TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KRONİK TRANSFÜZYON İHTİYACI OLAN TALASEMİ HASTALARININ KAN GRUBU GENOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ ve ERİTROSİT FENOTİPLENDİRME YÖNTEMİYLE KARŞILAŞTIRILMASI

Uzm. Dr. Şule Mine BAKANAY ÖZTÜRK

HEMATOLOJİ BİLİM DALI TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Önder ARSLAN

ANKARA

2011

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
DAHİLİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜM BAŞKANLIĞI

Sayı : B.30.2.ANK.0.30.11.36 /050.01/ 316 28.03.2011

Konu : Uz.Dr.Şule Mine Bakanay'ın tez jüri raporu

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı – Hematoloji Bilim Dalı Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

' Kronik Transfüzyon İhtiyacı Olan Talasemi Hastalarının Kan Grubu Genotiplerinin Belirlenmesi Ve Eritrosit Fenotiplendirme Yöntemiyle Karşılaştırılması' başlıklı, Uz.Dr.Şule Mine Bakanay' a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 24 / 03 / 2011

Prof.Dr.Günhan Gürman
Hematoloji Bilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı

Prof.Dr.Akın Uysal
Hematoloji Bilim Dalı
Öğretim Üyesi

Prof.Dr.Önder Arslan
Hematoloji Bilim Dalı
Öğretim Üyesi
Tez Danışmanı

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'ndaki eğitim sürecimde emeği geçen tüm hocalarıma, Hematoloji Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Günhan Gürman'a, tez çalışmamın oluşmasında ve yürütülmesinde her türlü destek ve yardımı esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Önder Arslan'a, pediatrik hastaların çalışmaya dahil edilme sürecinde desteğini esirgemeyen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D. Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Zümrüt Uysal ve Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Talia İleri'ye, laboratuar çalışmasının yürütülmesini sağlayan Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D. Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı Başkanı, Emekli Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Nejat Akar'a ve genotiplendirme çalışmalarını büyük dikkat ve titizlikle gerçekleştiren Sayın Biyolog Ayşenur Öztürk'e, kan örneklerinin temin edilmesini sağlayan Pediatrik Hematoloji Laboratuarı'ndan Sayın Biyolog Ceyda Gürman'a, serolojik testlerin gerçekleştirilmesinde emeği olan Serpil Akdağ Kan Bankası Laboratuarı'ndan Sayın Suzan Yavaşoğlu ve Çiğdem Gençtürk'e, bilgilendirilmiş olur formlarının imzalanmasında destek veren Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D. hemşirelerine, çalışmaya maddi desteği sağlayan Türk Hematoloji Derneği'ne, ayrıca sevgili aileme ve eşime teşekkürü borç bilirim.

Uzm. Dr. Şule Mine Bakanay Öztürk

İçindekiler

Sayfa No:

Kabul ve Onay…….i

Önsöz ve Teşekkürler…….....ii

İçindekiler……. iii

Simgeler ve kısaltmalar dizini……... v

Şekiller dizini…….vi

Tablolar dizini……...vii

1.GİRİŞ ve AMAÇ…….1

2.GENEL BİLGİLER……4

2.1. Eritrosit Kan Grubu Sistemleri……4

2.2. Kan Grubu Antijenleri ve Antikorları……..4

2.3. İmmünhematolojide Aglütinasyon Testleri ……....5

2.4. Kan Grubu Çeşitliliğine Neden Olan Genetik Mekanizmalar…….9

2.5. Rh, Kell, Kidd,Duffy Kan Grubu Sistemleri…….10

2.5.1. Rh Kan Grubu Sistemi……10

2.5.2. RhCcEe Antijenleri…….14

2.5.3. Kell Kan Grubu Sistemleri……..16

2.5.4. Kidd Kan Grubu Sistemleri…….17

2.5.5. Duffy Kan Grubu Sistemleri……...18

2.6. Klinikte Eritrosit Genotiplemesinin Kullanım Alanları…….20

3. HASTA ve YÖNTEM……..22

3.1. Hastalar……..22

3.2. Aglütinasyon Testleri……22

Sayfa No:

3.3. Genotipleme için DNA Hazırlanması……22

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu…….23

3.5.Jel Elektroforezi ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi……..24

3.6.Etik Kurul Onayı…….25

4.BULGULAR…….26

4.1.Hastalar……...26

4.2.Genotip Oranları…….26

4.3.Alloimmünizasyon……..26

4.4.Genotip-fenotip Uyumu……. 26

5.TARTIŞMA…….. 28

6.SONUÇLAR…….33

ÖZET……34

SUMMARY……..35

KAYNAKLAR…….36

EK 1……..43

EK 2……..44

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

AHG : Anti-human globulin

bç : Baz çifti

DAT : Direkt antiglobulin testi

DNA : Deoxyribonükleik asit

EDTA : Etilendiamintetraasetilasitli

ES : Eritrosit süspansiyonu

FDA : Food and Drug Association

FYHH : Fötus ve yenidoğanın hemolitik hastalığı

İAT : İndirekt antiglobulin testi

OHA : Orak Hücreli Anemi

Rh : Rhesus

RNA : Ribonükleik asit

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SSP : Sekans Spesifik Primer

TBE : Tris+ Borik asit+ EDTA

PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu

Şekiller Dizini

Sayfa No:

Şekil 2.5.1. Rh protein ailesi şematik gösterimi …….11

Şekil 2.5.3. Kell ve Kx proteinleri…….. 17

Şekil 2.5.5. Duffy ve Kidd proteinleri ve polimorfik bölgelerinin şematik gösterimi……..19

Şekil 3.5.1. KKD sonucu jel fotografı …….25

Şekil 3.5.2. RHCE sonucu jel fotografı…… 25

Tablolar Dizini

Sayfa No:

Tablo 2.1. İnsan Kan Grubu Sistemleri……...7

Tablo 2.2. Klinik önem sırasına göre bazı kan grubu alloantikorlarının özellikleri……8

Tablo 2.4. Kan grubu sistemlerinde tek nükleotid polimorifzm (SNP) örnekleri…… 9

Tablo 2.5.1. Üç farklı populasyonda Rh antijenlerinin sıklığı ……10

Tablo 2.5.5. Farklı iki populasyonda Duffy alellerinin dağılımı……..19

Tablo 2.6 Kan grubu genotiplemenin kullanım alanları……...21

Tablo 3.4. PZR amplifikasyon parametreleri……24

Tablo 4.2. Hastalarda gözlenen genotip oranları……...21

Tablo 4.4. Genotip-fenotip uyumsuzluğu saptanan hastalar…….21

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Talasemi major ve orak hücreli anemi (OHA) gibi doğuştan itibaren kronik eritrosit transfüzyonuna bağımlı olan hastaların transfüzyon yönetimi tartışmalıdır. Bu hastalarda önceki transfüzyondan dolayı dolaşımda vericiye ait eritrositlerin bulunması kan merkezlerinde eritrosit fenotiplendirmesinin yeterince doğru yapılmasını önlemektedir. Hastaya sağlanan eritrosit süspansiyonunun(ES) hastanın gerçek fenotipiyle tam uyumlu olmaması hastanın kendisinde bulunmayan antijenleri içeren eritrositlere maruz kalmasına yol açmakta ve bu antijenlere karşı alloantikor geliştirme riskini arttırmaktadır. Klinik öneme sahip alloantikoru bulunan hastalar bu antikora karşılık gelen antijen içeren eritrositlerle karşılaştığında hemolitik transfüzyon reaksiyonları gelişebilmektedir. Bunun yanısıra, alloimmünizasyon nedeniyle verilen eritrositlerin yaşam süresi kısalmakta, hastaların daha kısa aralıklarla transfüzyon ihtiyacı olmaktadır. Sonuçta, hayatı boyunca transfüzyon alması gereken bu hastalar için transfüzyonlar komplike ve yararsız hale gelmektedir. Bu durum, kronik eritrosit transfüzyonunun en önemli yan etkisi olan demir yüklenmesini de arttırmaktadır.

Çeşitli ülkelerden kronik transfüzyon ihtiyacı olan talasemi hastalarında %5,3 ile %37 arasında oranla alloimmünizasyon bildirilmiştir(1-5). Türkiye'den yapılan bir çalışmada ise talasemili hastalarda alloimmünizasyon sıklığı %8,9 olarak saptanmıştır(6). Klinik olarak önemli bir antikor geliştiğinde hastanın ömür boyu bu antijeni içermeyen eritrositler ile transfüzyonu gerekli olmaktadır. Transfüzyon merkezleri alloimmünizasyonu azaltabilmek ve hastalara en uygun ve en uzun süre yaşayabilecek eritrosit ünitelerini sağlayabilmek için fenotipe dayalı eşleştirme protokolleri uygulamaktadır. Bazı merkezler hasta alloantikor geliştirdikten sonra antikora karşılık gelen antijeni içermeyen ES sağlarken diğer merkezler hasta ilk antikorunu oluşturduktan sonra fenotip uyumlu ES üniteleri sağlamaktadırlar. Bazı protokollerde sadece D, C, c, E, e, K antijenleri için uyum aranırken başka protokollerde panel genişletilerek D, C, E, c, e, K, Fy^a, Fy^b, Jk^a ve Jk^b ve hatta U, Js^b, hr^B uyumu aranmaktadır(7, 8). Sadece ABO ve D uyumlu ES üniteleri ile transfüzyon yapıldığında alloimmünizasyon oranı β-talasemi hastalarında %5-%33,

OHA hastalarında %19-%43, genel populasyonda ise %0,2 ile %2,8 arasında bulunmuştur(2, 9, 10). Buna karşılık ABO ve D'ye ek olarak Rhesus (Rh) altgrupları ve Kell sistemi antijenleri için fenotip uyumlu transfüzyonlarla talasemili çocuk hastalarda alloimmünizasyon oranının bir seride %33'ten %2,8'e, başka bir seride %23,5'ten %3,7'ye gerilediği gözlenmiştir(1, 11).

Dünyadaki kan merkezlerinde kullanılan fenotip uyumlu eritrosit sağlama stratejileriyle alloimmünizasyon kısmen kontrol altına alınmış olsa da hiçbirisi tam olarak yeterli koruma sağlayamamaktadır. Kronik eritrosit transfüzyonu bağımlı hastalar çocukluk çağlarından itibaren transfüzyon aldıkları için fenotiplendirme ilk transfüzyondan önce yapılmalıdır. Bu mümkün olamamış ise ileriki yaşlarda genotipleme yapılmalıdır. Yakın dönemde yapılmaya başlayan araştırmalar, bu hastalarda eritrosit antijenlerinin genotipinin belirlenmesi ve transfüzyonlarda bu genotipe uygun eritrosit süspansiyonlarının seçilmesinin alloimmünizasyonu önleyerek daha güvenli ve etkin transfüzyon sağlayabileceğini desteklemektedir(12-15). Kan grubu genotiplemesinin sağlık sistemine en değerli katkısı fötus ve yenidoğanın hemolitik hastalığının (FYHH) önlenmesi için prenatal Rh genotipleme ile D-negatif gebenin taşıdığı fetüsün Rh fenotipinin belirlenmesidir. Anti-D antikoru bulunduğu bilinen gebenin kanından elde edilen fötal DNA ile Rh genotiplemesi son yıllarda birçok ülkede artık rutin tanısal bir test halini almıştır.

Beta talasemi major hastaları hemoglobin düzeylerini 9,5-10,5 gr/dl tutacak şekilde 2-4 hafta arayla kiloya göre ayarlanacak şekilde bir veya iki ünite ES ihtiyacı duymaktadır. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik ve Erişkin Hematoloji Bilim Dalları'nda takip edilmekte olan bu hastaların tümünün RhD, RhCcEe ve Kell (KEL1, KEL2) bir kısmının ise Kidd ve Duffy kan grubu antijenleri Serpil Akdağ Kan Bankası Laboratuarı'nda daha önceden geleneksel aglütinasyon metoduyla belirlenmiş olup hastalara ihtiyaç duyulduğunda bu antijenlere uyumlu verici eritrositleri araştırılmaktadır. Aynı zamanda her defasında antikor tarama testleri de yapılıp yeni bir antikor gelişip gelişmediği kontrol edilmektedir. Ancak bu hastaların çoğunda fenotiplendirmenin ne zaman yapıldığı bilinmemektedir. Bu nedenle saptanmış olan antijen fenotiplerinin hastaların gerçek fenotiplerini ne ölçüde yansıttığı şüphelidir.

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Serpil Akdağ Kan Bankası'ndan sürekli ES üniteleri sağlanan çoğu beta talasemi major olan hastaların RhD, RhCcEe ve Kell (KEL1, KEL2), Kidd (Jka, Jkb), Duffy (Fya, Fyb) kan grubu antijenlerinin sekans spesifik primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (SSP-PZR) yöntemiyle genotip özelliklerinin belirlenmesi ve sonuçların aynı hastaların aglütinasyon yöntemleriyle saptanmış fenotip özellikleriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Eritrosit Kan Grubu Sistemleri

Eritrosit kan grubu antijenleri, eritrosit yüzeyinde bulunan, yapısal çeşitlilik gösteren kalıtsal oluşumlardır. Uluslararası Transfüzyon Cemiyeti tarafından 30 farklı kan grubu sisteminde 270 civarında kan grubu antijeni bulunduğu bildirilmektedir(16, 17). Bu sistemler içinde P1/P2 polimorfizmi hariç bütün genler klonlanmış ve birkaç tanesi hariç tümünün moleküler özellikleri belirlenmiştir(Tablo 2.1.). Kan grubu sistemlerinden 26 tanesi tek bir genden, 3 tanesi (Rh, Xg, ve Chido/Rodgers) iki genden ve 1 tanesi (MNS) üç homolog genin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. ABO, P, Lewis, H, I ve Globosid sistemlerinin antijenleri glikoprotein ve glikolipidler üzerindeki karbonhidrat yapılardır ve karşılık gelen genler oligosakkarid zincir sentezini katalizleyen glikoziltransferaz enzimlerini kodlarlar. Geriye kalan 24 sistemin antijenleri protein yapısındadır(18, 19).

2.2.Kan Grubu Antijenleri ve Antikorları

Kan grubu antijenlerden en önemlileri major kan grubu antijenleri olarak da kabul edilen A, B, O ve Rh(D) antijenleridir. Kişinin kendi eritrositlerinde bulunmayan eritrosit antijenine yönelik, görünür bir bağışıklanma sonucu oluşmamış antikorlara doğal antikorlar adı verilir. Bu antikorlar hemen daima karbonhidrat yapısındaki antijenlere yöneliktir, genellikle IgM sınıfındandır, plasentadan geçmezler, antijenle <37°C'de reaksiyona girerler ve direk aglütinasyona neden olurlar. Anti-A, anti-B bu tip antikorlardır. Bir birey kendi eritrositlerinde bulunmayan antijeni içeren eritrositlere maruz kaldığında bireyin bağışıklık sistemi uyarılıp ilgili antijenle reaksiyon verebilen antikorları (alloantikor) üretebilir. Bu durum alloimmünizasyon olarak tanımlanmaktadır. Alloantikorlar genellikle eritrositlerin protein yapılarına yönelik (Rh, Kell, Kidd, Duffy gibi) oluşur, IgG yapısındadır, plasentadan geçebilirler, antijenle en uygun 37°C'de reaksiyona girerler, direk aglütinasyon yapamazlar ve genellikle ekstravasküler hemolize neden olurlar(20).

ABO kan grubu sistemini tanıyan antikorlar klinik açıdan en önemli antikorlardır. Transfüzyon pratiğinde gözlenen diğer önemli antikorlar sıklığı azalacak şekilde: anti-D, anti-K, anti-E, anti-c, anti-Fy^a, anti-C, anti-Jk^a, anti-S, ve anti-Jk^b'dir. Bu antikorlar hemolitik transfüzyon reaksiyonları veya FYHH'na yol açabilirler Tablo 2.2.'de bazı alloantikorların klinik önemleri özetlenmiştir(20, 21). Rh antikorları doğal antikor değildir ve hemen her zaman gebelik veya transfüzyonla eritrosit duyarlanması sonucunda oluşur ve dolaşımda uzun yıllar bulunurlar. Anti-D ciddi transfüzyon reaksiyonları ve FYHH oluşturur. Diğer Rh antikorlarının çoğunun klinik açıdan önemli sonuçlar doğurabilme potansiyeli bulunmaktadır. Antikor seviyesi saptanamayacak titrelere düşse de antijenle bir sonraki karşılaşma ile hızlı ikincil bir bağışıklık yanıtı oluşacağından hasta ömür boyu antijen-negatif ES ile transfüzyon yapılmalıdır(20, 22). Fötus ve yenidoğanın hemolitik hastalığı annenin IgG tipi antikorlarının plasentayı geçerek fötusun antijen-pozitif ES'lerine bağlanması ve ES'lerinin yıkımı ve sonucunda gelişen anemi ile karakterizedir. Annenin alloimmünizasyonun %50'sinden D antijeni geri kalanından K, c, C, E, ve Fya antijen uyumsuzluğu ve çok nadiren de diğer Rh antijenleri, MNS ve Diego kan grubu sistemleri sorumludur(23).

2.3.İmmünhemotolojide Aglütinasyon Testleri ve Uygun Eritrosit Ünitelerinin Araştırılması

Güvenli eritrosit transfüzyonu için uyulması gereken en önemli kural, eritrosit ünitelerinin ABO ve Rh(D) uyumlu olmasıdır. ABO ve Rh(D) grubu dışındaki antikorları araştırmak için antikor tarama testleri yapılır. Hasta serumunda eritrosit antikorlarının bulunup bulunmadığı in vitro olarak aglütinasyon yöntemleriyle ortaya konur.

Eritrositleri kaplayan IgG tipinde inkomplet antikorlar izotonik tuzlu suda eritrositleri aglütine edemez. Ortama hayvanlardan hazırlanmış insan IgG'sine karşı antikorlar (anti-IgG, AHG) içeren serum eklendiğinde aglütinasyon gerçekleşir. Direkt antiglobulin testi (DAT) adı verilen bu test eritrositlere in vivo yapışmış IgG sınıfından allo veya otoantikorların saptanmasında kullanılır. İndirekt antiglobulin testi (İAT) ise hasta serumunda serbest dolaşan, eritrositlere yapışmamış inkomplet

antikorların saptanmasında kullanılır. Rh-Rh uyuşmazlığında, gebe kadınların prenatal izleminde, eritrosit transfüzyonu öncesi alıcı serumunda antikor taramada bu testten yararlanılır. Alloantikorlar aranırken incelenecek olan hasta serumu önce antijenleri bilinen 2'li veya 3'lü O grubu panel eritrositleriyle inkübe edilir. Serumda IgG antikorları varsa bu eritrositlere yapışır. Sonra bu eritrositler yıkanarak serum uzaklaştırılır ve AHG eklenerek aglütinasyon gözlenir Antikor taramada alloantikor varlığının saptanması durumunda antikor tanımlanarak klinik öneminin saptanması gerekir. Bu amaçla, antikor taramada olduğu gibi O grubu ve antijenik özellikleri bilinen eritrositlerden 10'lu panel kullanılır. Panel hücreleri ile antikor taraması yapılmak istenen serum İAT prensibiyle bir araya getirilir. Reaktivitenin bulunmadığı test eritrositleri üzerinden antikor dışlama çalışmasıyla serumdaki antikor belirlenmeye çalışılır. Antikor tarama işleminde alloantikor saptanmazsa ABO ve Rh uygunluğu bulunan eritrosit çapraz karşılaştırma ile hastaya verilebilir. Eğer alloantikor saptanırsa ABO ve RhD uygunluğunun yanısıra saptanan antikorun antijeni için negatif eritrosit seçilir ve AHG fazında çapraz karşılaştırma ile uygunluğu gösterilerek hastaya verilir. Çapraz karşılaştırma İAT prensibine dayanarak hastanın serumu ve hastaya verilmek üzere seçilen verici ES'deki eritrositlerin karşılaştırılmasıdır, transfüzyon öncesi son kontrol aşamasını oluşturur. Sıcak otoimmün hemolitik anemiler veya bazı ilaçların neden olduğu otoimmün hemolitik anemilerde gelişen otoantikorlar sıklıkla özgün olmayan antikorlardır ancak bazen sık gözlenen Rh antijenlerine karşı (en sık anti-e) otoantikorlar da gelişmektedir. Bu otoantikorlar test edilen tüm eritrositlerle reaksiyon verebilirler bu nedenle antikor tanımlamayı güç hale getirirler. Böyle durumlarda otoantikorların altında önemli alloantikorların bulunmadığının transfüzyon öncesinde gösterilmesi gerekmektedir. Rh antijenlerinin değerlendirilmesi ise bireyin %5 eritrosit süspansiyonunun ticari anti-serumlar (anti-D, anti-c, anti-E, anti-C, anti-e) ile karşılaştırılıp aglütinasyonun gözlenmesi prensibine dayanır(20, 24, 25).

Tablo 2.1.İnsan Kan Grubu Sistemleri

Numara	**İsim**	**Sistem sembolü ve UKTC[a] gen ismi**	**Antijen sayısı**	**HUGO gen sembolü[b]**	**Kromozom**
001	ABO	ABO	4	*ABO*	9q34.2
002	MNS	MNS	46	*GYPA,GYPB, GYPE*	4q31.21
003	P	P1	1	*P1*	22q11.2-qter
004	Rh	RH	50	*RHD,RHCE*	lp36.11
005	Lutheran	LU	19	*BCAM*	19q13.32
006	Kell	KEL	31	*KEL*	7q34
007	Lewis	LE	6	*FUT3*	19p13.3
008	Duffy	FY	6	*DARC*	lq23.2
009	Kidd	JK	3	*SLC14A1*	18q12.3
010	Diego	DI	21	*SLC4A1*	17q21.31
011	Yt	YT	2	*ACHE*	7q22
012	Xg	XG	2	*XG,CD99*	Xp22.33
013	Scianna	SC	7	*ERMAP*	1p34.2
014	Dombrock	DO	6	*ART4*	12p12.3
015	Colton	CO	3	*AQP1*	7p14
016	Landsteiner-Wiener	LW	3	*ICAM4*	19pl3.2
017	Chido/Rodgers	CH/RG	9	*C4A,C4B*	6p21.32
018	H	H	1	*FUT1*	19q13.33
019	Kx	XK	1	*XK*	Xp21.1
020	Gerbich	GE	8	*GYPC*	2q14.3
021	Cromer	CROM	15	*CD55*	1q32.2
022	Knops	KN	9	*CR1*	1q32.2
023	Indian	IN	4	*CD44*	11p13
024	Ok	OK	1	*BSG*	19p13.3
025	Raph	RAPH	1	*CD151*	11p15.5
026	John Milton Hagen	JMH	5	*SEMA7A*	15q24.1
027	I	I	1	*GCNT2*	6p24.2
028	Globoside	GLOB	1	*B3GALT3*	3q26.1
029	Gill	GIL	1	*AQP3*	9p13.3
030	RHAG	RHAG	3	*RHAG*	6

[a]Uluslar arası Kan Transfüzyon Cemiyeti

[b]İnsan Genom Organizasyonu

Tablo 2.2. Klinik önem sırasına göre bazı kan grubu alloantikorlarının özellikleri

			Klinik	
Antikor özgünlüğü	**IgM (doğrudan)**	**IgG (dolaylı)**	**Transfüzyon Reaksiyonu**	**FYHH**
ABO	Sık	Bazen	Erken; hafif-ciddi	Sık; hafif-orta
H (Bombay)	Sık	Bazen	Erken; hafif-ciddi	Hafif-ciddi
Rh	Bazen	Sık	Erken/gecikmiş; hafif-ciddi	Sık; hafif-ciddi
Kell	Bazen	Sık	Erken/gecikmiş; hafif-ciddi	Bazen; hafif-ciddi
Kidd	Az	Sık	Erken/gecikmiş; hafif-ciddi	Nadir; hafif
Duffy	Nadir	Sık	Erken/gecikmiş; hafif-ciddi	Nadir; hafif
S	Bazen	Sık	Gecikmiş;hafif	Nadir; hafif-ciddi
s	Nadir	Sık	Gecikmiş;hafif	Nadir; hafif-ciddi
U	Nadir	Sık	Hafif-ciddi	Nadir; ciddi
$PP1P^k$	Sık[a]	Sık[a]	Hafif-ciddi	Hafif-ciddi[b]
Vel	Sık[a]	Sık[a]	Hafif-orta	Hafif-ciddi
Diego	Bazen	Sık	Gecikmiş; hiç-ciddi	Hafif-ciddi
Colton	Nadir	Sık	Gecikmiş; hafif	Nadir;hafif-ciddi
Lutheran	Bazen	Sık	Gecikmiş	Nadir; hafif
Dombrock	Nadir	Sık	Erken/gecikmiş;hafif-ciddi	Nadir;hafif
M	Bazen	Sık	Gecikmiş;nadir	Nadir;hafif
N	Sık	Nadir	Yok	Yok
LW	Nadir	Sık	Gecikmiş;hiç-hafif	Nadir; hafif
Yt^a	Nadir	Sık	Gecikmiş; hiç-hafif	Yok
Ch/Rg	Nadir	Sık	Anaflaktik	Yok
JMH	Nadir	Sık	Gecikmiş, nadir	Yok
P1	Sık	Nadir	Yok (Nadir)	Yok
Le^a	Sık	Az	Erken(Nadir)	Yok
Le^b	Sık	Az	Yok	Yok
I	Sık	Nadir	Yok; hafif (I-erişkin)	Yok
Knops	Nadir	Sık	Yok	Yok
Xg^a	Nadir	Sık	Yok	Yok

[a]Antikorlar hem IgM hem IgG tipindedir.

[b]Fetüs hücrelerinde hemoliz nadirdir; tekrarlayan kendiliğinden düşükler sıktır.

2.4.Kan Grubu Çeşitliliğine Neden Olan Genetik Mekanizmalar

Kan grubu çeşitliliği farklı mekanizmalar sonucunda meydana gelmektedir. Bunlardan en sık görüleni tek nükleotid polimorfizmidir (SNP). Eksonlarda missens SNP'ler sonucunda ya karbonhidrat antijenleri sentezleyen glikoziltransferaz enziminde ya da protein yapının hücre membranı dışına bakan yüzeyinde oluşan tek amino asit değişikliği bu çeşitliliğe neden olmaktadır. Kan grubu sistemlerinde önemli antijenlerle ilişkili SNP'ler tablo 2.4.'de gösterilmiştir. Nonsense SNP'ler erken gelen 'stop' kodonu oluşturup protein sentezini durdurarak etki göstermektedir. $Duffy_{null}$ Fy(a–b–) örneğinde olduğu gibi genin promotör bölgesinde oluşan SNP sonucunda eritrositlerde bu genin transkripsiyonu sağlayan faktör buraya bağlanamadığından gen ifade edilememektedir. Tek nükleotid polimorfizmleri eritrosit membranında sadece antijen ifadesini değiştirmekle kalmaz aynı zamanda antijen sayısını da etkileyebilirler. Intron-ekson arası kesim bölgelerindeki SNP'ler transkripsiyon sırasında önceki veya sonraki eksonların okunamayıp atlanmasına sebep olabilir. Polonyalılar'da gözlenen Jk_{null} fenotipi böyle bir bozukluk sonucunda oluşmaktadır. Bir genin tamamının delesyonu sonucu oluşan kan grubu çeşitliliğine tek örnek Rh sisteminin D polimorfizmidir. Tek nükleotid delesyonuna örnek ise ABO sisteminin O ve A2 alelleridir. Homolog genler arasında oluşan rekombinasyon veya konversiyon olayları ile genlerin yeniden düzenlenmesi kan grubu ifadesini farklı şekillerde etkileyebilir. Örneğin *RHD* ve *RHCE* genleri arasında çapraz değişikliklerle oluşan hibrid genler yeni antijenik yapıların ve sonuçta az rastlanan fenotiplerin ortaya çıkmasına yol açmaktadırlar(16, 26).

Tablo 2.4. Kan grubu sistemlerinde tek nükleotid polimorifzm (SNP) örnekleri

Sistem Sembolü	Antijen 1	Kritik SNP noktası (amino asit değişikliği)	Antijen 2
ABO	A	C796A,G803C (Leu266Met, Gly168Ala)	B
MNS	M S	C59T, G71A, T72G (Ser1Leu,Gly5Glu) T143C (Met29Thr)	N s
RH	C E	T307C (Ser103Pro) C676G (Pro226Ala)	c e
Lu	Lu^a Au^a	A252G (His77Arg) A1637G (Thr539Ala)	Lu^b Au^a
KEL	K1 Kp^a	T698C (Met193Thr) T961C (Trp281Arg)	K2 Kp^b
FY	Fy^a	G125A (Gly42Asp)	Fy^b
JK	Jk^a	G838A (Asp280Asn)	Jk^b
DI	Di^a	C2561T (Leu854Pro)	Di^b
DO	Do^a	A793G (Asn265Asp)	Do^b
LW	LW^a	A308G (Gln70Arg)	LW^b

2.5. Rh, Kell, Kidd, Duffy Kan Grubu Sistemleri

2.5.1. Rh Kan Grubu Sistemi

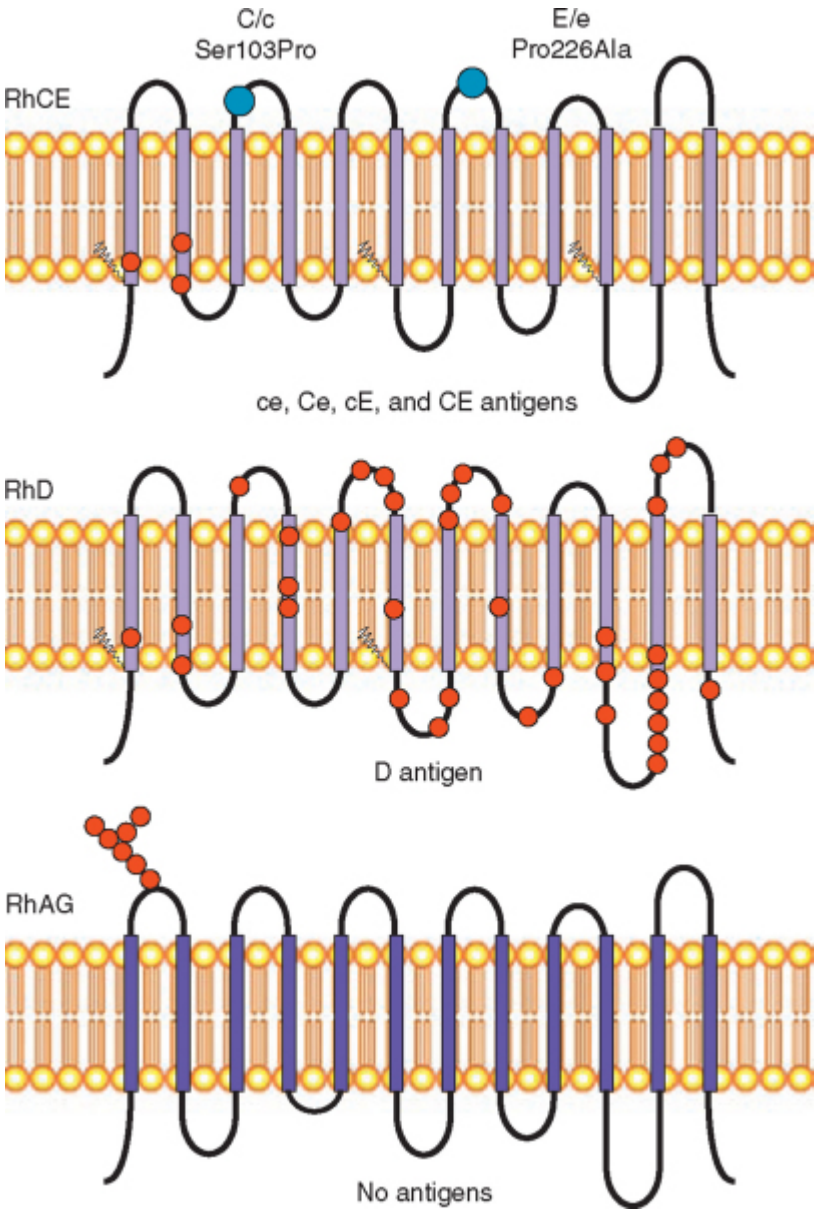
Rh sistemi kan grubu sistemlerinin en karmaşık olanı ve transfüzyon tıbbında ABO'dan sonra gelen en önemli kan grubu sistemidir. Çünkü başta D antijeni olmak üzere Rh antijenlerinin immünojenik özellikleri yüksektir. Beyaz ırkın %82-%88'i D-pozitiftir, bu oran Afrikalı zencilerde daha yüksek, doğu Asya topluluklarında ise hemen hemen %100'dür (Tablo-2.5.1.) (16). Güneydoğu Asya yerlilerinde D-negatif fenotip çok nadir görüldüğü için anti-D'ye bağlı FYHH bir klinik problem değildir. Örneğin Tayvan'da D-pozitifliği o kadar yüksek oranda görülmektedir ki 1988'den beri kan vericilerine D tiplendirmesi yapılmamaktadır ve bu uygulamaya rağmen anti-D insidansında artış olmadığı belirtilmektedir(27).

Tablo 2.5.1. Üç farklı populasyonda Rh antijenlerinin sıklığı

Antijen	İngiliz(%)	Nijeryalı(%)	Çinli(%)
D	83	95	100
C	68	17	94
c	81	99	43
E	29	23	36
e	98	99	96

Rh proteinleri (RhD ve RhCE) Rh antijenlerini taşırlar ve eritrosit membranının lipid çift katmanında yağ asitlerine kovalent olarak bağlamışlardır. RhD ve RhCE proteinleri birbirleriyle %93,8 oranında aminoasit dizi benzerliği göstermekte, yapıları 12 transmembran kıvrımdan oluşmakta, membran dışına uzanan 6 kıvrımı bulunmakta ve amino-ve karboksi- uçları sitoplazmaya uzanmaktadır (Şekil 2.5.1.) (28). Son yıllarda, Rh proteinlerinin eritrosit yüzeyinde ifade edilebilmeleri için Rh-ilişkili glikoprotein (Rh associated glycoprotein; RhAG) adı verilen proteinin membranda bulunması gerektiği anlaşılmıştır. Rh-ilişkili glikoprotein, Rh proteinleriyle %40 homologtur. Rh proteinleri ile RhAG birlikte 'Rh protein ailesi' olarak tanımlanırlar. Eritrosit membranında bulunan ve topluca 'Rh aksesuar proteinleri' olarak adlandırılan bazı proteinlerin [CD47 (integrin-ilişkili protein), LW

kan grubu antijeni ICAM-4, glikoforin B, band 3] Rh protein ailesi ile yakın etkileşim içinde oldukları düşünülmektedir. Rh protein ailesi ve Rh aksesuar proteinlerine birlikte 'Rh kompleksi' adı verilmektedir(25).



Şekil 2.5.1. Rh protein ailesi şematik gösterimi (20)

Rh proteinleri 2 gen tarafından kodlanırlar : RhD proteinini kodlayan *RHD* geni ve RhCE proteinini kodlayan *RHCE* geni 10 ekson içerirler ve 1.kromozom üzerinde kuyruk-kuyruğa *(3'RHD5'-5'RHCE3')* dizilmişlerdir, aralarında SMP1 adı verilen başka bir gen vardır. *RHD* geni D antijenini, *RHCE* geni ise C/c, E/e, C^w, C^x ve VS antijenlerini kodlamaktadır (29). *RHAG* geni de 10 eksona sahiptir ve 6. kromozom üzerinde bulunur(30). Bu gendeki işlev bozucu bazı mutasyonlar RhAG proteini ile beraber diğer Rh proteinlerinin de membranda bulunmamasına sebep olurlar ve hiçbir Rh antijeninin ifade edilmediği çok az rastlanan Rh_{null} fenotipini oluştururlar(31).

D-negatif fenotip, RhD proteininin eritrosit membranında bulunmaması olarak tanımlanabilir. Avrupalılar'da RhD proteininin yokluğu, hemen her zaman *RHD* geninin homozigot delesyonu sonucunda gelişir(32). Buna karşılık Afrikalı zencilerde D antijeni oluşturmayan üç farklı Rh haplotipi gözlenmektedir: Birincisi, beyazlarda sık görülen *RHD* geninde homozigot delesyon bulunan tiptir. İkincisi (RHDψ), *RHD* genininde okunma değişikliği veya erken gelen 'stop' kodonu oluşturabilecek şekilde 37 bazçiftlik (bç) duplikasyon ve beraberinde 6. eksonda nonsense mutasyon (Tyr269stop) ile karakterizedir(33). Üçüncüsü (*RHD–CE–Ds; Cde^s)* ekson 1, 2 ve 8-10'un *RHD*'den, ekson 4-8'in *RHCE*'den geldiği ve ekson 3'ün ise ya tamamen *RHD*'den ya da hibrid *RHD-RHCE* eksondan geldiği bir hibrid gen ile karakterizedir. Bu hibrid gen D antijeni üretemez ve anormal bir C antijeni üretir. *RHD–CE–Ds* genellikle c, zayıf e ve VS üreten bir *RHCE* geniyle cis pozisyonda bulunur(34,35). Buradan da anlaşılacağı üzere D negatif fenotipe *RHD* delesyonunun yanısıra çok çeşitli varyant D alelleri de neden olabilmektedir. Moleküler özellikler her zaman fenotiple uyumluluk göstermeyebilir. Bu çeşitliliği düzene sokabilmek amacıyla *RHD* alleleri kısmi D, zayıf D ve DEL olarak sınflandırılmıştır.

Monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalar D antijeninin 30'dan fazla epitopa sahip olduğunu göstermiştir. Bazı epitopların bulunmadığı varyant D fenotipleri 'kısmi D' olarak tanımlanır. Kısmi D antijenleri sıklıkla RhD proteininin hücre dışında kalan kıvrımlarında aminoasit değişikliğine sebep olan nokta mutasyonlar, bazen de *RHD*

geninin bir kısmının *RHCE* geninin karşılık gelen bölgeleriyle yer değiştirmesi sonucunda oluşmaktadır. D kategorileri (DII-DVII) kısmi D'nin alt gruplarıdır. DIII, DIV, DV ve DVI genellikle *RHD-CE-D* hibrid allelleri ile oluşmaktadır. Örneğin Avrupalılar'da gözlenenen en önemli kısmi D olan DVI, birçok D epitopunu kaybetmiş bir varyanttır ve geninin 1-3 ve 7-10. exonları *RHD* dizilerinden, 4-6.exonları ise *RHCE* dizilerinden oluşmaktadır. Böylece oluşturulan hibrid protein RhD proteinine benzerliği nedeniyle membranda kararlı bir halde bulunurken aslında normal RhD proteininde bulunması gereken bazı epitopları taşımamaktadır. Bu durum kısmi D taşıyan bireylerin normal D antijeniyle karşılaştıklarında antikor üretmelerine sebep olmaktadır(16). Bu nedenle bu bireylerin alıcı olarak RhD negatif kabul edilip D-negatif eritrosit transfüzyonu almaları ve gebelikte Rh-immünglobulini ile profilkasi yapılmaları gereklidir, verici olacaklar ise RhD pozitif olarak kabul edilmelidirler. *RHD-CE-D* hibrid genlerinin yanısıra *RHCE-D-CE* hibrid genleri de bulunmakta ve bazı az rastlanan CcEe varyantlarını oluşturmaktadır. Hibrid genler muhtemelen mayoz bölünme sırasında aynı kromozon üzerinde eşleşme ve ardından gen konversiyonu mekanizmalarıyla meydana gelmektedir(32).

Bazı D varyantlarında (Zayıf D; D^u) ise normal D epitopları vardır ancak hepsi veya bazısı zayıf olarak ifade edilirler. Zayıf D varyantlarında aminoasit değişiklikleri genellikle RhD'nin hücre içi veya membran içi bölgelerinde bulunmaktadır(36). Zayıf D fenotipini kodlayan genler incelendiğinde *RHD* diziliminin normal olduğu ancak RHD mRNA miktarında belirgin azalma bulunduğu gözlenmiş, burada sorunun transkripsiyon veya mRNA öncesi aşamalarda olduğu ileri sürülmüştür. Hücre yüzeyinde ifade edilen D antijeni sayıca azalmıştır ancak yapısal olarak değişikliğe uğramamıştır. Bu nedenle zayıf D fenotipine sahip bireylerin büyük bir kısmı anti-D oluşturmadığından güvenle D-pozitif eritrosit alabilirler(16, 37).

DEL (D_{el}) çok zayıf ifade edilen D antijenidir. Altta yatan moleküler değişiklik zayıf D'deki değişikliklerden daha etkilidir ve proteinin membranla bütünleşmesine ciddi olarak karşı koyar ancak tamamen engelleyemez. DEL, Avrupalılar'da nadirdir ancak Doğu Asya'da D-negatif olan donörlerin %30'a yakınının DEL *RHD(K409K)*

taşıdığı saptanmıştır(38). D-negatif ve DEL fenotiplerinin serolojik yöntemlerle birbirinden ayıredilmelerinin zor olması ve DEL fenotipinde de anti-D alloimmünizasyonu riskinin bulunması nedeniyle DEL tanımlanması için moleküler yöntemlerin kullanılması uygun görünmektedir(39).

RhD varyantları oluşturan genetik değişiklikler farklı etnik gruplarda çeşitlilik göstermektedir. Varyant Rh antijenlerinin araştırılmasında moleküler metodlar geleneksel serolojik yöntemlere üstünlük göstermektedir. Hastanın veya vericinin varyant D taşıyıp yaşımadığının anlaşılması anti-D oluşumunu uyarabilme özelliği ve oluşan antikorların klinik açıdan önemli sonuçlar doğurup doğurmayacağının belirlenmesi açısından önemlidir. Varyant D antijenlerinden çok azının sıklığının 1-2/1000'nin üzerine çıktığı ve ayrıca rapor edilmiş alloimmünizasyon ve FYHH sayısının az olduğu göz önünde tutulacak olursa moleküler metodların sadece D varyantın polimorfik olduğu bilinen toplumlarda ve antikor oluşumunu uyardığı bilinen varyantların analizinde kullanılması uygun görünmektedir. Avrupalılarda gözlenen DVI serolojik yöntemlerle kolaylıkla gösterilebilirken, polimorfik D varyantların daha sık gözlendiği Afrika kökenli bireylerde DIVa, DAU, DIIIa ve DAR51 varyantlarının ayırt edilebilmesi için moleküler metodlar gerekli olmaktadır(37).

2.5.2. RhCcEe antijenleri

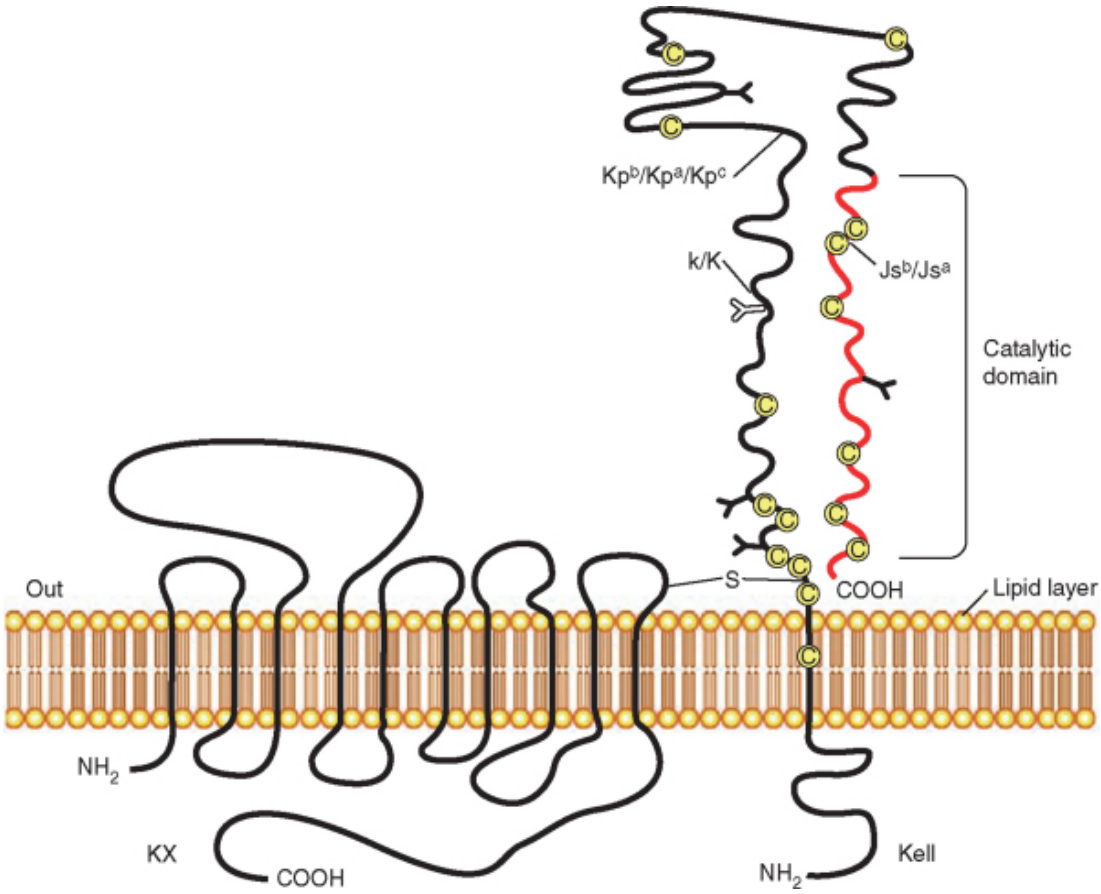
RHCE genindeki SNP'ler (48C>G, 178A>C, 203G>A, 307T>C) karşılığında RhCcEe proteininde oluşan 4 amino asit değişikliği (Cys16Trp; Ile60Leu; Ser68Asn; Ser103Pro) C/c polimorifzmi ile ilişkilidir. Ancak C veya c aktivitesini belirleyen en önemli SNP hücre dışı ikinci kıvrımdaki Ser103Pro (307T>C) değişikliğidir. E/e polimorfizmi ise *RHCE* genindeki tek bir SNP (676C>G) sonucunda proteinin hücre dışı dördüncü kıvrımda Pro226Ala değişikliği sonucunda oluşmaktadır(40, 41). Rh epitopları konformasyonel değişiklikler gösterirler. Bunun sonucunda proteinin membran içindeki kısımdaki tek bir aminoasit değişikliği bile yeni bir antijen oluşturabilir veya diğer antijenlerin ifadesini etkileyebilir. Buna örnek olarak Afrikalılar'da polimorfik olan VS antijeni verilebilir. *RHCE* geninin 5. eksonundaki

bir SNP, proteinin membran içindeki 8. kıvrımında Leu245Val değişikliğine yol açar. Sonuçta oluşan konformasyonel değişiklik VS antijeninin ifade edilip edilmeyeceğini belirler. Bu durum aynı zamanda zayıf e ekspresyonu ile beraberdir(35). Kısmi C, c, E,e antijenleri hem nadirdir hem de çoğunun alloimmünizasyon riski düşüktür bu nedenle klinik önemleri kısıtlıdır. Bazı fenotipler (D–, Dc- ve DC^w-), artmış D ifadesi ile birlikte CE ifadesinin hiç olmadığı veya kısmen olduğu durumlardır. Bireyler CE ifadesi olmadığından antikor (anti-Rh17) üretebilirler.

The Rh_{null} fenotipi (Rh_{null} sendromu) çok nadir gözlenmektedir (yaklaşık $1/6x10^6$) ve sıklıkla akraba evlilikleri sonucu gelişmektedir. Bu fenotipe sahip bireylerin eritrositlerinde Rh proteinleri ve antijenleri bulunmamaktadır. Stomatositoz, sferositoz, artmış ozmotik frajilite, bozulmuş fosfolipid asimetrisi, hücre volümü ve elektrolit transport kontrolünün kaybolması bu sendromda eritrosit membranında önemli yapısal bozuklukların geliştiğini işaret etmektedir. Rh_{null} eritrositlerin yaşam süreleri kısalmıştır ve hastaların çoğunluğunda dengelenmiş hemolitik anemi vardır. Bazen bu hemolitik anemi splenektomi gerektirecek kadar ciddi olabilir. Rh_{null} fenotipinin iki temel kalıtım şekli vardır: Çekinik kalıtılan amorf tip, homozigot *RHD* gen delesyonuyla birlikte homozigot *RHCE* işlev bozucu mutasyonun beraberliğinden doğmaktadır. Sonuçta Rh proteinlerinin hiçbirisi üretilememektedir(42, 43). Düzenleyici (Regulator) tip, *RHAG* geninde homozigot işlev bozucu mutasyonlar sonucunda gelişmektedir. Bazen *RHAG* geninde homozigot missens mutasyonlar Rh antijenlerinin azalmış ifadesine neden olabilmektedir (Rh_{mod} fenotipi)(44). Rh_{null} fenotipe sahip bireyler kolaylıkla tüm Rh proteinine (anti-Rh29), RhCc/Ee proteinine (anti-Rh17), D, C antijenlerine veya bunların birçoğuna birden antikorlar üretebilirler. Antikoru olan bireylerde transfüzyon çok sorunludur sadece Rh_{null} fenotipe sahip donörler bulunması gerekir. Hem nadir görülmesi hem de hemolitik anemi bulunması bu bireylerin uygun donör olmalarını da engellemektedir(25).

2.5.3. Kell Kan Grubu Sistemi

Kell glikoproteini 31 antijen içeren, membranı tek defa geçerek membran dışında çok kıvrımlı büyük bir yapı oluşturan bir endopeptidazdır ve membranda Xk proteinine kovalent olarak bağlıdır(45). Bu sistemdeki SNP'ler k/K (578C>T), Kp^b/Kp^a (841C>T) ve Js^b/Js^a (1790T>C) sırasıyla T193M, R281W, L597P şeklinde aminoasit değişiliklerini oluşturur(46, 47) (Şekil-2). En immünojenik olan antijen K (KEL1)'dır. Beyazlarda K (KEL1) %9, k (KEL2) ise >%99 sıklıkla gözlenmektedir. Kell glikoproteinin eritropoezin erken dönemlerinde ifade edilmeye başlanması ve anti-K'nın in vitro eritropoezi baskıladığının gösterilmesi bu sistemin eritropoezde fonksiyonel bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. Zayıf kell ekspresyonu kalıtsal olabileceği gibi geçici olarak edinilmiş de olabilir. Kell sisteminin antijenlerinin geçici depresyonu otoimmün hemolitik anemi, infeksiyonlarda gözlenebilir. Bazı genetik değişiklikler K_{null} fenotipine yol açmaktadır. X'e bağlı kalıtılan XK geni Xk proteini ve Kx antijenini üretmektedir. Xk proteini ve Kell glikoproteini eritrosit membranında yakın etkileşim içindedirler. Erkeklerde hemizigot mutasyon sonucunda Xk proteininin yokluğu aynı zamanda kell antijenlerinin ifadesini de zayıflatmaktadır. Bu geç başlangıçlı X'e bağlı geçişli nöroakantozis tablosuna McLeod sendromu adı verilir. Tipik olarak hastalık kendisini erkeklerde, kırklı yaşlardan sonra nöromüsküler sorunlarla gösterir; hastalarda artmış kreatin kinaz düzeyi ve akantositoz bulunmaktadır(48).



Şekil 2.5.3. Kell ve Kx proteinleri(20). Kell ve Kx birbirine disülfit bağ ile bağlıdır. Sık görülen Kell antijenleri gösterilmiştir. K(KEL1) proteininde k(KEL2)'den farklı olarak N-glikozilasyon bölgesi bulunmamaktadır.

2.5.4. Kidd Kan Grubu Sistemi

Jk/HUT11 proteini membranı 10 defa dolaşan bir üre transport proteinidir. Bu protein Kidd kan grubu sisteminin antijenlerini içermektedir (Şekil-3). Jk molekülünün üre transportunda görev aldığı için tüm Jk antijenlerinden yoksun olan eritrositler 2M üre ortamında direnç gösterirler. Kidd sisteminin ifade edilmemesi açık bir hastalığa neden olmamakta ve tek bulgu idrarı konsantre etme kapasitesinde azalma şeklinde gözlenmektedir(49). Kidd sisteminin geni (SLC14A1) 18. kromozom üzerinde bulunur ve SNP (838G>A) Jk proteininin hücre dışındaki

dördüncü pozisyonunda (Asp280Asn) değişikliği yaparak Asp(Jka) veya Asn(Jkb) polimorfizmini meydana getirmektedir(50). Nadir görülen Jk(a−b−) (Jk_{null}) fenotipine Polonyalılar başta olmak üzere, bazı Asya toplulukları ve Finliler'de (871T>C) daha sık rastlanmaktadır(51). Anti-Jk^a ve anti-Jk^b sık rastlanan antikorlar değildir ancak gecikmiş tip hemolitik transfüzyon reaksiyonlarının en az üçte birinden sorumludurlar. Bu antikorlar sıklıkla tespit edilemeyecek seviyeye düşer veya sadece antijen için homozigot olan eritrositlerle reaksiyona girer ve bu nedenle duyarlanmış bireyin serumunda saptanamayabilir(52).

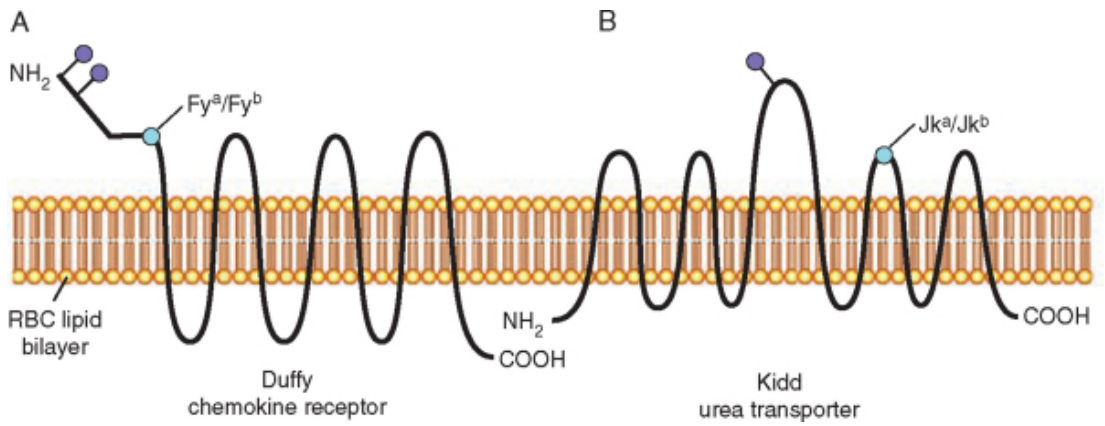
2.5.5. Duffy Kan Grubu Sistemi

Duffy glikoproteini (Duffy antijeni-kemokin reseptörü, DARC) birçok kemokin için reseptör görevi yapmaktadır ve ortamdaki fazla kemokinleri sünger gibi emerek azalttığı düşünülmektedir. Plasmodium vivax merozitleri Duffy reseptörleri aracılığıyla eritrositlere girerek hastalık yapmaktadır(53). Duffy geni *(FY veya DARC)* 1. kromozom üzerinde bulunur ve iki eksona sahiptir. Duffy geninin ikinci eksonundaki 125G>A şeklindeki SNP, Duffy proteininin hücre dışına bakan amino ucundaki 42. pozisyonda bir aminoasit değişikliğine [Gly(Fy^a) veya Asp(Fy^b)] yol açarak Fy^a/ Fy^b polimorfizmini oluşturmaktadır(54, 55). Beyazlarda Fy^a %68, Fy^b ise %80 oranında gözlenmektedir. Beyaz ve siyah ırkta gözlenen Fy^a/ Fy^b polimorfizm sıklığı tablo-5'te gösterilmiştir(37). Afrikalı Amerikalılar'ın %70, Batı Afrikalılar'ın %100'ünün eritrositlerinde Fy^a ve Fy^b bulunmamaktadır. Bu Fy(a-b-) bireyler Fy^b alellerinde eritrositlere özgü transkripsiyon faktörü olan GATA-1'in *DARC* geninin promotör bölgesine bağlanma noktasında bir mutasyonu (-67T>C) homozigot olarak taşırlar. GATA-1 eritrositlere özgün olduğu için eritrositlerde Duffy glikoproteini ifade edilemezken diğer dokularda ifade edilebilir. Plasmodium vivax'ın endemik olduğu bölgelerde bu fenotipin yaygın gözlenmesi mutasyon üzerinde bir seleksiyon basıncı oluşturarak bu populasyonları malaryaya karşı dirençli hale getirmiştir(56). Bu bireyler anti-Fy^a oluştururlarken anti-Fy^b oluşturmamaktadır. Benzer mutasyonun Fy^a alelinde bulunduğu Fy(a−b−) fenotipi yine malarya endemik bir bölge olan Papua Yeni Gine'de yaygın olarak bulunmaktadır(57). Fy antijenlerinin zayıf ifade edilmesi ile sonuçlanan bazı SNP'ler de bulunmaktadır(58). Anti-Fy3 çok nadir

görülmekle birlikte FY proteininin hiçbir hücrede bulunmadığı Fy(a−b−) bireyler tarafından üretilen antikordur. Moleküler yöntemlerle Fy^a/ Fy^b polimorfizmi değerlendirilirken sık görülen GATA-1 mutasyonunun da test edilmesi gerekirken, çok nadir görülen Fy(a–b–) mutasyonlarına bakılmasına gerek yoktur.

Tablo 2.5.5. Farklı iki populasyonda Duffy alellerinin dağılımı

Fenotip	Beyazlar		Afrikalı Siyahlar	
	Genotip	Sıklık%	Genotip	Sıklık%
Fy(a+b-)	Fy^a/ Fy^a	20	Fy^a/ Fy^a veya Fy^a/ Fy	10
Fy(a+b+)	Fy^a/ Fy^b	48	Fy^a/ Fy^b	3
Fy(a-b+)	Fy^b/ Fy^b	32	Fy^b/ Fy^b veya Fy^b/ Fy	20
Fy(a-b-)		0	Fy/ Fy	67



Şekil 2.5.5. Duffy ve Kidd proteinleri ve polimorfik bölgelerinin şematik gösterimi(20)

2.6. Klinikte Eritrosit Genotiplendirmenin Kullanım Alanları

Eritrosit antijenlerinin saptanması için yaklaşık yüzyıldır kullanılmakta olan aglütinasyon temelli fenotiplendirme altın standart halini almıştır. Ancak bu yöntemin göreceli ucuz olması, laboratuarda kolay uygulanabilirliği, hasta takibi için yeterince duyarlı ve özgün olarak kabul edilmesinin yanında bazı dezavantajları bulunmaktadır. Aglütinasyon sonuçlarının yorumlanmasının subjektif olması, kullanılan ticari anti-serumların güvenilirlik gerektirmesi, hatta bazı ticari kitlerin FDA onayının bulunmaması ve FDA onaylı kitlerin fiyatının gittikçe artıyor olması, bazı anti-serumların yetersiz hacimde olmaları ve zayıf reaksiyon vermeleri ve kaynağının biolojik tehlike potansiyeli bulunması aglütinasyon yöntemlerinin teknik sınırlamalarıdır. Bunun yanısıra, yakın zamanda transfüzyon yapılmış olan bireylerde bulunan çift eritrosit populasyonu nedeniyle fenotiplendirme güçlüğü, otoantikoru bulunan hastaların DAT pozitif olması nedeniyle tiplendirilmeleri için uzun ve emek gerektiren işlemlerden geçmesi, Rh(D) pozitif bireylerde RHD zigotluğunun doğru olarak belirlenememesi, yaygın donör tiplendirmesine uygun olmaması klinik dezavantajlarıdır.

Geçtiğimiz birkaç dekadda eritrosit kan grubu sistemlerinin genlerinin belirlenmesi ve polimorfik antijenik yapıları oluşturan moleküler mekanizmaların ortaya konulması moleküler immünhematoloji alanının doğmasına yol açmıştır. Bireylerin DNA'ları kullanılarak yapılan PZR temelli genotiplendirme yöntemleriyle eritrosit antijenlerini kodlayan genler ve alelik yapılar ortaya konabilmektedir. Böylelikle hastaların genotipleri incelenerek gerçek fenotipleri öngörülebilmektedir. Kan grubu genotiplemesinin sağlık sistemine en değerli katkısı prenatal Rh genotipleme ile D-negatif gebenin taşıdığı fetüsün Rh fenotipinin belirlenmesidir. Önceleri amniosentez, koryonik villüs örnekleme gibi invasif yöntemlerle örnekleme yapılırken son zamanlarda anti-D antikoru bulunduğu bilinen gebenin kanından elde edilen fötal DNA ile Rh genotiplemesi birçok ülkede artık rutin tanısal bir test halini almıştır. Kan grubu genotiplemenin kullanım alanları tablo 2.6.'da özetlenmiştir(11). Afrika kökenli hastalarda transfüzyon sonrası sık rastlanan Rh antijenlerine karşı klinik olarak önemli antikor gelişimine neden olabilecek moleküler RH varyantları

gözlenmektedir. Bu durum serolojik kan grubu tiplendirmesi sırasında gözden kaçabileceği için genotipleme yapılmalıdır. Ayrıca, allojeneik kök hücre nakli sonrası kararlı karışık kimerizm olasılığı %25'lere yaklaşan OHA hastalarında genotipleme donör seçimine de yardımcı olabilir. Aynı Rh varyantına sahip kardeş seçilerek post transplant gelişme ihtimali yüksek olan kronik hemoliz ve graft yetmezliği önlenebilir(59). Ancak kan grubu genotiplemesinin transplant kararı ve donör seçimini etkileyebilecek bir rehber olabileceğini söylemek için henüz erkendir. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda yapılan bir çalışmada allojeneik kök hücre nakli yapılan hastalarda eritrosit antijenlerinin kimerizm takibinde kullanılabileceği ve sadece eritrositler incelenerek engraftman takibi yapılabileceği gösterilmiştir(60).

Son yıllarda çok sayıda hasta ve vericinin genotiplemesini yapabilen DNA-array analizinin kullanıldığı otomatize platformlar büyük transfüzyon merkezlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemlerle zaman alıcı genişletilmiş panel fenotipleme işlemlerinin sayısı azaltılabilmekte ve verici antijen veri tabanı oluşturularak hastalara antijen uyumlu ES bulunması kolaylaşmaktadır. Böylece nadir görülen antijenlere sahip vericilerin saptanması ve bu ES'lere ihtiyaç duyan nadir antijenlere sahip hastaların alloimmünizasyon riskine maruz bırakmadan transfüzyonu mümkün olmaktadır. Hasta örneğinin öncelikle geleneksel serolojik yöntemlerle ABO ve D için tiplendirilip antikor taraması yapıldıktan sonra antikor saptanırsa hastanın genotiplendirmesinin yapılması ve kan merkezi veri tabanında bulunan ve genotipi belirlenmiş verici sonuçlarıyla elektronik ortamda eşleştirmesi yapılabilir(61).

Tablo 2.6 Kan grubu genotiplemenin kullanım alanları

Kronik transfüzyon alan (talasemi, orak hücreli anemi, aplastik anemi), yakın zamanda transfüzyon yapılmış hastaların tiplendirilmesi
Fötus ve yenidoğanın hemolitik hastalığı riski bulunan fötüslerin belirlenebilmesi
Fötus ve yenidoğanın hemolitik hastalığı riski olan fötüslerin babalarının RHD zigotluk durumunun tayini
İmmünglobulin ile kaplanmış eritrositlerin tiplendirilmesi
Otoimmün hemolitik anemilerde altta yatabilecek alloantikorların araştırılması
Alıcı ve vericilerde kısmi D ve zayıf D belirlenmesi
ABO uyumsuz allojeneik kök hücre nakillerinde hastaların tiplendirilmesi
A, B ve Rh uyumsuzluklarının çözümlenmesi
Antikor tarama hücreleri için donörlerin tiplendirilmesi ve panellerin belirlenmesi

3.HASTA VE YÖNTEM

3.1. Hastalar

Çalışmaya kronik transfüzyon alan ve Ankara Üniveristesi Tıp Fakültesi Serpil Akdağ Kan Merkezi'nden ES sağlanan toplam 38 hasta alınmıştır. Hastaların hepsi etik kurul onaylı bilgilendirilmiş onam formunu imzalamışlardır. Kan Merkezi'nde daha önceden bu hastaların tümüne ABO, RhD incelemesi, 36 tanesine ise RhCcEe ve KELL1(K) antijenleri için serolojik değerlendirme yapılmıştır.

3.2. Aglütinasyon Testleri

Eritrosit yüzeyindeki antijenleri değerlendirmek için yapılan DAT esasına dayanan testtir. Serpil Akdağ Kan Merkezi Labaratuarı'nda BioVue (ORTHO Clinical Diagnostics, Johnson&Johnson Company, Yeni Zelanda) jel kartları kullanılarak yapılmaktadır. Hastanın eritrositinden salin ile %0,3'lük eritrosit solüsyonu hazırlanır ve hazır olan jelli kartlara her bir kuyucuğa 10µl pipetlenir. Kartlar 5dk santrifüj edildikten sonra aglütinasyon değerlendirilir. Antijen tanımlamada yine %0,3'lük eritrosit solüsyonu hazırlanır AHG'li ve nötr kartlarda antijene göre kuyucuklara 10µl eklenir ve üzerine özgün antikorlardan damlatılır. AHG'li kart 37°C'da 15dk; nötr kart ise oda ısısında 15dk inkübe edildikten sonra santrifüj yapılır ve aglütinasyon değerlendirilir.

3.3. Genotipleme için DNA Hazırlanması

DNA izolasyonu ve alel spesifik polimeraz zincir reaksiyonu Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D. Pediatrik Moleküler Genetik B.D.'de gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu klasik fenol/kloroform yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bireylerden 1 ml 0,5M etilendiamintetraasetilasitli (EDTA) (Sigma, ABD) polietilen tüp içerisine 9 ml venöz kan örneği alınır. Alınan kan örneği 50ml'lik falkon tüpüne konur ve içerisine 25ml eritrosit lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya); 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merc, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)] eklenir, 20dk buzda bekletilir.

+4°C'de, 4000 rpm'de 15dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant dökülür. Tüpün dibindeki pellet üzerine tekrar eritrosit lizis solüsyonu eklenir. Bu işlem eritrositler giderilene kadar tekrarlanır. Son kez süpernatant döküldükten sonra kalan lökositler üzerine 1000 µl eritrosit lizis solüsyonu eklenir ve bu karışımın 800 µl'si ependorf tüpüne alınarak -20°C'de stok olarak saklanır. Geriye kalan 200 µl bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20 µg/ml olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (Merc, Almanya) ve lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu [10 mM Trisklorid (Amresco, ABD) pH:8, 100 mM Sodyum Klorid (Merc, Almanya), 1 mM pH:8 EDTA (AppliChem, Almanya)] eklenerek bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda (Kotterman, Almanya) bekletilir. İkinci gün tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform (Merc, Almanya) eklenerek 10 dk çalkalanır ve buz içerisinde 20dk bekletildikten sonra +4 °C'de, 4000 rpm'de 20dk santrifüj edilir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenir. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C'de bir gece bekletilir. Üçüncü gün tüpler +4°C'de, 4000 rpm'de 20dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür. Süpernatant kısmı dökülerek tüpe 500 µl %70'lik alkol eklenir ve +4°C'de, 4000 rpm'de 20dk santrifüj edilir. Santrifüj sonunda alkol dökülür ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılır. Kurutulduktan sonra tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C'de bir gece bekletilerek DNA'nın çözülmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4°C'de veya -20°C'de saklanabilmektedir.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu/DNA Amplifikasyonu

Rh ve KKD (Kell, Kidd, Duffy) tiplendirme için SSP-PZR temel alan Rh tiplendirme (Lot #6645, BAGene RH-TYPE, BAG Health Care, Lich, Almanya) ve BAGene KKD tiplendirme (Lot#6650 BAGene KKD-TYPE, BAG Health Care, Lich, Almanya) kitleri kullanılmıştır(62). Test edilecek alellere ve iç kontrole [RHD 2. reaksiyonda kromozom 1'deki 90,000bç 5'Rhesus kutusuna (659bç) ve diğer

tümünde insan büyüme hormonu (434bç)] özgün primerler ve nükleotidler içeren ve önceden örneklenip kurutulmuş olan reaksiyon karışımları reaksiyonun gerçekleştirileceği tüpler içinde kitle birlikte hazır olarak gelmektedir. Amplifikasyon parametreleri son hacim 10µl olacak şekilde optimize edilmiştir. Master mix hazırlarken kullanılacak hacimler yapılacak reaksiyon sayısına göre kit açıklama broşüründe yazılı olan öneriler doğrultusunda hesaplanarak ayarlanmıştır. Buna göre 10x PZR tamponu, DNA solüsyonu, Taq polimeraz ve aqua dest. uygun hacimlerde alınıp karıştırılır. Ardından kitle beraber gelen hazır tüplerden her birine bu karışımdan 10µl eklenir ve tüplerin kapakları yine kitle beraber gelen kapaklarla sıkıca kapatılır. Tüplerin dibindeki mavi pelletin çözünmesini sağlayacak şekilde plaka yavaşça hareket ettirilir. Tüpler PZR makinesine (Primus, ABD) yerleştirilerek kapak sıkılaştırılır ve PZR programı başlatılır. Kullanılan özel kapak nedeniyle karışımların üzerini mineral yağı ile kapatmaya gerek yoktur. Üretici firmanın önerdiği doğrultuda kullanılan amplifikasyon parametreleri tablo 3.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. PZR amplifikasyon parametreleri

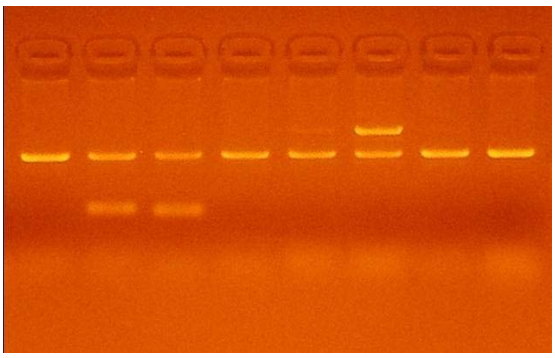
Program-basamak	Süre	Sıcaklık	Siklus sayısı
İlk denatürasyon	5dk	96ºC	1
Denatürasyon	10sn	96ºC	5
Bağlanma+uzama	60sn	70ºC	
Denatürasyon	10sn	96ºC	10
Bağlanma	50sn	65ºC	
Uzama	45sn	72ºC	
Denatürasyon	10sn	96ºC	15
Bağlanma	50sn	61ºC	
Uzama	45sn	72ºC	
Son uzama	5dk	72ºC	1

3.5. Jel Elektroforezi ve Sonuçların değerlendirilmesi

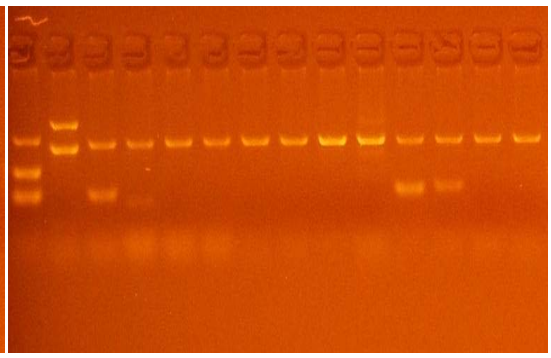
Amplifikasyon ürünlerinin ayırımı agaroz jel (%2,5) üzerinde elektroforez ile yapılmıştır. Elektroforez tamponu olarak 1 x TBE (45 milimolar tris, 45 milimolar borik asit, 0,5 milimolar EDTA) tamponu kullanılmıştır. Amplifikasyonu tamamlanan örnekler kuyucuklara yüklenmiştir. Amplifiye olan fragmanların boyutlarının karşılaştırılabilmesi için standart DNA merdiveninden 10µl ilk

kuyucuğa yüklenmiştir. Elektroforez şartları 10-12 V/cm (200-240V) ve 20-40 dk'dır. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel, etidyum bromür (Su veya TBE tamponunda 0,5 µg/ml EtBr) solüsyonu içerisinde boyanmıştır. PZR amplifikasyonu UV transillüminatör (220-310nm) kullanılarak görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Sonuçların yorumlanmasında kit ile birlikte gönderilmiş olan Rh ve KKD değerlendirme diagramları kullanılmıştır (Ek 1. ve Ek 2.). Bu diagramlarda her PZR reaksiyonunda ortaya çıkabilecek bandların boyutları ve karşılık gelen genotip özellikleri belirtilmektedir. Ortaya çıkan bandların boyutları standart DNA boyutlarını gösteren merdiven ile karşılaştırılarak ölçülmektedir. İç kontrol olarak tümünde 434bç DNA ve RH-Type 2. PZR reaksiyonunda 659bç DNA amplifikasyonu görülmesi gerekmektedir. Buna göre RH-TYPE standart RHD/RHCE alellerinin yanısıra bazı RH varyantlarının da belirlenebilmesini sağlamaktadır : DVI, DVI tip3, Cde^{s}, RHDψ, RHD(W16X), RHD-CE(8-9)-D, RHD-CE(3-7)-D ve DEL varyantları RHD(K409K), RHD(M295I), RHD(IVS3+1G>A) ve C^{w}. KKD-TYPE ile değerlendirilebilen aleller: KEL*1, KEL*2, JK*A, JK*B, FY*A, FY*B, FY*null01 ve FY*X'dir. Örnek bir hastanın PZR amplifikasyonu jel fotografları şekil 3.5.1. ve 3.5.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5.1. KKD sonucu jel fotografı
KEL*2/KEL*2, JK*A/JK*A, FY*B/FY*B



Şekil 3.5.2. RHCE sonucu jel fotografı
RHD*+ RHCE*ccEE

3.6. Etik Kurul Onayı

Araştırma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'na sunulmuş olup 07 Haziran 2010 tarih ve 12-229 karar numarası ile onay alınmıştır.

4.BULGULAR

4.1. Hastalar

Toplam 38 hastaya RHD/RHCE ve KKD sistemi için genotiplendirme yapılmıştır. Bu hastaların 36 tanesine ait fenotip sonuçlarına ulaşılabilmiştir. Hastaların ortanca yaşı= 19 (1-67 yaş) ve kız/erkek = 11/27 idi. Hastaların 34'ü beta talasemi majör, 1'i konjenital diseritropoietik anemi, 2'si orak hücreli anemi (HbSS ve HbSβtal), 1'i tanımlanmamış kronik anemi nedeniyle transfüzyon almakta idi. Beta talasemi major tanısı olan hastaların tümü 2-4 haftada bir 1-2 ünite; diğer hastalar ise yaklaşık 2 ayda bir 2 ünite eritrosit süspansiyonu almakta idi.

4.2. Genotip Oranları

Hasta grubunda gözlenen genotip oranları tablo 4.2.'de belirtilmiştir. Buna göre Rh sisteminin en sık gözlenen genotipleri RHD*+, RHCE*Cc, RHCE*ee; KKD sistemlerinin en sık gözlenen genotipleri KEL*02/KEL*02, *JK*A/JK*B, FY*A/FY*B* olarak saptanmıştır. Duffy sistemine göre 2 hastada *FY*A/FY*null01* ve 1 hastada *FY*B/FY*null01*genotipi saptanmıştır. Hastaların hiçbirinde varyant D saptanmamıştır.

4.3. Alloimünizasyon

Hastaların 3'ünde (%7) alloantikor geliştiği gözlenmiştir. Bu hastaların ikisi orak hücreli anemi, biri kronik anemisi olan erişkin hastalardır. Hastaların birinde anti-E, anti-c, anti-K, anti-Cw, anti-Le^a; diğerinde ise anti-Le^b antikorları saptanmış olup birinde antikor tanımlanamamıştır.

4.4. Genotip-fenotip uyumu

Genotip-fenotip uyumu araştırılan 36 hastanın 19'unda toplam 26 alelde uyumsuzluk saptanmıştır. Hastaların 12'sinde bu uyumsuzluklar klinik öneme sahiptir. Genotip-fenotip uyumsuzlukları ve olası alloimmünizasyon riski tablo 4.4.'te gösterilmiştir. Fenotipi RhD negatif olan ve genotiplemede RHD*+ saptanan hastanın zayıf D taşıdığı bulunmuştur.

Tablo 4.2. Hastalarda (n=38) gözlenen genotip oranları

Genotip	n	%
Rh Sistemi		
RHD*+	**37**	**97**
RHD-*	1	3
*RHCE*CC*	7	18
RHCE*Cc	**23**	**61**
*RHCE*cc*	8	21
*RHCE*EE*	2	5
*RHCE*Ee*	10	27
RHCE*ee	**26**	**68**
Kell Sistemi		
*KEL*01/KEL*01*	0	0
*KEL*01/KEL*02*	2	5
KEL*02/KEL*02	**36**	**95**
Kidd Sistemi		
*JK*A/JK*A*	11	29
JK*A/JK*B	**22**	**58**
*JK*B/JK*B*	5	13
Duffy Sistemi		
*FY*A/FY*A*	10	27
FY*A/FY*B	**16**	**43**
*FY*B/FY*B*	8	22
*FY*A/FY*null01*	2	5
*FY*B/FY*null01*	1	3

Tablo 4.4. Genotip-fenotip uyumsuzluğu saptanan hastalar

Hasta no	Genotipe göre öngörülen fenotip	Aglütinasyon yöntemiyle saptanan fenotip	Alloimmünizasyon riski
1	CC	Cc	Var
3	CC	Cc	Var
10	ee	Ee	Var
13	cc EE	Cc ee	Var
16	cc EE	Cc ee	Var
17	Ee	ee	Yok
18	Ee	ee	Yok
19	cc	Cc	Var
20	Kk	kk	Yok
21	Ee	ee	Yok
22	CC	Cc	Var
23	CC	Cc	Var
24	Ee	ee	Yok
25	cc Ee	Cc ee	Var
26	Cc ee	cc Ee	Var
29	Ee	ee	Yok
31	cc	Cc	Var
35	CC Kk	Cc kk	Var
36	RhD(+)	RhD(-)	Yok

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada tek merkezde kronik transfüzyon almakta olan, yaşları 1 ile 67 arasında değişen ve çoğu beta talasemi olan 38 hastanın SSP-PZR yöntemi ile RhD, RhCE ve KEL, Jk ve Fy antijenlerinin genotipleri belirlenmiştir. Genotip-fenotip karşılaştırılan 36 hastanın 19'unda ve toplam 25 antijende uyumsuzluk saptanmıştır. Kronik eritrosit transfüzyonuna bağımlı hastaların çocukluk çağlarından itibaren transfüzyon aldıkları için fenotiplendirme ilk transfüzyondan önce yapılmalı, eğer bu mümkün olamamış ise genotiplendirme yapılmalıdır. Talasemi hastalarının 2-4 hafta arayla eritrosit transfüzyonu aldığı ve verilen eritrositlerin haftalarca dolaşımda kaldığı göz önüne alınacak olursa hastaların dolaşımında her zaman kendisine ve vericiye ait eritrositlerden oluşan çift populasyon bulunmaktadır. Bu nedenle klasik aglütinasyon yöntemi hatalara yol açmaktadır. Bu çalışmada elde edilen bulgular kronik transfüzyon alan hastalarda eritrosit antijenleri için genotiplendirme yapılmasının gerekliliğini ortaya koymuştur.

Bu çalışmada ve önceki benzer çalışmalarda DNA izolasyonu hastaların periferik kan lökositlerinden yapılmıştır. Bazı yazarlar verici kaynaklı lökositlerin kontaminasyon riskine işaret etseler de hastanın DNA'sının verici DNA'sından miktar olarak çok fazla olması nedeniyle PZR metodlarının transfüzyon sonrası DNA kimerizmini saptamadığı gösterilmiştir. Rozman ve grubu transfüzyon öncesi ve sonrası periferik kandan, ayrıca bukkal epitelden aldıkları örneklerden elde ettikleri DNA ile yaptıkları eritrosit genotiplemelerinin aynı sonuçları verdiğini göstermişlerdir(63, 64).

Çalışmaya katılan hastalar genotipleme ile %97 oranında RHD*+ bulunmuş, sadece bir hastada D açısından uyumsuzluk saptanmıştır. Bu hasta, fenotiplendirmede RhD negatif olan ve kendisine sürekli D-negatif ES sağlanan ancak genotiplemede RHD*+ bulunan bir talasemi hastasıdır. Ayrıntılı incelemede bu hastanın zayıf D taşıdığı saptanmıştır. Zayıf D pozitif hastada RHD geni ve D antijeninin yapısı normaldir ancak eritrosit yüzeyindeki antijen ifadesi azalmıştır bu nedenle geleneksel serolojik yöntemlerde reaksiyon vermeyip RhD negatif olarak bulunabilir. Bu

hastaların alloantikor geliştirmediği bilinmektedir. Sonuçta, çalışmadaki hasta D-pozitif ES üniteleri alabilir ve zaten az bulunan D-negatif ünitelerin geçekten RhD negatif bireylere yönlendirilmesi sağlanabilir.

Çalışma hastalarında en sık gözlenen RHCE haplotipleri RHCE*Cc (%61) ve RHCE*ee (%68) populasyonda gözlenen sıklıkla uyumlu bulunmuştur(16). Hastaların 12 tanesinde saptanmış olan genotip-fenotip uyumsuzlukları hastalara fenotipe uygun ES verildiğinde alloimmünizasyon riski ile ilişkili bulunmuştur. Örneğin, 5 hastanın önceki fenotiplendirmeye göre (Cc) c-pozitif ES almasında bir sakınca yok iken, bu hastalar genotiplendirmede RHCE*CC bulunmuştur ve c-negatif ES almaları gerektiği anlaşılmıştır. Benzer şekilde, fenotiplendirmede 'ee' olduğu saptanan 2 hastanın genotip olarak RHCE*EE oldukları saptanmıştır ve bu hastaların e-negatif ES ile transfüzyonu gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Kell sistemindeki K(KEL1) antijeninin immünojenitesi yüksektir. Türkiye'den yapılan çok merkezli bir çalışmada toplumdaki eritrosit antijenleri ile talasemili hastalardaki antijen sıklığı benzerlik gösterdiği ve K(KEL1) antijen sıklığının her iki grupta %5 olduğu bildirilmiştir(65). Bu çalışmadaki hasta grubunda bu sonuçlara uyumlu olarak en sık KEL*2/KEL*2 haplotipi (%95) saptanmış ve sadece 2 hastada KEL*2/KEL*1 heterozigot bulunmuş olup homozigot KEL*1/KEL*1 saptanmamıştır. K(KEL1) antijen sıklığı ise %2,6 olarak bulunmuştur. KEL*2/KEL*1 heterozigot olan 2 hastanın önceki fenotiplendirmede K (KEL1) antijenini taşımadığı kaydedilmiştir. Bu hastaya fenotipe uyumlu K-negatif ES araştırılması gerekliliği ortadan kalkmıştır. Hasta heterozigot olduğundan zaten anti-K antikoru geliştirmesi beklenmemektedir.

Çalışmada Kidd ve Duffy sistemlerinde en sık sırasıyla JK*A/JK*B (%58) ve FY*A/FY*B(%43) haplotipleri saptanmıştır ve bu oranlar beyazlardaki sıklıklara benzerdir(37). Hasta grubunda beyazlardan farklı olarak heterozigot FY^{*null} haplotipi (2 hastada FY*A/FY*null01 ve 1 hastada FY*B/FY*null01) saptanmıştır. Duffy null fenotipi Afrika orijinli bireylerde sıklıkla gözlenir ve bu populasyonlarda malarya direncini sağlamaktadır.

Kronik transfüzyon alan hastalarda başka merkezlerce yapılan çalışmalarda da benzer şekilde uyumsuzluklar saptanmıştır. Legler ve ark. konjenital anemili 27 hastada RHD ve RHCE için PZR ile genotipleme yaptıklarında serolojik olarak D negatif saptanan 2 hastanın bu yöntemle D-pozitif olarak tiplendirildiği, 4 hastanın serolojik olarak Cc iken genotipleme ile CC, bir hastanın serolojik yöntemle ee iken genotipleme ile Ee olduğunu saptamıştır(12). Castilho ve ark. 40 OHA hastasının 6'sında ve alloimmünizasyon gelişmiş olan10 beta talasemi hastasının 9'unda serolojik olarak buldukları fenotip ile genotipleme ile öngörülen fenotip arasında uyumsuzluk olduğunu ancak kronik transfüzyon almayan kontrol grubu hastalarının hiçbirinde uyumsuzluk olmadığını saptayarak bu uyumsuzluğun yakın dönemde yapılan transfüzyondan kaynaklandığını göstermişlerdir. Uyumsuzluk saptanan hastalar genotiplerine uygun doğru antijen uyumlu ES transfüzyonu almaya başladıktan sonra verilen eritrositlerin yaşam sürelerinin uzadığı, hastaların hemoglobin düzeylerinin yükseldiği ve transfüzyon sıklığının azaldığı gözlenmiştir(13, 14). Guelsin ve ark. hematolojik hastalık ve böbrek yetmezliği nedeniyle kronik transfüzyon alan 79 hastaya RhCE, Kell, Kidd, Duffy alelleri için genotiplendirme yapmış ve serolojik testleri mevcut 38 hastanın 16'sında genotip-fenotip uyumsuzluğu saptamışlardır(15).

Kronik transfüzyon alan hastalarda alloimmünizasyon hem uygun ES bulmayı güçleştirmekte hem de gecikmiş tip hemolitik transfüzyon reaksiyonlarını arttırmaktadır. İlginç olarak çalışmaya alınan 35 talasemi hastasında alloantikor saptanmazken alloimmünizasyon saptanan 3(%7) hastanın 2'si OHA ve biri kronik anemi nedeniyle transfüzyon alan erişkin hastalardır. Çeşitli ülkelerden kronik transfüzyon ihtiyacı olan talasemi hastalarında %5,3 ile %37 arasında alloimmünizasyon bildirilmiştir(1-5). Türkiye'den yapılan bir çalışmada ise talasemili hastalarda alloimmünizasyon sıklığı %8,9 olarak saptanmıştır(6). Alloimmünizasyonda alıcı-verici arasındaki antijen uyumu, antijenin dozu ve immünojenite, kan merkezinin verici araştırmada kullandığı antijen paneli, alıcının transfüzyon yaşı ve sayısının, splenektomi durumunun önemli faktörler olduğu düşünülmektedir. Alloimmünizasyon riskinin alıcı-verici populasyonu arasındaki

etnik farklılıkla orantılı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, ABD'de yaşayan çoğunluğunu Asya kökenli hastaların oluşturduğu ve beyaz ırktan vericilerden transfüzyon yapılan 64 talasemi hastasında alloimmünizasyon oranının %22 olduğu ve antikorların çoğunun vericilerde sık alıcılardan az gözlenen antijenlere karşı geliştiği belirlenmiştir(1). Benzer şekilde ABD ve İngiltere'de yaşayan Afrika orijinli olan OHA hastalarındaki yüksek alloimmünizasyon oranının çoğu beyazlardan oluşan verici populasyonu ile hastalar arasındaki antijenik farklılıklardan kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Örneğin İngiltere'de yaşayan Jamaika'lı OHA hastalarında %76'ya varan alloimmünizasyona karşılık Jamaika'da yaşayan hastalarda bu oran %2,6 saptanmıştır(66, 67). Bu durum OHA hastalarında neden kronik transfüzyon bağımlı diğer hastalara göre daha sık alloimmünizasyon geliştiğini kısmen açıklamaktadır. Bunun yanısıra OHA'da hastalığın kendisinden kaynaklanan bir inflamatuar yanıt oluşmakta ve nötrofil sayısında artışla orantılı olan bu durumunun artmış alloantikor yanıtında rol oynadığı düşünülmektedir(68). Ancak bu bulguların hiçbirisi bu çalışmada 34 talasemi hastasının çoğunun yıllardır genotip uyumsuz eritrosit transfüzyonları almalarına rağmen neden alloantikor geliştirmediklerini açıklayamamaktadır. Bu sonuç, yukarda sayılan risk faktörlerinden bağımsız henüz tam ortaya konulamamış genetik faktörlerin alloantikor yanıtını etkilediği hipotezini desteklemektedir ve bu konuyla ilgili prospektif çalışmalara ihityaç vardır(69). Alloantikor üretme olasılığı yüksek olan hasta grubunun ayırdedilebilmesi eritrosit genotiplendirmenin bu hasta grubunda rutinde kullanımına olanak sağlayacaktır. Günümüzde böyle bir ayırım henüz yapılamamaktadır. Bu nedenle en uygun yol öncelikle başka antikorları da oluşturma potansiyeli nedeniyle halihazırda antikor üretmiş olan hastaların ve kronik transfüzyon alan hastaların genotiplendirmesidir.

Bu çalışmalar göstermektedir ki eritrosit transfüzyon bağımlı hastalarda eritrosit genotiplemesi alloimmünizasyonu hem tanımlamada hem de önlemede ve hastalara uygun antijen eşleştirilmiş ünitelerin sağlanmasında hayati öneme sahiptir. Belirli bir genotipin varlığı o antijenin eritrosit yüzeyinde ifade edildiğini garantilemez. Bu durum moleküler genotiplemenin tek başına klinik kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle moleküler yöntemlerin serolojik yöntemlere alternatif değil bu

yöntemleri tamamlayıcı olarak kullanımı esastır. Son yıllarda çok sayıda hasta ve vericinin genotiplemesini yapabilen DNA-array analizinin kullanıldığı otomatize platformlar büyük transfüzyon merkezlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemlerle zaman alıcı genişletilmiş panel fenotipleme işlemlerinin sayısı azaltılabilmekte ve verici antijen veri tabanı oluşturularak hastalara antijen uyumlu ES ünitelerin bulunması kolaylaşabilmektedir. Gelecekte bu sistemlerin maliyetinin ucuzlamasıyla birlikte daha yaygın kullanılmaya başlanması beklenmektedir.

6. SONUÇLAR

Kronik transfüzyon almakta olan 38 hastanın SSP-PZR yöntemi ile RhD, RhCE ve KEL, Jk ve Fy antijenlerinin genotipleri belirlenmiştir. Genotip-fenotip karşılaştırılan 36 hastanın 19'unda ve toplam 25 antijende uyumsuzluk saptanmıştır.

Çalışmaya katılan hastalar genotipleme ile %97 oranında RHD*+ bulunmuş, sadece bir hastada D açısından uyumsuzluk saptanmıştır. Çalışma hastalarında en sık gözlenen RHCE haplotipleri RHCE*Ce (%61) ve RHCE*ee (%68) populasyonda gözlenen sıklıkla uyumlu bulunmuştur(16).

Bu çalışmadaki hasta grubunda bu sonuçlara uyumlu olarak en sık KEL*2/KEL*2 haplotipi (%95) saptanmış ve sadece 2 hastada KEL*2/KEL*1 heterozigot bulunmuş olup homozigot KEL*1/KEL*1 saptanmamıştır. K(KEL1) antijen sıklığı ise %2,6 olarak bulunmuştur. Çalışmada Kidd ve Duffy sistemlerinde en sık sırasıyla JK*A/JK*B (%58) ve FY*A/FY*B(%43) haplotipleri saptanmıştır ve bu oranlar beyazlardaki sıklıklara benzerdir(37). Ayrıca 3 hastada FY^{*null} haplotipi (2 hastada FY*A/FY*null01 ve 1 hastada FY*B/FY*null01) saptanmıştır.

Hastaların 12 tanesinde saptanmış olan genotip-fenotip uyumsuzlukları hastalara fenotipe uygun ES verildiğinde alloimmünizasyon riski bulunduğu görülmüştür. Tüm hastaların %7(3/38)'inde alloimmünizasyon saptanırken talasemi hastalarının hiçbirinde alloantikor gelişmediği gözlenmiştir.

Kronik eritrosit transfüzyonuna bağımlı hastaların çocukluk çağlarından itibaren transfüzyon aldıkları için fenotiplendirme ilk transfüzyondan önce yapılmalıdır. Bu mümkün olamamış ise genotiplendirme yapılmalıdır. Gelecekte çok sayıda hasta ve vericinin genotiplemesini yapabilen DNA-array analizinin kullanıldığı otomatize sistemlerin kan merkezlerince yaygın kullanılmaya başlanması beklenmektedir.

ÖZET

Kronik Transfüzyon İhtiyacı Olan Talasemi Hastalarının Kan Grubu Genotiplerinin Belirlenmesi ve Eritrosit Fenotiplendirme Yöntemiyle Karşılaştırılması

Talasemi major ve orak hücreli anemi gibi doğuştan itibaren kronik eritrosit transfüzyonuna bağımlı olan hastalarda önceki transfüzyondan dolayı dolaşımda vericiye ait eritrositlerin bulunması kan merkezlerinde eritrosit fenotiplendirmesinin yeterince doğru yapılmasını önlemektedir. Hastalara sağlanan eritrosit süspansiyonlarının hasta eritrositlerinin gerçek fenotipiyle tam uyumlu olmaması alloimmünizasyonuna yol açmaktadır. Bu durum, hemolitik transfüzyon reaksiyonlarına, verilen eritrositlerin yaşam süresinin kısalmasına ve daha sık transfüzyon ihtiyacına neden olmaktadır. Dünyadaki kan merkezlerinde kullanılan fenotip uyumlu eritrosit sağlama stratejileriyle alloimmünizasyon kısmen kontrol altına alınmış olsa da hiçbirisi tam olarak yeterli koruma sağlayamamaktadır. Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Serpil Akdağ Kan Bankası'ndan sürekli ES üniteleri sağlanan 38 hastanın (34 beta talasemi major, 2 orak hücreli anemi, 1 konjenital diseritropoietik anemi, 1 kronik anemi) RhD, RhCcEe ve Kell (KEL1, KEL2), Kidd (Jka, Jkb), Duffy (Fya, Fyb) kan grubu antijenlerinin sekans spesifik primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (SSP-PZR) yöntemiyle genotip özellikleri belirlenmiştir. Jel aglütinasyon yöntemleriyle fenotip özellikleri saptanmış olan 36 hastada fenotip-genotip karşılaştırılmış ve bu hastaların 19'unda (toplam 25 antijende) uyumsuzluk saptanmıştır. Hastaların 12 tanesinde saptanmış olan genotip-fenotip uyumsuzluklarının hastalara fenotipe uygun ES verildiğinde alloimmünizasyon riski oluşturduğu saptanmıştır. Çalışmaya katılan hastalarda alloimmünizasyon oranı %7 (3/38) olarak bulunmuştur. Talasemi hastalarının hiçbirinde alloantikor saptanmamıştır. Kronik eritrosit transfüzyonu bağımlı hastalara ilk transfüzyondan önce fenotiplendirme yapılamamış ise fenotiplendirme hatalı sonuçlar vereceği için genotipleme yapılması uygun yaklaşım olacaktır.

Anahtar Sözcükler: Alloimmünizasyon, eritrosit antijenleri, kan grubu genotiplendirme, kronik transfüzyon, talasemi.

SUMMARY

Blood Group Genotyping in Cronically Transfused Patients: Comparison with the Erythrocyte Phenotyping Method

Chronically transfused patients such as thalassemia major and sickle cell anemia carry in their circulation the donor derived erytrocytes from previous transfusion. This prevents the occurate phenotyping of erytrocytes. Discordance between the real phenotype of the patients and the phenotype of the transfused red blood cell(RBC) units results in alloimmunization. This is associated with hemolytic transfusion reactions, shortening of the erythrocyte life span and increased frequency of transfusion. Although strategies to provide phenotype-matched RBC units by many blood banks in the world have partially controlled the high rate of alloimmunization among this population, the risk still remains. Genotyping was performed by using sequence specific primer based PCR for RhD, RhCcEe ve Kell (KEL1, KEL2), Kidd (Jka, Jkb), Duffy (Fya, Fyb) antigens in 38 patients (34 beta thalassemia major, 2 sickle cell anemia, 1 congenital dyserythropoietic anemia, 1 chronic anemia) receiving their RBC units from Ankara University Medical Faculty Serpil Akdağ Blood Bank. Among the 36 patients who had been phenotyped by gel agglutination method and compared with the genotyping results, 19 had discordance between phenotype and genotype. Twelve patients had the risk of alloimmunization in case of phenotype matched transfusion. The alloimmunization ratio was %7 (3/38) and none of the thalassemia patients had allo-antibodies. If the phenotyping can not be done before the first transfusion, erythrocyte genotyping should be performed to prevent false phenotyping after multiple transfusions.

Key Words: Alloimmunization, blood group genotyping, chronic transfusion, erythrocyte antigens, thalassemia.

KAYNAKLAR

1. Singer ST, Wu V, Mignacca R, Kuypers FA, Morel P, Vichinsky EP. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent. Blood. 2000 Nov 15;96(10):3369-73.
2. Ho HK, Ha SY, Lam CK, Chan GC, Lee TL, Chiang AK, Lau YL. Alloimmunization in Hong Kong southern Chinese transfusion-dependent thalassemia patients.Blood. 2001 Jun 15;97(12):3999-4000.
3. Wang LY, Liang DC, Liu HC, Chang FC, Wang CL, Chan YS, Lin M. Alloimmunization among patients with transfusion-dependent thalassemia in Taiwan. Transfus Med. 2006 Jun;16(3):200-3.
4. Ameen R, Al-Shemmari S, Al-Humood S, Chowdhury RI, Al-Eyaadi O, Al-Bashir A. RBC alloimmunization and autoimmunization among transfusion-dependent Arab thalassemia patients. Transfusion. 2003 Nov;43(11):1604-10.
5. Karimi M, Nikrooz P, Kashef S, Jamalian N, Davatolhagh Z. RBC alloimmunization in blood transfusion-dependent beta-thalassemia patients in southern Iran. Int J Lab Hematol. 2007 Oct;29(5):321-6.
6. Canatan D, Karadogan C, Oguz N, Balta N, Cosan R,Ozsancak, Dirican H, Ozcan C, Alanoglu G: Red cell antibodiesin patient with Beta-thalassemia major. Blood Banking and Transfusion Medicine, 1(1) : 121-123,2003.
7. Wayne AS, Kevy SV, Nathan DG. Transfusion management of sickle cell disease. Blood. 1993 Mar 1;81(5):1109-23.
8. Ness PM. To match or not to match: the question for chronically transfused patients with sickle cell anemia.Transfusion. 1994 Jul;34(7):558-60.
9. Vichinsky EP, Earles A, Johnson RA, Hoag MS, Williams A, Lubin B. Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. N Engl J Med. 1990 Jun 7;322(23):1617-21.
10. Smith-Whitley K. Alloimmunization in patients with sickle cell disease. In: Manno CS, ed. PediatricTransfusion Therapy. Bethesda, MD: AABB Press, 2002:249-282.

11. Hillyer CD, Shaz BH, Winkler AM, Reid M. Integrating molecular technologies for red blood cell typing and compatibility testing into blood centers and transfusion services. Transfus Med Rev. 2008 Apr;22(2):117-32.
12. Legler TJ, Eber SW, Lakomek M, Lynen R, Maas JH, Pekrun A, Repas-Humpe M, Schröter W, Köhler M. Application of RHD and RHCE genotyping for correct blood group determination in chronically transfused patients. Transfusion. 1999 Aug;39(8):852-5.
13. Castilho L, Rios M, Pellegrino J Jr, T O Saad S, F Costa F. Blood group genotyping facilitates transfusion of beta-thalassemia patients. J Clin Lab Anal. 2002;16(5):216-20.
14. Castilho L, Rios M, Bianco C, Pellegrino J Jr, Alberto FL, Saad ST, Costa FF. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. Transfusion. 2002 Feb;42(2):232-8.
15. Guelsin GA, Sell AM, Castilho L, Masaki VL, Melo FC, Hashimoto MN, Higa TT, Hirle LS, Visentainer JE. Benefits of blood group genotyping in multi-transfused patients from the south of Brazil. J Clin Lab Anal. 2010;24(5):311-6.
16. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. Hum Genet. 2009 Dec;126(6):729-42.
17. Cartron JP, Colin Y. Structural and functional diversity of blood group antigens. Transfus Clin Biol. 2001 Jun;8(3):163-99.
18. Lögdberg L, Reid ME, Lamont RE, Zelinski T.Human blood group genes 2004: chromosomal locations and cloning strategies. Transfus Med Rev. 2005 Jan;19(1):45-57.
19. Reid ME, Mohandas N. Red blood cell blood group antigens: structure and function. Semin Hematol. 2004 Apr;41(2):93-117.
20. Reid ME, Westhoff CM. Blood group antihens and antibodies. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, Heslop H, eds. Hematology: Basic Principles and Practice. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier; p. 2163-2177.
21. Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. Transfus Med Rev. 2007;21(1):58-71.

22. Reid ME, Lomas-Francis C: Blood Group Antigens & Antibodies: A Guide to Clinical Relevance & Technical Tips, New York, Star Bright Books, 2007.
23. Heddle NM, Klama L, Frassetto R, O'Hoski P,Leaman B. A retrospective study to determine the risk of red cell alloimmunization and transfusion during pregnancy. Transfusion. 1993;33:217-220.
24. Albayrak D, Altuntaş F, Özet G, Karadogan İ, Bayık M, Özen M, Tifitk N. Transfüzyon öncesi uygunluk testleri: Aydınok Y ed. Transfüzyon tıbbı el kitapçığı. Ankara: Türk Hematoloji Derneği yayını, 2011:20-32.
25. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. Blood. 2000 Jan 15;95(2):375-87.
26. Olsson ML, Clausen H. Modifying the red cell surface: towards an ABO-universal blood supply. Br J Haematol. 2008 Jan;140(1):3-12.
27. Lin M. Taiwan experience suggests that RhD typing for blood transfusion is unnecessary in southeast Asian populations. *Transfusion*. 2006;46(1):95-98.
28. Avent ND, Butcher SK, Liu W, Mawby WJ, Mallinson G, Parsons SF, Anstee DJ, Tanner MJ. Localization of the C termini of the Rh (rhesus) polypeptides to the cytoplasmic face of the human erythrocyte membrane. J Biol Chem. 1992 Jul 25;267(21):15134-9.
29. Smythe JS, Avent ND, Judson PA, Parsons SF, Martin PG, Anstee DJ. Expression of RHD and RHCE gene products using retroviral transduction of K562 cells establishes the molecular basis of Rh blood group antigens. Blood. 1996 Apr 1;87(7):2968-73.
30. Lögdberg L, Reid ME, Lamont RE, Zelinski T. Human blood group genes 2004: chromosomal locations and cloning strategies. Transfus Med Rev. 2005 Jan;19(1):45-57.
31. Cherif-Zahar B, Raynal V, Gane P, Mattei MG, Bailly P, Gibbs B,Colin Y, Cartron JP. Candidate gene acting as a suppressor of the *RH* locus in most cases of Rh-deWciency. Nat Genet. 1996;12:168–173.
32. Wagner FF, Flegel WA. *RHD* gene deletion occurred in the *Rhesusbox*. Blood. 2000; 95:3662–3668.

33. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne LM, Daniels G. The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in most Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. Blood. 2000; 95:12–18.
34. Faas BHW, Beckers EAM, Wildoer P, Ligthart PC, Overbeeke MA, Zondervan HA, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Molecular background of VS and weak C expression in blacks. 1997; Transfusion 37:38–44.
35. Daniels GL, Faas BHW, Green CA, Smart E, Maaskant-van Wijk PA, Avent ND, Zondervan HA, von dem Borne AE, van der Schoot CE. The Rh VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serological and molecular analysis. Transfusion. 1998; 38:951–958.
36. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. Blood. 1999 Jan 1;93(1):385-93.
37. Anstee DJ. Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. Blood. 2009 Jul 9;114(2):248-56.
38. Shao CP, Maas JH, Su YQ, Köhler M, Legler TJ. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese. Vox Sang 2002;83:156–61.
39. Flegel WA. Molecular genetics of RH and its clinical application. Transfus Clin Biol. 2006 Mar-Apr;13(1-2):4-12.
40. Mouro I, Colin Y, Chérif-Zahar B, Cartron J-P, Le Van Kim C. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. Nat Genet. 1993; 5:62–65.
41. Simsek S, de Jong CA, Cuijpers HT, Bleeker PM, Westers TM, Overbeeke MA, Goldschmeding R, van der Schoot CE, von dem Borne AE. Sequence analysis of cDNA derived from reticulocyte mRNAs coding for Rh polypeptides and demonstration of E/e and C/c polymorphisms. Vox Sang. 1994;67(2):203-9.

42. Huang C-H, Chen Y, Reid ME, Seidl C. Rhnull disease: the amorph type results from a novel double mutation in RhCe gene on D-negative background. Blood. 1998; 92:664–671.
43. Chérif-Zahar B, Matassi G, Raynal V, Gane P, Mempel W, Perez C, Cartron JP. Molecular defects of the *RHCE* gene in the Rh-deWcient individuals of the amorph type. Blood. 1998; 92:639–6469.
44. Cherif-Zahar B, Raynal V, Gane P, Mattei MG, Bailly P, Gibbs B,Colin Y, Cartron JP. Candidate gene acting as a suppressor of the *RH* locus in most cases of Rh-deWciency. Nat Genet. 1996; 12:168–173.
45. Lee S, Lin M, Mele A, Cao Y, Farmar J, Russo D, Redman C. Proteolytic processing of big endothelin-3 by the Kell blood group protein. Blood. 1999; 94:1440–1450.
46. Lee S, Zambas E, Green ED, Redman C. Organization of the gene encoding the human Kell blood group protein. Blood. 1995 Mar 1;85(5):1364-70.
47. Lee S, Zambas E, Green ED, Redman C. Organization of the gene encoding the human Kell blood group protein. Blood. 1996 Jun 1;87(11):4922.
48. Danek, A., Rubio, J.P., Rampoldi, L., Ho, M., Dobson-Stone, C., Tison, F., Symmans, W.A., Oechsner, M., Kalckreuth, W., Watt, J.M., Corbett,A.J., Hamdalla, H.H., Marshall, A.G., Sutton, I., Dotti, M.T., Malandrini, A., Walker, R.H., Daniels, G. & Monaco, A.P. McLeod neuroacanthocytosis: genotype and phenotype. Annals of Neurology. 2001; 50, 755–764.
49. Sands JM, Gargus JJ, Fröhlich O, Gunn RB, Kokko JP. Urinary concentrating ability in patients with Jk(a-b-) blood type who lack carrier-mediated urea transport. J Am Soc Nephrol. 1992 Jun;2(12):1689-96.
50. Olivès B, Merriman M, Bailly P, Bain S, Barnett A, Todd J, Cartron JP, Merriman T. The molecular basis of the Kidd blood group polymorphism and its lack of association with type 1 diabetes susceptibility. Hum Mol Genet. 1997 Jul;6(7):1017-20.
51. Lomas-Francis C. The value of DNA analysis for antigens of the Kidd blood group system. Transfusion. 2007; 47(suppl): 23S-27S.
52. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th ed. Oxford, Blackwell Science, 1997.

53. Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH. A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor. Science. 1993 Aug 27; 261(5125):1182-4.
54. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Pogo AO. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals. Blood. 1995 Feb 1;85(3):615-21.
55. Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ.Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. Br J Haematol. 1995 Aug; 90(4):823-9.
56. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. Nat Genet. 1995 Jun;10(2):224-8.
57. Zimmerman PA, Woolley I, Masinde GL, Miller SM, McNamara DT, Hazlett F, Mgone CS, Alpers MP, Genton B, Boatin BA, Kazura JW. Emergence of FY*A(null) in a Plasmodium vivax-endemic region of Papua New Guinea. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 23;96(24):13973-7.
58. Castilho L. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. Transfusion. 2007;47(suppl):28S-31S.
59. Fasano RM, Monaco A, Meier ER, Pary P, Lee-Stroka AH, Otridge J, Klein HG, Marincola FM, Kamani NR, Luban NL, Stroncek D, Flegel WA. RH genotyping in a sickle cell disease patient contributing to hematopoietic stem cell transplantation donor selection and management. Blood. 2010 Oct 14;116(15):2836-8.
60. Yildirim I, Ozer Y, Yüksel MK, Arat M, Arslan O. Erythrocyte antigen and reticulocyte engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2004 Aug;34(4):351-5.
61. Ribeiro KR, Guarnieri MH, da Costa DC, Costa FF, Pellegrino J Jr, Castilho L. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion

support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. Vox Sang. 2009 Aug;97(2):147-52.

62. Prager M. Molecular genetic blood group typing by the use of PCR-SSP technique. Transfusion. 2007 Jul;47(1 Suppl):54S-9S.
63. Rozman P, Dovc T, Gassner C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK, and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. Transfusion. 2000 Aug;40(8):936-42.
64. Reid ME, Rios M, Powell VI, Charles-Pierre D, Malavade V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. Transfusion. 2000 Jan;40(1):48-53.
65. Canatan D, Acar N, Kılıc B : Rh subgroups and Kell antigens in patients with thalassemia and donors in Turkey.Turk.J.Med.Sci 29 :155-157,1999.
66. Luban NL: Variability in rates of alloimmunization in different groups of children with sickle cell disease: Effect of ethnic background. Am J Pediatr Hematol Oncol. 1989; 11:314-319.
67. Olujohungbe A, Hambleton I, Stephens L,Serjeant B, Sergeant G. Red cell antibodies inpatients with homozygous sickle cell disease:a comparison of patients in Jamaica and theUnited Kingdom. Br J Haematol. 2001; 113:661-665.
68. Hendrickson JE, Chadwick TE, Roback JD, Hillyer CD, Zimring JC. Inflammation enhances consumption and presentation of transfused RBC antigens by dendritic cells. Blood. 2007 Oct 1; 110(7):2736-43.
69. Higgins JM, Sloan SR. Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: evidence for a distinct population of immunological responders. Blood. 2008;112:25.

BAGene

BAG HEALTH CARE

RH-TYPE

CE IVD

LOT 1008 RH | 2012-02 | REF 6645

Worksheet und Auswertetabelle / *Worksheet and Evaluation diagram*

Reaktions-Nr. / *Reaction No.*		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
PCR-Produkt/e / *PCR product/s* (Größe in bp/*size in bp*)		224 123	390 248 154	140	113 *sw*	113	198	143	215	162	145	157	155	181
Reaktionsmuster / *Reaction pattern*		$D_{4/4}$ D_7	D_7 *RHD(W16X)* *RHDΨ*	D_4 *RHDΨ* neg.	DEL *RHD* (K409K) neg.	DEL *RHD* (K409K)	DEL *RHD* (M295I)	DEL *RHD* (IVS3+1G>A)	Cde^s	C C^w	c	E	e	C^w
Phänotyp *Phenotype*	Genotyp *Genotype*													
Standard *RHD/RHCE* Allele/s														
D-positive		+ +	+	+	+	−	−	−	−					
D-negative		−	−	−	−	−	−	−	−					
C		Größe der internen PCR-Kontrolle in Reaktion Nr. 2: 659 bp, in allen anderen Reaktionen: 434 bp (HGH) *Size of internal PCR control in reaction no. 2: 659 bp, in all the other reactions: 434 bp (HGH)*								+	−	−	−	−
C^w										+	−	−	−	+
c										−	+	−	−	−
E										−	−	+	−	−
e										−	−	−	+	−
RHD*-Varianten / *RHD variants														
D-positive	*RHD / RHD*(K409K)	+ +	+	+	+	+	−	−	−	Reaktion Nr. 4 sw - manchmal schwach *Reaction no. 4* *sw - sometimes weak*				
D_{el}	*RHD*(K409K)	+ +	+	+	+	−	−	−	−					
D-positive	*RHD / RHD*(M295I)	+ +	+	+	+	−	+	−	−					
D_{el}	*RHD*(M295I)	+ +	+	+	+	−	+	−	−					
D-positive	*RHD / RHD*(IVS3+1G>A)	+ +	+	+	+	−	−	+	−					
D_{el}	*RHD*(IVS3+1G>A)	+ +	+	+	+	−	−	+	−					
D-positive	*RHD / RHDΨ*	+ +	+ +	+	+	−	−	−	−					
D-negative	*RHDΨ*	+ +	+ +	−	+	−	−	−	−					
D-negative	*RHD-CE(8-9)-D*	+ +	−	+	−	−	−	−	−					
D-negative	*RHD*(W16X)	+ +	+ +	+	+	−	−	−	−					
D-positive	*RHD* / Cde^s	+ +	+	+	+	−	−	−	+					
D-negative	Cde^s / Cde^s; Cde^s/d	−	+	−	+	−	−	−	+					
Beispiele / *Examples*														
ccddee		−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−
Ccddee		−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	+	−
CcD.Ee		+ +	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+	−
ccD.EE		+ +	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+	−	−
CCD.ee		+ +	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	+	−
$CC^wD.Ee$		+ +	+	+	+	−	−	−	−	+	−	+	+	+
DVI		+	+	−	+	−	−	−	−					
DIV type 3		+	−	+	−	−	−	−	−					
DFR		+ +	+	−	+	−	−	−	−					

Phänotyp *Phenotype*	Genotyp *Genotype*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Fehlende Banden in den Reaktionen Nr. 1,2,3 oder 4 können auf *RHD* psi oder auf Partial D-Gene hinweisen.
In Gegenwart von Cde^s kommt es zum Ausfall der Reaktion Nr. 9.
Missing bands in reaction no. 1,2,3 or 4 may either indicate RHD psi or partial D genes.
In presence of Cde^s reaction no. 9 is missing.

Proben-ID / *Sample-ID:*

Probenname / *Name:*

Geb.-Datum / *Born:*

Ergebnis / *Result:*

Datum / *Date:*

Unterschrift / *Signature:*

Gelbild / *Gel Image*

Version 2.1 - 08/2010

BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany
Tel.: +49 (0) 6404/925-0
Fax: +49 (0) 6404/925-250
www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
Tel.: +49 (0) 6404/925-450
Fax: +49 (0) 6404/925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
Tel.: +49 (0) 6404/925-125
Fax: +49 (0) 6404/925-421
service@bag-healthcare.com

BAG HEALTH CARE

BAGene

CE LOT 1008 KK

IVD 2012-02

KKD-TYPE

REF 6650

Worksheet und Auswertetabelle / *Worksheet and Evaluation diagram*

Reaktions-Nr. / *Reaction No.*	1	2	3	4	5	6	7	8
PCR-Produkt (Größe in bp) *PCR product (size in bp)*	141	141	133	133	716	716	712	181
Genomische Bezeichnung *Genomic nomenclature*	*KEL*1*	*KEL*2*	*JK*A*	*JK*B*	*FY*A*	*FY*B* ♦	*FY*null01*	*FY*X*
Serologische Bezeichnung *Serological nomenclature*	Kell	Cellano	Jk^a	Jk^b	FY^a	Fy^b $Fy^{b\ weak}$	Fy^{null}	$Fy^{b\ weak}$
	Beispiele / *Examples*							
⇨ *KEL*1/KEL*2; JK*A/JK*A; FY*A/FY*B*	+	+	+	–	+	+	–	–
⇨ *KEL*1/KEL*1; JK*B/JK*B; FY*A/FY*null01*	+	–	–	+	+	–	+	–
⇨ *KEL*2/KEL*2; JK*A/JK*A; FY*B/FY*X oder/or FY*X/FY*X*	–	+	+	–	–	+	–	+

Genotyp *Genotype*	1	2	3	4	5	6	7	8

♦ In Reaktion Nr. 6 kann eine schwache unspezifische Bande (ca. 80 bp) auftreten
In reaction no. 6 a weak unspecific band (app. 80 bp) may occur

Proben-ID / *Sample-ID:*

Probenname / *Name:*

Geb.-Datum / *Birthdate:*

Ergebnis / *Result:*

Datum / *Date:*

Unterschrift / *Signature:*

Gelbild / *Gel Image*

Version 1.0 - 08/2010

BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany
Tel.: +49 (0) 6404/925-0
Fax: +49 (0) 6404/925-250
www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
Tel.: +49 (0) 6404/925-450
Fax: +49 (0) 6404/925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
Tel.: +49 (0) 6404/925-125
Fax: +49 (0) 6404/925-421
service@bag-healthcare.com