involvement in erythrocyte and kidney disorders. *Curr Opin Hematol* 2002; 9:133-139.
16. Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood* 2003; 101: 4180-4188.
17. Lee S, Russo D, Redman C. Functional and structural aspects of the Kell blood group system. *Transfus Med Rev.* 2000;14(2):93–103.
18. Anstee DJ. The relationship between blood groups and disease. *Blood.* 2010;115:4635–43.
19. Groot HE, Villegas Sierra LE, Said MA, Lipsic E, Karper JC, Van der Harst P. Genetically determined ABO blood group and its associations with health and disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2020;40:830–838.
20. Jenkins PV., O'Donnell JS., ABO blood group determines plasma levels of von Willebrand factor. 2006; 46: 1836-1844.
21. Zhang H, Mooney CJ, Reilly MP. ABO Blood Groups and Cardiovascular Diseases. *Int J Vasc Med* 2012. 2012:641917.
22. Wu O, Bayoumi N, Vickers MA, Clark P. ABO(H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2008;6:62–9.

23. Hiltunen LM, Laivuori H, Rautanen A, Kaaja R, Kere J, Krusius T, et al. Blood group AB and factor V Leiden as risk factors for pre-eclampsia: A population-based nested case-control study. *Thromb Res.* 2009;124:167–73.
24. Iodice S, Maisonneuve P, Botteri E, Sandri MT, Lowenfels AB. ABO blood group and cancer. *Eur J Cancer* 2010; 46: 3345– 3350.
25. Wang Z, Liu L, Ji J et al. ABO blood group system and gastric cancer: a case-control study and meta-analysis. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 13308– 13321.
26. Wolpin BM, Chan AT, Hartge P et al. ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 424– 431.
27. Gates MA, Wolpin BM, Cramer DW, Hankinson SE, Tworoger SS. ABO blood group and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2011;128:482–6.
28. Matsushita S, Imamura T, Mizuta T, Hanada M . Acquired B antigen and polyagglutination in a patient with gastric cancer. *Jpn J Surg* 1983; 13 (6): 540–2.
29. Voskova D., Valekova L., Fedorova J., Hudecek J., Kubisz P. Leukemic cells and aberrant phenotypes in acute leukemia patients: a flow cytometry analysis. *Neoplasma* 2003; 50: 422-7.
30. Bianco-Miotto T., Hussey D.J., Day T.K., O'Keefe D.S., Dobrovic A. DNA methylation of the ABO promoter underlies loss of ABO allelic expression in a significant proportion of leukemic patients. *PloS one.* 2009;4(3):e4788.
31. Faruque A.S., Mahalanabis D., Hoque S.S., Albert M.J. The relationship between ABO blood groups and susceptibility to diarrhea due to *Vibrio cholerae* 0139. *Clinical infectious diseases.* 1994;18(5):827–8.
32. Rowe J.A., Handel I.G., Thera M.A., Deans A.M., et al. Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(44):17471–6.
33. Zhang Y, Garner R, Salehi S, La Rocca M, Duncan D. Association between ABO blood types and coronavirus disease 2019 (COVID-19), genetic associations, and underlying molecular mechanisms: a literature review of 23 studies. *Ann Hematol.* 2021;100(5):1123-1132.
34. Wagner FF, Moulds JM, Flegel WA. Genetic mechanisms of Rhesus box variation. *Blood.* 2005;45(3):338–44.
35. Allen FH, Krabbe SM, Corcoran PA. "A new phenotype (McLeod) in the Kell blood-group system". *Vox Sanguinis.* 1961; 6 (5): 555–60.
36. Daniels G., Poole J., de Silva M., Callagan T., MacLennan S., Smith N. The clinical significance of blood group antibodies. *Transfusion Med* 2002; 12: 287-295.
37. Klein H., Anstee DJ. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 11th edn. Oxford: Blackwell Science, 2005.
38. Daniels G and members of the ISBT Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens. Blood group terminology 2004. *Vox Sang* 2004; 87: 304-316.
39. Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Chapter 8, The Kell blood group. Available from:<https://www.ncbi.nlm.gov/books/NBK2270>.
40. Reesnik HW et al. Donors with a rare phenol (geno) type. *Vox Sang* 2008; 95: 236-53.
41. Peyrard T et al. The rare blood groups: a public health challenge. *Transfus Clin Biol* 2008; 15: 109-19.
42. Thornton NM, Grimsley SP. Clinical significance of antibodies to antigens in the ABO, MNS, P1PK, Rh, Lutheran, Kell, Lewis, Duffy, Kidd, Diego, Yt, and Xg blood group systems. *Immunohematology.* 2019; 35 (3):95-101.

43. "Rhnull, the Rarest Blood Type on Earth, Has Been Called the "Golden Blood"". Curiosity.com. Archived from the original on 5 December 2019. Retrieved 2019-06-05.
44. Bailey, Penny. "The man with the golden blood". Mosaic Science. Mosaic. Retrieved 16 January 2019.
45. A. Quershi, M.Salman, B.Moiz. Rh null: a rare blood group phenotype. *J Pak Med Assoc.* 2010;60 (11):960-961.
46. Gabra GS, Bruce M, Watt A, Mitchell R. Anti-Rh 29 in a primigravida with rhesus null syndrome resulting in haemolytic disease of the newborn. *Vox Sang.* 1987;53(3):143-6.
47. Yu LC, Twu YC, Chang CY, Lin M. "Molecular basis of the Kell-null phenotype: a mutation at the splice site of human KEL gene abolishes the expression of Kell blood group antigens". *The Journal of Biological Chemistry.* 2001; 276 (13): 10247–52.
48. Lin M , Wang CL , Chen FS , Ho LH . Fatal hemolytic transfusion reaction due to anti-Ku in a Knull patient. *Immunohematol.* 2003;19:19–21.
49. Russo DC, Lee S, Reid ME, Redman CM. Point mutations causing the McLeod phenotype. *Transfusion.* 2002; 42 (3): 287–93.
50. Mallick S, Kotasthane DS, Chowdhury PS, Sarkar S: Bombay blood group: is prevalence decreasing with urbanization and the decreasing rate of consanguineous marriage. *Asian J Transfus Sci* 2015;9:129-132.
51. Oriol R, Candelier JJ, Mollicone R: Molecular genetics of H. *Vox Sang* 2000;78(2):105-108.
52. Mourat AE. The establishment of an international panel of blood donors of rare types. *Vox Sang* 1965; 10: 129-132.
53. Anstee D et al. Rare blood. An ISBT working party report on rare blood donors. *Vox Sang* 1999; 77:58-62.
54. Nance S, Schanberg EA, Thronton N, Yahalom V, Sareneva I, Lomas-Francis C. International rare donor panels: a review. *Vox sang* 2015.
55. Makarovska-Bojadzieva T, Blagoevska M, Kolevski P, Kostovska S. Optimal blood grouping and antibody screening for safe transfusion. *Contributions, Sec.Biol.Med. Sci. MASA.* 2009; 30 (1): 119-128.
56. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood transfusion in clinical medicine*, 10th ed. 1997; Blackwell Scientific Publications, Oxford.
57. Issit PD, *Applied blood group serology*, 3rd ed. 1985; p.222; Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, U.S.A.
58. Mitra R, Mishra N, Rath GP. Blood group systems. *Indian J Anaesth.* 2014;58(5):524-528.
59. Kahar MA, Patel RD. Phenotype frequencies of blood group systems (Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, P, Lewis, and Lutheran) in blood donors of south Gujarat, India. *Asian J Transfus Sci.* 2014; 8(1): 51–55.
60. Reid ME and Lomas-Francis C. *The Blood Group Antigen Facts Book*. Second ed. 2004, New York: Elsevier Academic Press.
61. Yu Y, Ma C, Sun X, et al. Frequencies of red blood cell major blood group antigens and phenotypes in the Chinese Han population from Mainland China. *Int J Immunogenet.* 2016;43(4):226–235.
62. Dean L. The Kidd blood group. *Blood Groups and Red Cell Antigens*. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information. 2005:1-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2272/>. Accessed on: February 27, 2015.
63. Levinson, Warren (2004). *Medical microbiology & immunology: examination & board review*. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill. ISBN 978-0-07-143199-6.

64. Owaidah AY, Naffaa NM, Alumran A, Alzahrani F. Phenotype Frequencies of Major Blood Group Systems (Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, P, Lewis, and Lutheran) Among Blood Donors in the Eastern Region of Saudi Arabia. *Journal of Blood Medicine*.2020; 11:59-65.
65. Thakral B, Saluja K, Sharma RR, Marwaha N. Phenotype frequencies of blood groups systems (Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, P, Lewis, and Lutheran) in north Indian blood donors. *Transfus Apher Sci*. 2010;43:17–22.
66. Makarovska Bojadzieva T, Velkova E, Blagoevska M. The impact of extended typing on red cell alloimmunization in transfused patients. *Open Access Maced J med Sci*. 2017; 5(2):107-111.
67. Стефановска В. Алоимунизација кон еритроцитните антигени. Докторска дисертација. Медицински факултет, Скопје, 1992.
68. Goldstein J, Siviglia G, Hurst R, Lenny L, Reich L. Group B erythrocytes enzymatically converted to group O survive normally in A, B, and O individuals. *Science*. 1982;215:168–70.
69. Goldstein J. Conversion of ABO blood groups. *Transfus Med Rev*. 1989;3:206–12.
70. Liu QP, Sulzenbacher G, Yuan H, Bennett EP, Pietz G, Saunders K, et al. Bacterial glycosidases for the production of universal red blood cells. *Nat Biotechnol*. 2007;25:454–64.
71. Kobayashi T, Liu D, Ogawa H, Miwa Y, Nagasaka T, Maruyama S, et al. Alternative strategy for overcoming ABO incompatibility. *Transplantation*. 2007;83:1284–6.
72. Hashemi-Najafabadi S, Vasheghani-Farahani E, Shojaosadati SA, Rasaei MJ, Armstrong JK, Moin M, et al. A method to optimize PEG-coating of red blood cells. *Bioconjug Chem*. 2006;17:1288–93.
73. Kulkarni S, Maru H. Extended phenotyping of blood group antigens: Towards improved transfusion practices. *Glob J Transf med*. 2020;5:120-5.
74. S. Tarafdar, P.Mondy, T. Powley, J.Daly, D.O.Irving.Understanding the demand for phenotyped red blood cell units and requests to perform molecular red blood cell typing for Australian patients. *Transfusion and Apheresis Science* 2020; 60(1):102968.
75. Liu Z, Zeng R, Chen Q, Li M, Shi G, Wei P et al. Genotyping for Kidd, Kell, Duffy, Scianna, and RHCE blood group antigens polymorphisms in Jiangsu Chinese Han Chin *Med J (Engl)*. 2012;125(6):1076-81.
76. Menegati SFP, Santos TD, Macedo MD, Castilho L. Discrepancies between red cell phenotyping and genotyping in daily immunohematology laboratory practice. *Transfus Apher Sci* 2020;59(1):102585. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.06.020>.
77. Quirino MG, Colli CM, Macedo LC, Ana Maria Sell AM, Laguila Visentainer JE. Methods for blood group antigens detection: cost-effectiveness analysis of phenotyping and genotyping. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2019 Jan-Mar; 41(1): 44–49. Published online 2018 Oct 30. doi: 10.1016/j.htct.2018.06.006.

