



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

*ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ
ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Μελέτη των Rhesus αρνητικών και συχνότητα των τύπων weak D και των ποικιλιών partial D του συστήματος Rhesus σε Αιμοδότες και Ασθενείς του Νοσοκομείου”

ΟΝΟΜΑ: Μαραγκάκη Λαμπρινή

Α.Μ.: 20150656

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Πολίτου Μαριάννα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αθήνα , Οκτώβριος 2019

Ολοκληρώνοντας τη διπλωματική μου εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που βοήθησαν στην ολοκλήρωση της.

Την Καθηγήτρια Αιματολογίας κ. Ανθή Τραυλού για την ευκαιρία που μου έδωσε να παρακολουθήσω αυτό τον μεταπτυχιακό κύκλο σπουδών.

Την επιβλέπουσά μου Καθηγήτρια κ. Μαριάννα Πολίτου για την ανάθεση του θέματος και τις καίριες επισημάνσεις της κατά την πορεία της συγγραφής.

Τη Διευθύντρια του Τμήματος Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Α «Ο Ευαγγελισμός» κ. Αγγελική Μεγάλου για την αμέριστη συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Τον κ. Δημήτρη Ζούλα, Βιολόγο του Τμήματος Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Α «Ο Ευαγγελισμός» για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Τους συναδέλφους μου Χριστίνα Στεργιοπούλου, Φωτεινή Κατινάρη, Βασιλική Κακολύρη, Καλλιόπη Γαλάνη και Γεωργία Μαυράκη για τη βοήθειά τους στη συλλογή των δειγμάτων.

Λαμπρινή Μαραγκάκη

Περίληψη

Το σύστημα Rhesus είναι το πιο πολυμορφικό και το πιο ανοσογόνο σύστημα ομάδων αίματος και μαζί με το ABO το σημαντικότερο στη μεταγγισιοθεραπεία. Το αντιγόνο RhD, ένα πολύπλοκο μωσαϊκό διαφορετικών επιτόπων, είναι το πιο σημαντικό από τα αντιγόνα του συστήματος και προσδιορίζεται σε όλους τους αιμοδότες και ασθενείς. Αν και οι περισσότεροι άνθρωποι είναι RhD θετικοί ή RhD αρνητικοί, υπάρχει ένα ποσοστό που έχουν μια παραλλαγή του αντιγόνου, και ανήκουν στις κατηγορίες εκείνες που φέρουν τους φαινότυπους weak D, partial D και DEL. Η τυποποίηση των αιμοδοτών πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις εκφράσεις του RhD αντιγόνου προκειμένου να αποφευχθεί η anti-D αλλοανοσοποίηση. Για το λόγο αυτό στην καθημερινή εργαστηριακή πρακτική πρέπει να χρησιμοποιούνται αξιόπιστες μέθοδοι, οι οποίες να λαμβάνουν υπόψη τη διαφορετική αντίδραση των εμπορικών αντιορών με τους weak D και partial D φαινότυπους, καθώς επίσης και τη χαμηλή συγκέντρωση του αντιγόνου D σε κάποιες παραλλαγές του.

Σκοπός της μελέτης: Ο στόχος της μελέτης ήταν να προσδιορίσει την κατανομή των πολυμορφισμών του αντιγόνου D σε αιμοδότες και ασθενείς ενός τριτοβάθμιου νοσοκομείου, οι οποίοι παρουσίασαν ασθενή αιμοσυγκόλληση στο RhD κατά τον ορολογικό έλεγχο. Επιπλέον, διερευνήθηκαν τα RHD αλληλόμορφα σε αιμοδότες οι οποίοι προσδιορίστηκαν ως RhD αρνητικοί με ορολογικές δοκιμασίες και είχαν C ή/και E στο φαινότυπο Rhesus. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με πολλαπλούς εκκινητές προκειμένου να ανιχνευτεί το γονίδιο RHD. Τα θετικά δείγματα εξετάστηκαν στη συνέχεια με δυο εμπορικά προϊόντα βασισμένα στην PCR.

Αποτελέσματα: Από τους 27251 αιμοδότες και 36551 ασθενείς οι οποίοι ελέγχθηκαν σε χρονικό διάστημα 30 μηνών, γονοτυπήθηκαν με μέθοδο εμπορική μέθοδο PCR-SSP 140 δείγματα που εμφάνισαν ορολογικά υπολειπόμενη έκφραση του RhD. Από αυτά, τα 56 δείγματα (40%) τυποποιήθηκαν ως weak D type 1, τα 18 (12.86%) ως weak D type 3, τα 2 (1.43%) ως weak D type 4 και τα 12 (8,57%) ως weak D type 5. Επίσης 16 δείγματα (11.43%) ανήκαν στην κατηγορία των partial D, 17 δείγματα (12.14%) ήταν DEL[M295I] και 1 δείγμα (0.71%) υβριδικό αλληλόμορφο RHD-CE(4-7)-D. Τα εναπομείναντα 16 samples (11.43%) δεν μπορούσαν να διευκρινιστούν με τα kit που χρησιμοποιήθηκαν. Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης ελέγχθηκαν 112 δείγματα γενωμικού DNA αιμοδοτών, τα οποία τυποποιήθηκαν ως D- αλλά με C+ ή/και E+ με ορολογικές τεχνικές, για την ύπαρξη συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA ειδικών του RHD γονιδίου. Συγκεκριμένα αναζητήθηκαν περιοχές των RHD promoter, intron 4, exon 7 και exon 10. Η μοριακή ανάλυση ανέδειξε 104 (92.86%) αρνητικά δείγματα σε όλες τις RHD DNA περιοχές. Από τα υπόλοιπα 8 δείγματα (7.24%), όλα με φαινότυπο Ccee, στα 3 ανιχνεύτηκαν οι περιοχές RHD promoter, intron 4, exon 7 και exon 10, σε 3 οι RHD promoter και exon 10, ενώ 2 είχαν μόνο την περιοχή του exon 10 του γονιδίου. Περαιτέρω γονοτυπικός έλεγχος με δυο εμπορικά kit PCR-SSP ανέδειξε 5 υβριδικά RHD/CE υβριδικά αλληλόμορφα [3 RHD-CE(2-9)-D και 2 RHD-CE(3-7)-D], ένα DEL αλληλόμορφο DEL(M295I), ενώ τα άλλα 2 δείγματα δεν ταυτοποιήθηκαν και απαιτείται ο έλεγχός τους με sequencing.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου για την καταγραφή της συχνότητας των ποικιλιών D στα δείγματα αιμοδοτών και ασθενών του νοσοκομείου παρουσίασαν ομοιότητες με αντίστοιχα στοιχεία άλλων ευρωπαϊκών χωρών όσον αφορά τους τύπους weak D 1 και 3, ενώ βρέθηκαν σημαντικά ποσοστά weak D type 5 και DEL(M295I). Η αιμοσυγκόλληση είναι η κύρια μέθοδος αναφοράς στη μεταγγισιοθεραπεία αλλά δεν είναι πάντα επαρκής για τη σωστή ανίχνευση ποικιλιών του RhD και ερυθροκυττάρων με μειωμένο αριθμό D μοριών. Μια στρατηγική γονοτύπησης του RHD, η οποία θα ανιχνεύει τις ποικιλίες του D με ικανότητα αλλοανοσοποίησης και θα επιβεβαιώνει τους D αρνητικούς αιμοδότες με κλινικά σημαντικά αλληλόμορφα, θα μπορούσε να ενισχύσει αποτελεσματικά τον ορολογικό έλεγχο ρουτίνας στην Αιμοδοσία. Τέλος, πολύτιμοι RhD αρνητικοί ασκοί αίματος θα μπορούσαν να εξοικονομηθούν αν ασθενείς οι οποίοι διαθέτουν συγκεκριμένους γονότυπους RHD μεταγγίζονται ως RhD θετικοί.

Abstract

Rh blood group system is the most polymorphic and immunogenic blood group system, and along with the ABO the most significant for clinical practice. The RhD antigen, a complex mosaic of different epitopes, is the most important in the Rh system and is determined in all the blood donors and patients. Although most people are either RhD positive or RhD negative, there is a certain number of people who have a variation of the D antigen, which are called weak D, partial D and DEL phenotypes. Blood donor typing should account for all expressing antigens in order to prevent anti-D alloimmunization. Therefore, highly reliable routine D typing methods must be performed, taking into account the RhD discrepancies caused by variable reactivity of weak D and partial D types with different commercial antisera, as well as the very low antigen density of some of the RhD variants.

Study design: The objective of this prospective study was to determine the relative distribution of D variants among blood donors and patients coming to attention by weak agglutination in RhD with routine serology in a Greek tertiary hospital. Furthermore, the study aimed to investigate RHD alleles among blood donors who typed D- by serologic typing and positive for C and/or E. For this reason a previously published multiplex polymerase chain reaction (PCR) procedure was modified and used for the detection of RHD gene. Positive samples were further characterized by two commercial PCR-SSP kits.

Results: Of 27251 individual blood donors and 36551 patients within a 30 month period, 140 samples with atypical D antigen expression were further RHD genotyped by PCR-SSP technique. Among these, 56 samples (40%) were identified as weak D type 1, 18 (12.86%) as weak D type 3, 2 (1.43%) as weak D type 4, 12 (8.57%) as weak D type 5. An additional 16 samples (11.43%) were identified as partial D, 17 samples (12.14%) represented the DEL[M295I] genotype and 1 sample (0.71%) showed the RHD-CE(4-7)-D hybrid allele. The remaining 16 samples (11.43%) could not be discriminated with the available kits. In the second part of the study genomic DNA from 112 blood donors serologically typed as D- but C+ and/or E+ were tested individually for the presence of RHD-specific DNA sequences in the RHD promoter, intron 4, exon 7 and exon 10. Molecular analysis showed that 104 (92.86%) were negative for all four RHD DNA regions. Among the other 8 samples (7.24%), all of Ccee phenotype, three were found to be positive for RHD promoter, intron 4, exon 7 and exon 10, three for RHD promoter and exon 10, and two for exon 10 alone. Further genotyping revealed five hybrid RHD-CE-D alleles [3 RHD-CE(2-9)-D and 2 RHD-CE(3-7)-D], one allele represented the DEL(M295I) genotype, while the remaining two samples gave inconclusive RHD genotyping results using the PCR-SSP tests and need further investigation by sequencing.

Conclusions: The results from the molecular testing on frequency of D variants in the population of our hospital is in accordance with the results in the populations of other European countries, regarding weak D 1 and 3, though they show a significant percentage of weak D type 5 and DEL(M295I). Serotyping is the standard method to assign transfusion strategies but it is not always capable to correctly define all samples with D variants or reduced amount of D antigen. In order to efficiently support routine serologic D typing, a RHD genotyping strategy is needed to identify D variants with potential for anti-D alloimmunization and to confirm D- blood donors with clinically relevant alleles. Patients belonged to certain molecular categories can be treated as RhD-positive and thus valuable RhD-negative blood reserves can be preserved.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
-----------------------	---

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΜΑΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ Rhesus.....	2
1.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ.....	2
1.2 ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ.....	4
1.3 ΣΥΜΠΛΟΚΟ Rh.....	5
2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ RHD.....	7
2.1 Rhesus D (-) αρνητικό.....	7
2.2 Ποιοτικές παραλλαγές.....	9
2.3 Ποσοτικές παραλλαγές.....	10
2.3.1 Αυξημένη έκφραση.....	10
2.3.2 Μειωμένη έκφραση.....	11
3. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	31
3.1 Αλλοαντισώματα.....	31
3.2 Αυτοαντισώματα.....	32
3.3 Ανοσοποίηση και Weak D.....	34
3.4 Ανοσοποίηση και DEL Αιμοδότες.....	35
3.5 Ανοσοποίηση και Partial D.....	36

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	39
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	40
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	40
2.2 ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ.....	40

2.2.1 Screening ABO-Rhesus ασθενών.....	40
2.2.2 Screening ABO-Rhesus αιμοδοτών.....	41
2.2.3 Επιβεβαίωση.....	41
2.3 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	43
2.3.1 Απομόνωση DNA.....	43
2.3.2 RHD γονοτύπηση D ^u (+).....	44
2.3.3 Screening με PCR-SSP δειγμάτων D ^u (-).....	45
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
3.1 Συχνότητα των παραλλαγών του RHD.....	61
3.2 Κατανομή RHD αλληλομόρφων σε Du(-) αιμοδότες με C ή/και E.....	77
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	83
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	89

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αντιγόνα των ομάδων αίματος είναι κληρονομούμενα δομικά χαρακτηριστικά της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) και η έκφρασή τους βασίζεται σε πολυμορφισμούς πρωτεϊνών, γλυκοπρωτεϊνών ή γλυκολιπιδίων. Οι γνώσεις μας εξελίχθηκαν με ταχύ ρυθμό από το 1901, όταν ο Karl Landsteiner ανακάλυψε τα αντιγόνα του ABO συστήματος ομάδων αίματος, και μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί συνολικά 1545 αλληλόμορφα, τα οποία κωδικοποιούνται από 44 γονίδια, και κατατάσσονται σε 34 συστήματα¹.

Η ανοσογονικότητα είναι υπεύθυνη για την ανακάλυψη του συστήματος Rhesus και τεκμηριώνει την κλινική του σημαντικότητα. Ανακαλύφθηκε από τους Levine και Stetson το 1939² χρησιμοποιώντας αντισώματα από μητέρα αμέσως μετά τον τοκετό όταν το νεογνό έπασχε από αιμολυτική αναιμία. Είναι το πιο πολύπλοκο και ανοσογονικό από όλα τα συστήματα των ομάδων αίματος, και μετά το ABO το σημαντικότερο σύστημα στη μεταγγισιοθεραπεία αριθμώντας 54 διαφορετικά αντιγόνα σε δυο πρωτεΐνες (RhD και RhCE) αν και μόνο 5 από αυτά είναι κλινικά σημαντικά. Το Rhesus είναι επίσης και το πιο πολυμορφικό από όλα τα συστήματα των ομάδων αίματος, με παραλλαγές που οφείλονται σε ελλείψεις, γονιδιακές μετατροπές και missense μεταλλάξεις.

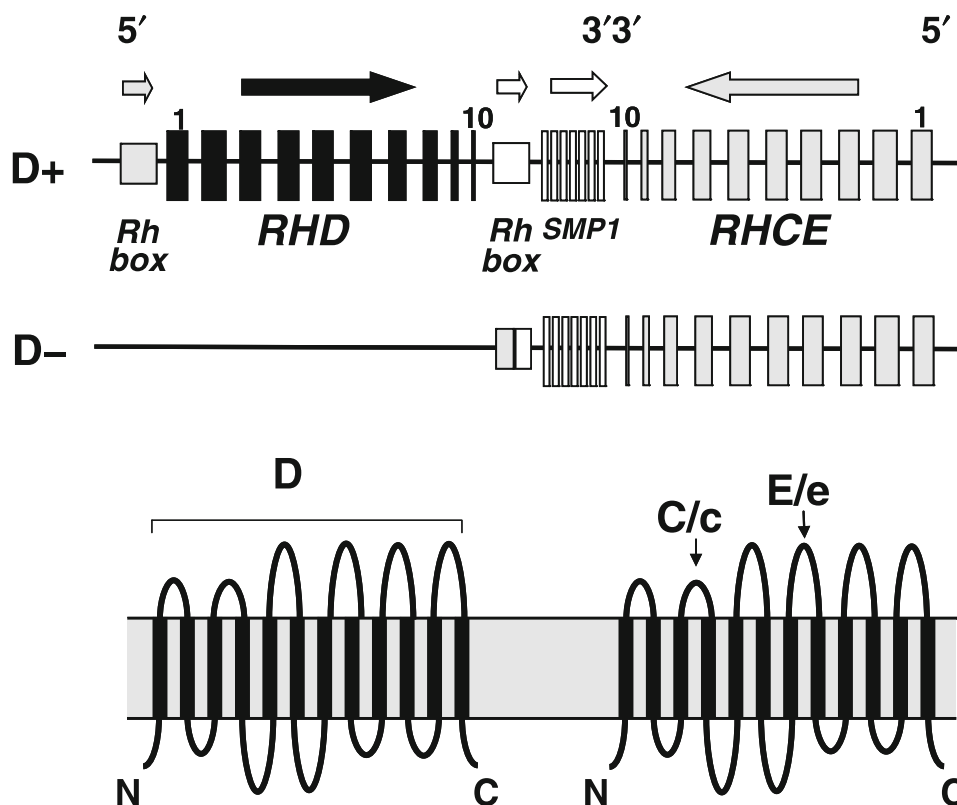
Τα αντιγόνα του συστήματος Rh ανιχνεύονται μόνο στα RBCs και η έκφρασή τους ξεκινά από τα πρόδρομα κύτταρα, ενώ η ανοσογονικότητά τους αυξάνει καθώς ωριμάζει το ερυθροκύτταρο. Στα νεογνά οι αντιγονικοί καθοριστές του συστήματος Rh είναι πλήρως ανεπτυγμένοι. Στην παρούσα εργασία περιγράφονται τα παρακάτω χαρακτηριστικά του: Η μοριακή βάση του συστήματος Rhesus, η οργάνωση των Rhesus πρωτεϊνών στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και η διαμόρφωση του συμπλόκου.

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΜΑΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ Rhesus

1.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ

Το σύστημα Rhesus κωδικοποιείται από δυο γονίδια (RHD, RHCE) με πολύ υψηλή ομολογία (97%), τα οποία βρίσκονται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 1 (1p 34-36.11) έχοντας 10 εξόνια το καθένα, αντίθετη κατεύθυνση πάνω στο χρωμόσωμα ($5'RHD3'-3'RHCE5'$) και απόσταση μεταξύ τους περίπου 30.000 bp⁷. Η μεγαλύτερη διαφορά των δυο γονιδίων βρίσκεται στο εσόνιο 4 στο οποίο το RHD εμφανίζει μια έλλειψη 600 bp σε σχέση με το RHCE. Το RHD με μέγεθος 58053 bp, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RhD (RH1), και τα άτομα στα οποία εκφράζεται στη μεμβράνη των RBCs τους χαρακτηρίζονται ως RhD-θετικά ενώ εκείνα τα οποία δεν το διαθέτουν RhD-αρνητικά. Το δεύτερο γονίδιο είναι το RHCE (67943 bp) το οποίο κωδικοποιεί τα αντιγόνα C (RH2) ή c (RH4) και E (RH3) ή e (RH5), καθώς επίσης και αρκετά άλλα όπως τα C^w (RH8), C^x (RH9) και VS (RH20). Στην ουσία το RHCE είναι το πρωτότυπο γονίδιο ενώ το RHD προέκυψε από διπλασιασμό του RHCE. Από τα 2930 ζευγάρια βάσεων (bp) του RHD και τα 1660 bp του RHCE που μεταγράφονται, προκύπτουν δυο πρωτεΐνες 417 αμινοξέων. Ανάμεσα στο RHD και στο RHCE βρίσκεται ένα τρίτο γονίδιο, το SMP1 (Small Membrane Protein 1) μεγέθους περίπου 30000 bp. Πριν την έναρξη (σε απόσταση 4900 bp) και μετά το τέλος (104 bp από το κωδικόνιο τερματισμού) του RHD βρίσκονται δυο περιοχές με ομολογία 98,6% οι οποίες ονομάζονται Rhesus box, έχουν ίδια κατεύθυνση και μέγεθος 9142 και 9145 bp⁷ (Εικόνα 1).

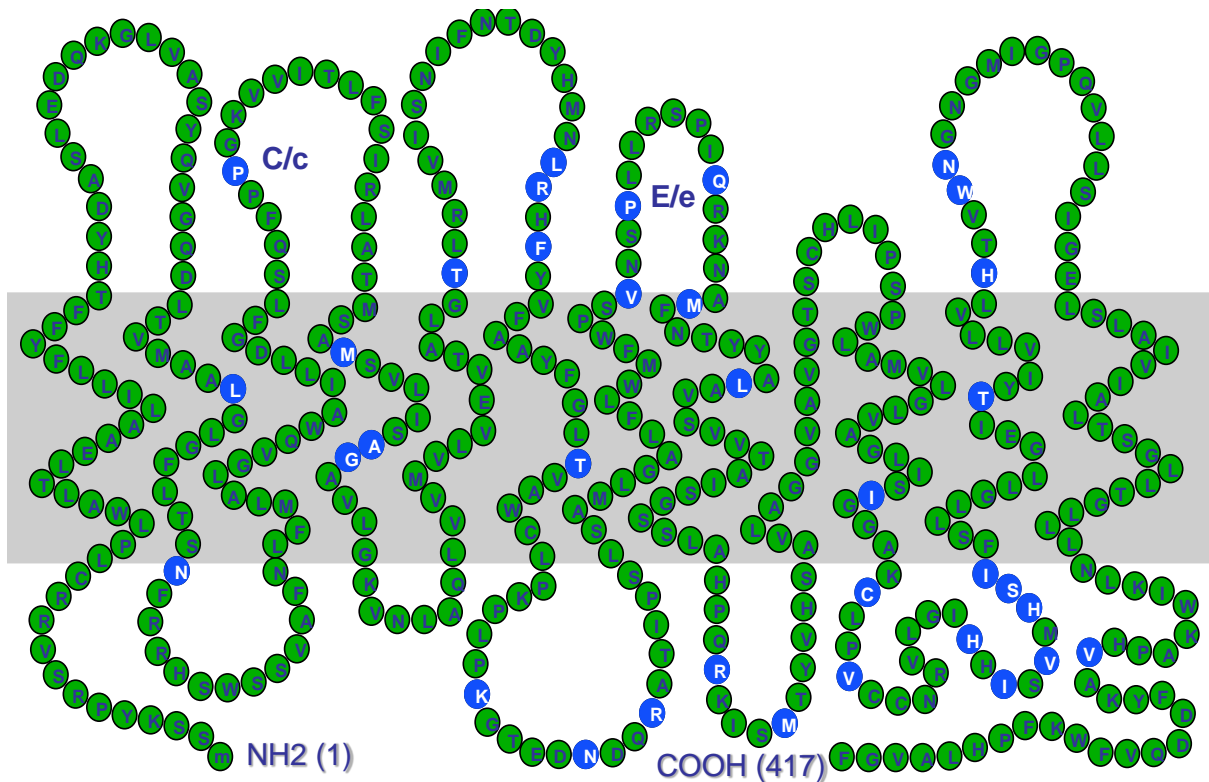


Εικόνα 1.

Τα προϊόντα των γονιδίων του Rhesus είναι πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν παλμιτικό οξύ, αλλά διαφέρουν από τις περισσότερες άλλες πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης διότι δεν φέρουν ολιγοσακχαρική αλυσίδα. Οι πρωτεΐνες RhD και RhCE διαφέρουν μεταξύ τους σε 32 έως 35 αμινοξέα αναλόγως του CcEe φαινοτύπου. Τα Rh αντιγόνα καθορίζονται από τρεις γενετικούς τόπους C, D και E κάθε ένας από τους οποίους έχει δύο αλληλία: C και c, D και d, E και e αντίστοιχα. Εκτός από τα D και d αλληλία, τα υπόλοιπα είναι συνεπικρατή. Επειδή οι γονιδιακοί τόποι C, D και E είναι τόσο κοντά, κληρονομούνται σαν ένα τμήμα και δεν έχει παρατηρηθεί χiasμα μέσα σε αυτήν την περιοχή. Έτσι υπάρχουν 8 διαφορετικοί απλότυποι για την περιοχή αυτή (CDe, cde, cDE, Cde, CDE, Cde και cDE) οι συχνότητες των οποίων ποικίλουν μεταξύ των πληθυσμών, ενώ μερικοί συναντούνται σπανίως. Εκτός από τα κλασσικά αντιγόνα που αντιστοιχούν στα C, D, E, c, d, και e αλληλία, έχουν βρεθεί ποικίλες μορφές των αντιγόνων αυτών: D^U , D^W , D^{Cor} , C^W , C^X , C^U , C^a , E^W , E^T , e^S , $e-like$ κλπ.

1.2 ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ

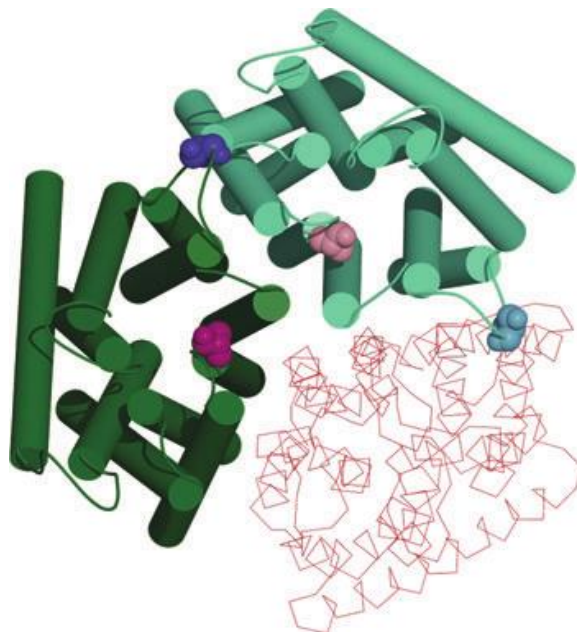
Τα πολυπεπίδια RhD και RhCE έχουν σχεδόν πανομοιότυπη μεμβρανική οργάνωση διαπερνώντας και τα δυο την πλασματική μεμβράνη 12 φορές, δημιουργώντας 6 βρόχους (loops/segments), ενώ το NH₂- και το COOH-τελικό τους άκρο βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 2**). Τα εξωκυττάρια μέρη τους, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν ανοσιακή απόκριση, αντιστοιχούν μόλις στο 25% των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Με μοριακό βάρος (Μ.Β.) 30 έως 32 ΚD είναι και οι δυο πρωτεΐνες υδρόφοβες και μη γλυκοζυλιωμένες.



Εικόνα 2. Η διάταξη και η πρωτοταγής δομή των πρωτεϊνών RhD και RhCE στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Με διαφορετικό χρώμα φαίνονται οι θέσεις διαφοροποίησης μεταξύ τους.

1.3 ΣΥΜΠΛΟΚΟ Rh

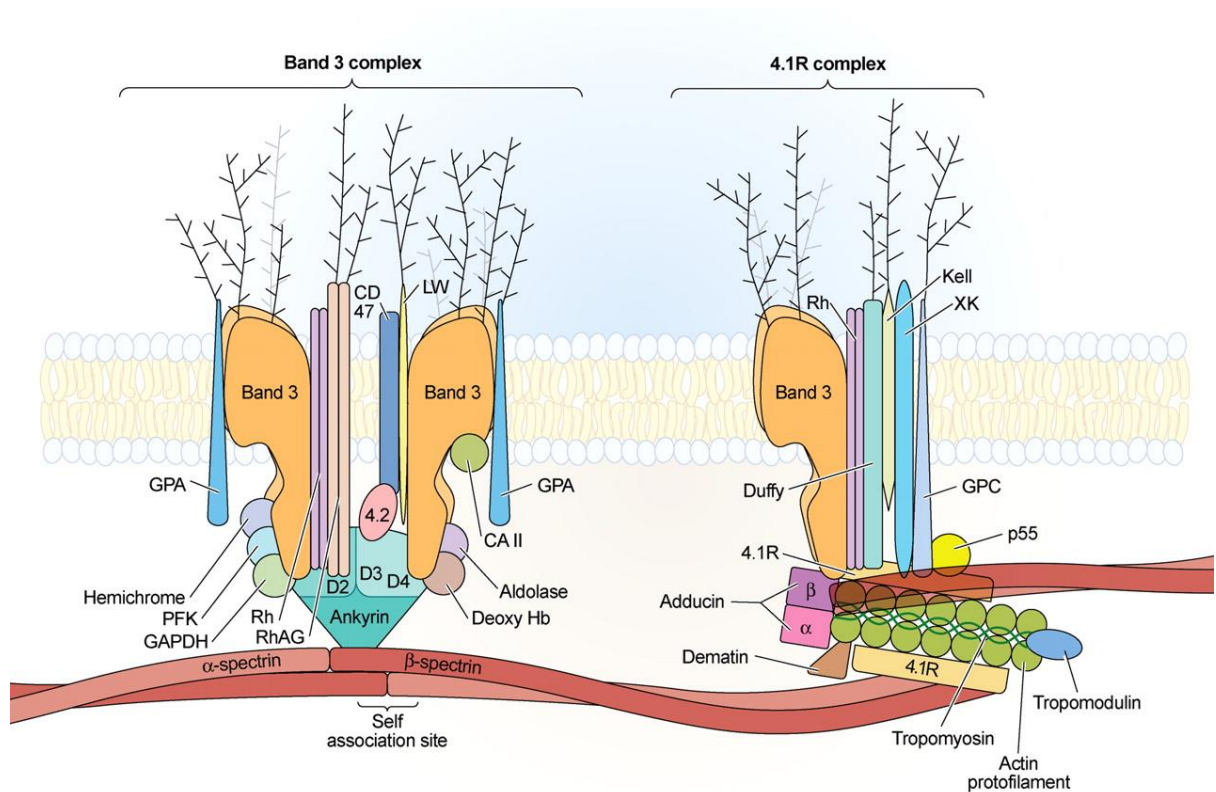
Οι πρωτεΐνες Rhesus στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη βρίσκονται σε μεγάλη εγγύτητα με την γλυκοπρωτεΐνη RhAG σχηματίζοντας μια ετεροτριμερή δομή⁸, το "σύμπλοκο Rh" (Εικόνα 3)¹¹.



Εικόνα 3.

Η RhAG κωδικοποιείται από γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 (6p12-p21), παρουσιάζει ομολογία περίπου 36% με τα πολυπεπίδια RhD και RhCE αλλά δεν παρουσιάζει πολυμορφισμούς και για το λόγο αυτό δεν είναι ανοσογόνος. Το σύμπλοκο Rh συνδέεται με άλλα μόρια όπως οι γλυκοπρωτεΐνες LW, Duffy, Glycophorin A (GPA), Glycophorin B (GPB) και οι πρωτεΐνες band 3 και CD47 χωρίς να είναι απαραίτητα για την έκφρασή του. Η όλη δομή είναι σταθερά προσδεμένη στον κυτταροσκελετό της μεμβράνης μέσω της πρωτεΐνης 4.2 και της ανκυρίνης (Εικόνα 4)¹⁰. Αντιθέτως η έκφραση των πρωτεϊνών Rhesus εξαρτάται από τη λειτουργική γλυκοπρωτεΐνη RhAG. Όταν αυτή λείπει, λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο της, δεν εκφράζονται τα αντιγόνα D, C, c, E, e και ο φαινότυπος αναφέρεται ως Rh_{null}. Οι αλλαγές στο σχήμα των RBCs, ιδιαίτερα σε Rh_{null} άτομα, υποδηλώνουν την ισχυρή

αλληλεπίδραση του συμπλόκου Rh με τις πρωτεΐνες του μεμβρανικού κυτταροσκελετού¹². Η λειτουργία του συμπλόκου φαίνεται να σχετίζεται τόσο με τη μεταφορά αμμωνίας, μέσω της πρωτεΐνης RhAG,²⁰ ενώ μια πιθανή λειτουργία των πρωτεϊνών Rhesus να είναι η ανταλλαγή CO₂ και O₂ διαμέσου της μεμβράνης των RBCs.



Εικόνα 4. *Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: New insights into the structural organization of the red blood cell membrane, Marcela Salomao, Xihui Zhang, Yang Yang, Soohee Lee, John H. Hartwig, Joel Anne Chasis, Narla Mohandas, and Xiuli An, PNAS June 10, 2008 vol. 105 no. 23, 8026 – 8031*

2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ RHD

Η μοριακή βάση των μηχανισμών στους οποίους οφείλονται οι πολυμορφισμοί για το σύστημα Rhesus είναι¹⁰:

- Σημειακές μεταλλάξεις ή Single nucleotide polymorphisms (SNPs), οι οποίες οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέων, με συνέπεια την απώλεια επιτόπων ή/και την έκφραση χαμηλής συχνότητας αντιγόνων της εξωκυττάριας περιοχής της πρωτεΐνης.
- Γονιδιακή έλλειψη, όπως στην περίπτωση των RhD-αρνητικών.
- Διπλασιασμός αλληλουχίας μαζί με μια μετάλλαξη χωρίς νόημα (nonsense mutation), η οποία μετατρέπει ένα αμινοξύ σε κωδικόνιο λήξης, όπως εμφανίζεται στο ανενεργό γονίδιο RHDΨ.
- Ανασυνδυασμός μεταξύ των γειτονικών γονιδίων RHD και RHCE, ο οποίος οδηγεί σε σχηματισμό υβριδικών γονιδίων με αρκετές παραλλαγές.
- Παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense mutations).
- Ελλείψεις νουκλεοτιδίων, οι οποίες προκαλούν μετατόπιση πλαισίου και δημιουργία πρώιμου κωδικόνιου λήξης.

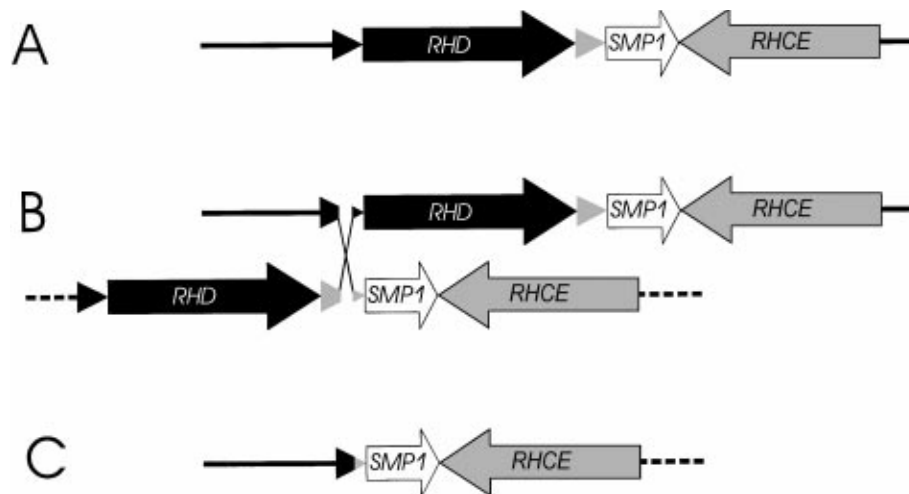
2.1 Rhesus D (-) αρνητικό

Τα D αρνητικά RBCs δεν εκφράζουν πλήρως την RhD πρωτεΐνη στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε τρεις μοριακούς μηχανισμούς, οι οποίοι διαφέρουν σε συχνότητα ανάμεσα στις φυλές:

1. Ολική έλλειψη του γονιδίου RHD
2. Ψευδογονίδιο RHD
3. Υβριδικά γονίδια

Στους Καυκάσιους η συχνότητα των D (-) κυμαίνεται από 15-17% και ο πιο συχνός μηχανισμός είναι η ολοκληρωτική έλλειψη του γονιδίου. Ο φαινότυπος RhD(-) ως επί το πλείστον παρουσιάζεται όταν βρεθεί σε ομοζυγωτία ο απλότυπος στον οποίο λείπει το RHD. Η RHD έλλειψη αποδίδεται στον άνισο διασκελισμό, ο οποίος μπορεί να συμβεί στο στάδιο

ζυγοταινίας της μείωσης μεταξύ των Rhesus box ακολουθιών. Ο ανασυνδυασμός αυτός λαμβάνει χώρα σε μια περιοχή 1463 bp, η οποία είναι σχεδόν πανομοιότυπη (99,9%) στα δυο Rhesus box, οδηγεί στη δημιουργία ενός Rhesus box υβριδικού γονιδίου και στο Rhesus D (-) (Εικόνα 5)⁷. Σπανιότατα ο φαινότυπος RhD(-) οφείλεται σε γονιδιακούς ανασυνδυασμούς ή σημειακές μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε κωδικόνια τερματισμού.



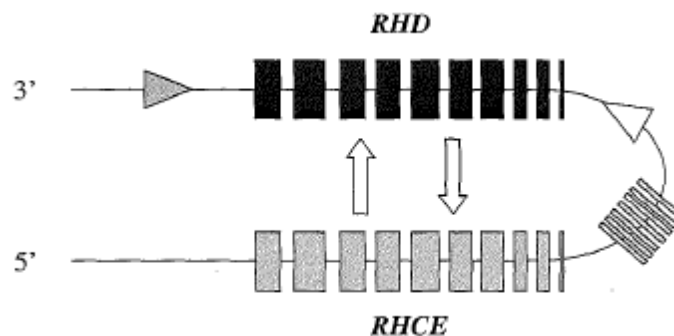
Εικόνα 5. Μοντέλο του προτεινόμενου μηχανισμού ο οποίος οδηγεί στον απλότυπο RhD(-) στους Καυκάσιους. (A) Η φυσιολογική δομή των RHD και RHCE γονιδίων. (B) Ο άνισος διασκελισμός μεταξύ των Rhesus boxes οφείλεται στην υψηλή ομολογία τους. (C) Στο προϊόν αυτού του ανασυνδυασμού λείπει εντελώς το γονίδιο RHD.

Η έλλειψη του RHD γονιδίου παρατηρείται στο 18% των Αφρικανών και στο 60% των Ασιατών, αν και στους τελευταίους το RHD γονίδιο βρίσκεται σε λιγότερο από το 1% του πληθυσμού. Η συχνότερη παραλλαγή στους D(-) Ασιάτες είναι ο φαινότυπος D_{el} RHD (K409K), δηλαδή το 10-30% έχουν ακέραιο το RHD γονίδιο. Οι μηχανισμοί στους οποίους οφείλεται ο μεγάλος αριθμός μη λειτουργικών RhD αλληλομόρφων ποικίλουν.

Ο συχνότερος μοριακός μηχανισμός για το φαινότυπο RhD(-) στους Αφρικανούς (~70%) είναι η παρουσία ενός ψευδογονιδίου RHD, το RHDΨ, συνδεδεμένο με το ce αλληλόμορφο του RHCE γονιδίου. Το ψευδογονίδιο αυτό περιέχει ένα διπλασιασμό 37 bp, ο οποίος περιλαμβάνει τα τελευταία 19 νουκλεοτίδια του εσώνιου 3 και τα πρώτα 18 του εξώνιου 4. Αυτό οδηγεί σε 4 παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις στο εξώνιο 5 (609G>A, 654G>C,

667T>G, 674C>T) και μια μη νοηματική μετάλλαξη (nonsense mutation) στο εξώνιο 6 (807T>G), δημιουργώντας έτσι ένα κωδικόνιο τερματισμού (Y269X)¹⁶. Έτσι η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι μη λειτουργική και δεν ενσωματώνεται πολυπεπτίδιο D στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη.

Όσον αφορά το φαινότυπο RhD(-) λόγω υβριδικών γονιδίων, η μεγάλη ομολογία και η αντίθετη κατεύθυνση καθώς επίσης και η κοντινή απόσταση των RHD και RHCE γονιδίων στο ίδιο χρωμόσωμα, ευνοούν μια cis γονιδιακή μετατροπή μέσω σχηματισμού δομών φουρκέτας (Εικόνα 6), στην οποία το εσωτερικό τμήμα ενός γονιδίου ανταλλάσσεται με αντίστοιχο τμήμα ενός άλλου γονιδίου. Έτσι δημιουργούνται τα RHD-CE-D και RHCE-D-CE αλληλόμορφα.



Εικόνα 6. Η δημιουργία *RHD-CE-D* και *RHCE-D-CE* υβριδικών γονιδίων ή αντικαταστάσεις αμινοξέων, μπορεί να συμβούν μετά από δημιουργία hairpin (δομή φουρκέτας) συζευγνύοντας τα RHD και RHCE in cis.

2.2 Ποιοτικές παραλλαγές

Οι ποιοτικές παραλλαγές του RhD βρέθηκαν όταν άτομα τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως RhD(+) ανέπτυξαν αντισώματα αλλοαντι-D μετά από την έκθεσή τους σε RhD(+) αίμα. Το αντιγόνο RhD διαθέτει μεγάλο αριθμό επιτόπων και τα RBCs στα οποία λείπουν ένας ή περισσότεροι επιτόποι θεωρούνται partial D. Τα άτομα αυτά μπορεί να ανοσοποιηθούν έναντι των επιτόπων που λείπουν. Μελέτες με μονοκλωνικά αντισώματα επέτρεψαν τον προσδιορισμό περισσότερων από 30 επιτόπων σε διαφορετικούς εξωκυττάριους βρόχους. Η απουσία ενός ή περισσότερων επιτόπων στα

Partial D RBCs μπορεί να προήλθε από γενετικό ανασυνδυασμό των RHD και RHCE γονιδίων μέσω σχηματισμού δομών φουρκέτας (Εικόνα 6), προκαλώντας τη δημιουργία RHD-CE-D και RHCE-D-CE αλληλομόρφων¹³. Οι ανωμαλίες αυτές του Rh, δημιουργώντας νέες υβριδικές πρωτεΐνες, οδήγησε τόσο στην έλλειψη κάποιων D επιτόπων όσο και στη παραγωγή νέων αντιγόνων. Επιπροσθέτως υπάρχουν και μερικοί partial D φαινότυποι οι οποίοι οφείλονται σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα weak D, αυτοί οι πολυμορφισμοί βρίσκονται στις εξωκυττάρειες περιοχές του RhD, γεγονός που οδηγεί αυτούς τους partial D ασθενείς να παράγουν συχνά anti-D αντισώματα έναντι των απόντων επιτόπων όταν έρχονται σε επαφή με ολόκληρη την πρωτεΐνη. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι μέχρι σήμερα γνωστές κατηγορίες D partial, οι νουκλεοτιδικές-αμινοξικές αλλαγές στις οποίες οφείλονται και το εξόνιο στο οποίο εδράζονται, καθώς επίσης και τα υβριδικά γονίδια.

2.3 Ποσοτικές παραλλαγές

Ο αριθμός των αντιγόνων D στην επιφάνεια των RBCs κυμαίνεται μεταξύ 10.000 και 33.000¹⁷. Οι ποσοτικές αποκλίσεις διακρίνονται σε εκείνες με αυξημένη (π.χ. D--) και σε εκείνες με μειωμένη έκφραση (weak D, DEL, Rhnull).

2.3.1 Αυξημένη έκφραση

Οι εξαιρετικά σπάνιοι Rhesus φαινότυποι D-- στους οποίους δεν εκφράζονται τα RhE, Rhe και μερικές φορές ούτε και τα RhC, Rhc αντιγόνα, εμφανίζουν αυξημένη έκφραση του αντιγόνου RhD (50.000 έως 100.000 ανά ερυθροκύτταρο).¹⁸ Η αύξηση αυτή εξηγείται από την ύπαρξη, παράλληλα με το RHD, ενός υβριδικού γονιδίου το οποίο προέρχεται από την ένθεση ενός μεγάλου τμήματος του RHD γονιδίου στο RHCE.


2.3.2 Μειωμένη έκφραση

Weak D

Στους Καυκάσιους ένα ποσοστό 0,2-1% παρουσιάζει μειωμένη έκφραση του D αντιγόνου¹⁴. Παραδοσιακά η έμμεση συγκολλητινοαντίδραση RBCs με anti-D αντιορό η οποία δίνει θετικό αποτέλεσμα μετά από παρατεταμένο χρονικό διάστημα ονομάζεται D weak, παλαιότερα γνωστό ως D^u. Ωστόσο ο αριθμός των δειγμάτων τα οποία κατατάσσονται στα weak D εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του χρησιμοποιούμενου αντιδραστηρίου. Μελέτες με ανάλυση Southern Blot και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RQ-PCR, Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction) έδειξαν ότι η μειωμένη έκφραση του D σε σχέση με το αναμενόμενο δεν οφείλεται ούτε σε διαταραγμένη μεταγραφική δραστηριότητα ούτε σε αστάθεια του μορίου του mRNA.¹⁹ Η ασθενής αυτή έκφραση προκύπτει πρωτίστως από σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο RHD, οι οποίες κωδικογραφούν αντικαταστάσεις αμινοξέων του πολυπεπτιδίου που βρίσκονται στην ενδοκυττάρια ή στη διαμεμβρανική περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης των RBCs. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στη δευτεροταγή ή στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης RhD. Οι αντικαταστάσεις των αμινοξέων στους περισσότερους τύπους D weak βρίσκονται σε περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με θεμελιώδη ρόλο στη διαδικασία μεταφοράς και ενσωμάτωσής της στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Παραλλαγές στη στερεοδομή του RhD δυσχεραίνει την πορεία δημιουργίας του συμπλόκου Rhesus και τη συνεργασία του με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της μεμβράνης, με συνέπεια πολλά RhD μόρια να αποικοδομούνται εσωκυττάρια.

Έτσι εξηγείται ο μειωμένος αριθμός των αντιγόνων RhD στα RBCs. Ωστόσο επειδή οι weak D φαινότυποι είναι ποσοτικοί και όχι ποιοτικοί πολυμορφισμοί, στις περισσότερες περιπτώσεις υπάρχουν όλοι οι ανοσογόνοι επίτοποι στο αντιγόνο D και ως εκ τούτου η αλλοανοσοποίηση έναντι του D είναι θεωρητικά απίθανη. Η ύπαρξη των επιτόπων και ο

χαμηλός αριθμός D μορίων εξηγούν τις ασθενείς, πλην όμως θετικές ορολογικές αντιδράσεις κατά την ανίχνευση του RhD. Ασθενής έκφραση του D μπορεί να προκύψει επίσης λόγω position effect (επίδραση θέσης), όταν δηλαδή το RHC γονίδιο βρίσκεται in trans (στο άλλο χρωμόσωμα) σε σχέση με το RHD.

<p><u>C σε θέση <i>trans</i> με το D:</u></p> <p>Dc e / dCe</p>		Weak D
<p><u>C σε θέση <i>cis</i> με το D:</u></p> <p>DCE / dce</p>		<u>NO</u> weak D

Στον Πίνακα 2 αναφέρονται ενδεικτικά κάποιοι τύποι D weak και ο αριθμός των αντιγόνων Rhesus στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων.

Weak D φαινότυπος	Αριθμός D αντιγόνων ανά RBC
Type 1*	1.300
Type 2*	500
Type 3*	1.900
Type 4.0*	2.300
Type 4.1*	3.800
Type 5*	300
Type 6*	1.000
Type 7*	2.400
Type 8*	1.000
Type 9*	250
Type 10*	1.200
Type 11*	200
Type 12*	100
Type 13*	1.000
Type 16*	250
Type 17*	60
Type 20**	6.200
Type 21*	5.200
Type 26**	30
Type 31**	130
Type 32**	50

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. *The Blood Group Antigen (3/e), 2012 Elsevier Ltd.

**Günther Körmöczi, Department of Blood Group Serology and Transfusion Medicine, Medical University of Vienna, Austria.

DEL

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν RBCs τα οποία εκφράζουν πολύ χαμηλά επίπεδα του αντιγόνου D (<30). Η πολύ ασθενής αυτή μορφή του D, δεν μπορεί να αναγνωριστεί με τις συμβατικές ορολογικές μεθόδους, παρά μόνο μετά από προσρόφηση και ακολούθως έκλουση anti-D αντιορού, εξού και το όνομά της. Οι τύποι DEL είναι πολύ σπάνιοι στην Ευρώπη, ενώ στην Ανατολική Ασία έως το 30% των D(-), οι οποίοι προσδιορίστηκαν με συμβατικές μεθόδους, βρέθηκαν να είναι φορείς DEL αλληλομόρφων. Η παρουσία DEL δε φαίνεται να σχετίζεται με ανάπτυξη anti-D.

Rhnull

Ο φαινότυπος Rhnull είναι μια πολύ σπάνια ομάδα αίματος με συχνότητα 1:6.000.000¹⁰, η οποία χαρακτηρίζεται από την απουσία έκφρασης όλων των αντιγόνων Rhesus (D, C, c, E, και e) στη μεμβράνη των RBCs. Υπάρχουν δυο τύποι Rhnull, ο άμορφος και ο ρυθμιστικός, οι οποίοι έχουν οριστεί με βάση τον τρόπο κληρονόμησής τους. Ο άμορφος τύπος είναι το αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο γονίδιο RHCE με ταυτόχρονη έλλειψη του RHD, δεν εκφράζονται πρωτεΐνες Rh και υπάρχουν μειωμένα επίπεδα RhAG. Στον ρυθμιστικό τύπο, ο οποίος είναι ο πιο συχνός, υπάρχουν μεταλλάξεις ή έλλειψη του γονιδίου RHAG και απουσία των Rh και RhAG πρωτεϊνών.^{21,22} Στο φαινότυπο Rhmod τα Rh αντιγόνα υπάρχουν αλλά είναι κατασταλαμένα. Η πρωτεΐνη RhAG παίζει σημαντικό ρόλο στη σωστή διάταξη των Rh πρωτεϊνών στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, ενώ απουσία των Rh πρωτεϊνών, αν και σε μειωμένη ποσότητα, μπορεί μόνη της να συμμετέχει στη διαμόρφωση σταθερών συμπλόκων.²³

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα weak D και Del αλληλόμορφα, οι νουκλεοτιδικές-αμινοξικές αλλαγές στις οποίες οφείλονται και το εξόνιο στο οποίο εδράζονται σύμφωνα με ISBT (v5.0 180207).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Τα D partial σύμφωνα με την International Society of Blood Transfusion (ISBT)

Common category or name Phenotype(s)	Allele name	Nucleotide change	Exon(s)	Amino Acid(s)	Allele Name Detail	Comments Reported as:
D RH:1	RHD*01					
Normal D antigen	RHD*01.01	c.48G>C	1	p.Trp16Cys	RHD*48C	DUC-3
DII	RHD*02 RHD*DII	c.1061C>A	7	p.Ala354Asp	RHD*1061A	
DIIIa RH:54 (DAK+)	RHD*03.01 RHD*DIIIa	c.186G>T; c.410C>T; c.455A>C; c.602C>G; c.667T>G; c.819G>A	2,3,4,5,6	p.Leu62Phe; p.Ala137Val; p.Asn152Thr; p.Thr201Arg; p.Phe223Val; silent	RHD*186T,410T,455C,602G,667G	Also reported as DIIIa type 5 (obsolete) Original DIIIa report missed 186G>T, 410C>T, and 819G>A
DIIIb Caucasian RH:54 (DAK+) RH:-12 (G-)	RHD*03.02 RHD*DIIIb	c.150T>C; c.178A>C; c.201G>A; c.203G>A; c.307T>C	2	silent; p.Ile60Leu; silent; p.Ser68Asn; p.Ser103Pro	RHD*D-CE(2)-D	
DIIIc	RHD*03.03 RHD*DIIIc	c.361T>A; c.380T>C; c.383A>G; c.455A>C	3	p.Leu121Met; p.Val127Ala; p.Asp128Gly; p.Asn152Thr	RHD*D-CE(3)-D	
DIII type 4	RHD*03.04 RHD*DIII.04	c.186G>T; c.410C>T; c.455A>C	2, 3	p.Leu62Phe; p.Ala137Val; p.Asn152Thr	RHD*186T,410T,455C	
Not tested	RHD*03.04.02 RHD*DIII.04.02	c.186G>T; c.307T>C; c.410C>T; c.455A>C	2,3	p.Leu62Phe; p.Ser103Pro; p.Ala137Val; p.Asn152Thr	RHD*186T,307C,410T,455C	<i>In trans</i> to DAR1
DIII type 6	RHD*03.06 RHD*DIII.06	c.410C>T; c.455A>C; c.602C>G; c.667T>G; c.819G>A	3,4,5,6	p.Ala137Val; p.Asn152Thr; p.Thr201Arg; p.Phe223Val; silent	RHD*410T,455C,602G,667G	
DIII type 7 (likely the historically defined DIIIb)	RHD*03.07 RHD*DIII.07	c.150T>C; c.178A>C; c.201G>A; c.203G>A; c.307T>C; c.410C>T; c.455A>C c.602C>G c.667T>G	2,3,4,5	silent; p.Ile60Leu; silent; p.Ser68Asn; p.Ser103Pro; p.Ser103Pro; p.Ala137Val; p.Asn152Thr; p.Thr201Arg; p.Phe223Val	RHD*D-CE(2)-410T,455C,602G,667G-D	
DIII type 8	RHD*03.08 RHD*DIII.08	c.410C>T; c.455A>C	3	p.Ala137Val; p.Asn152Thr	RHD*410T,455C	
DIII type 9	RHD*03.09 RHD*DIII.09	c.186G>T c.410C>T c.455A>C c.667T>G	2,3,4,5	p.Leu62Phe; p.Ala137Val; p.Asn152Thr; p.Phe223Val	RHD*186T,410T,455C,667G	
DIVa RH30+ (Goa+)	RHD*04.01 RHD*DIVa	c.186G>T; c.410C>T; c.455A>C; c.1048G>C	2,3,7	p.Leu62Phe; p.Ala137Val; p.Asn152Thr; p.Asp350His	RHD*186T,410T,455C,1048C	Often with <i>RHCE*ceT1</i>
DIVa type 2 obsolete						original DIVa report missed 410C>T change
DIVa-like or DIVa type 3	RHD*04.01.02	c.186G>T; c.410C>T; c.455A>C; c.667T>G; c.1048G>C	2,3,7	p.Leu62Phe; p.Ala137Val; p.Asn152Thr; p.Phe223Val; p.Asp350His	RHD*186T,410T,455C,667G,1048C	Was found with <i>RHCE*ceT1</i>

Common category or name Phenotype(s)	Allele name	Nucleotide change	Exon(s)	Amino Acid(s)	Allele Name Detail	Comments Reported as:
DIV type 3	RHD*04.03 RHD* DIV.3	c.916G>A; c.932A>G; c.941G>T; c.968C>A; c.974G>T; c.979A>G; c.985G>C; c.986G>A; c.989A>C; c.992A>T; c.1025T>C; c.1048G>C; c.1053C>T; c.1057G>T; c.1059A>G; c.1060G>A; c.1061C>A; c.1063 G>T; c.1170 T>C; c.1193 A>T	6,7,8,9	p.Val306Ile; p.Tyr311Cys; p.Gly314Val; p.Pro323His; p.Ser325Ile; p.Ile327Val; p.Gly329His; p.Gly329His; p.Tyr330Ser; p.Asn331Ile; p.Ile343Thr; p.Asp350His; silent; p.Gly353Trp; p.Gly353Trp; p.Ala354Asn; p.Ala354Asn; silent; silent; p.Glu398Val	RHD*D-CE(6-9)-D	
DIV type 4	RHD*04.04 RHD*DIV.4	c.1048G>C, c.1053C>T; c.1057G>T; c.1059A>G; c.1060G>A; c.1061C>A	7	p.Asp350His; silent; p.Gly353Trp; p.Gly353Trp; p.Ala354Asn; p.Ala354Asn	RHD*1048C,1057T,1059G,1060A,1061A	
DIV type 5	RHD*04.05 RHD*DIV.5	c.941G>T; c.968C>A; c.974G>T; c.979A>G; c.985G>C; c.986G>A; c.989A>C; c.992A>T; c.1025T>C; c.1048G>C; c.1053C>T; c.1057G>T c.1059A>G; c.1060G>A; c.1061C>A; c.1063G>T; c.1170T>C; c.1193A>T	7,8,9	p.Gly314Val; p.Pro323His; p.Ser325Ile; p.Ile327Val; p.Gly329His; p.Gly329His; p.Tyr330Ser; p.Asn331Ile; p.Ile342Thr; p.Asp350His; silent; p.Gly353Trp; p.Gly353Trp; p.Ala354Asn; p.Ala354Asn; silent; silent; p.Glu398Val	RHD*D-CE(7-9)-D	

DIVb	RHD*04.06 RHD*DIVb	c.1048G>C; c.1053C>T; c.1057G>T; c.1059A>G; c.1060G>A; c.1061C>A; c.1170T>C; c.1193A>T	7,8,9	p.Asp350His; silent; p.Gly353Trp; p.Gly353Trp; p.Ala354Asn; p.Ala354Asn; silent; p.Glu398Val	RHD*D-1048C,1057T,1059G,1060A,1061A -CE(8-9)-D	
DV type 1	RHD*05.01 RHD*DV.1	c.667T>G; c.697G>C	5	p.Phe223Val; p.Glu233Gln	RHD*667G,697C	Kou FK
DV type 2	RHD*05.02 RHD*DV.2	c.667T>G; c.697G>C; c.712G>A; c.733G>C; c.744C>T; c.787G>A; c.800A>T	5	p.Phe223Val; p.Glu233Gln; p.Val238Met; p.Val245Leu; silent; p.Gly263Arg; p.Lys267Met	RHD*D-CE(5)-D	Hus
DV type 3	RHD*05.03 RHD*DV.3	c.667T>G; c.676G>C; c.697G>C; c.712G>A	5	p.Phe223Val; p.Ala226Pro; p.Glu233Gln; p.Val238Met	RHD*667G,676C,697C,712A	Also known as DBS0
DV Type 4 RH:23 (D ⁺⁺)	RHD*05.04 RHD*DV.4	c.697G>C	5	p.Glu233Gln	RHD*697C	SM
DV type 5 RH:-23 (D ⁻)	RHD*05.05 RHD*DV.5	c.697G>A	5	p.Glu233Lys	RHD*697A	DHK, DYO
DV type 6	RHD*05.06 RHD*DV.6	c.667T>G; c.697G>C; c.712G>A	5	p.Phe223Val; p.Glu233Gln; p.Val238Met	RHD*667G,697C,712A	Jpn
DV type 7	RHD*05.07 RHD*DV.7	c.667T>G; c.697G>C; c.712G>A; c.733G>C; c.744C>T; c.787G>A	5	p.Phe223Val; p.Glu233Gln; p.Val238Met; p.Val245Leu; p.Gly263Arg; silent; p.Gly263Arg	RHD*667G,697C,712A,733C,787A	DAL
DV type 8	RHD*05.08 RHD*DV.8	c.667T>G; c.697G>C; c.712G>A; c.733G>C; c.744C>T	5	p.Phe223Val; p.Glu233Gln; p.Val238Met; p.Val245Leu; silent		TT
DV type 9	RHD*05.09 RHD*DV.9	c.697G>C; c.712G>A	5	p.Glu233Gln; p.Val238Met	RHD*697C,712A	TO

Common category or name Phenotype(s)	Allele name	Nucleotide change	Exon(s)	Amino Acid(s)	Allele Name Detail	Comments Reported as:
DV type 10	RHD*05.10 RHD*DV.10	c.667T>G; c.697G>C; c.712G>A; c.733G>C; c.744C>T; c.787G>A; c.800A>T; c.916G>A; c.932A>G	5,6	p.Phe223Val; p.Glu233Gln; p.Val238Met; p.Val245Leu; silent; p.Gly263Arg; p.Lys267Met; p.Val306Ile; p.Tyr311Cys	RHD*D-CE-(5-6)-D	
DVI type 1 RH:—52 (BARC—)	RHD*06.01 RHD*DVI.1	c.505A>C; c.509T>G; c.514A>T; c.544T>A; c.577G>A; c.594A>T; c.602C>G; c.667T>G; c.676G>C; c.697G>C; c.712G>A; c.733G>C; c.744C>T; c.787G>A; c.800A>T	4,5	p.Met169Leu; p.Met170Arg; p.Ile172Phe; p.Ser182Thr; p.Glu193Lys; p.Lys198Asn; p.Thr201Arg; p.Phe223Val; p.Ala226Pro; p.Glu233Gln; p.Val238Met; p.Val245Leu; silent; p.Gly263Arg; p.Lys267Met	RHD*D-CE(4-5)-D	linked to RHCE*cE
DVI type 2 RH:52 (BARC+)	RHD*06.02 RHD*DVI.2	c.505A>C; c.509T>G; c.514A>T; c.544T>A; c.577G>A; c.594A>T; c.602C>G; c.667T>G; c.697G>C; c.712G>A; c.733G>C; c.744C>T; c.787G>A; c.800A>T; c.916G>A; c.932A>G	4,5,6	p.Met169Leu; p.Met170Arg; p.Ile172Phe; p.Ser182Thr; p.Glu193Lys; p.Lys198Asn; p.Thr201Arg; p.Phe223Val; p.Glu233Gln; p.Val238Met; p.Val245Leu; silent; p.Gly263Arg; p.Lys267Met; p.Val306Ile; p.Tyr311Cys	RHD*D-CE(4-6)-D	linked to RHCE*cE

DVI type 3 RH:52 BARC+	RHD*06.03.01 RHD*DVI.3	c.361T>A; c.380T>C; c.383A>G; c.455A>C; c.505A>C; c.509T>G; c.514A>T; c.544T>A; c.577G>A; c.594A>T; c.602C>G; c.667T>G; c.697G>C; c.712G>A; c.733G>C; c.744C>T; c.787G>A; c.800A>T; c.916G>A; c.932A>G	3,4,5,6	p.Leu121Met; p.Val127Ala; p.Asp128Gly; p.Asn152Thr; p.Met169Leu; p.Met170Arg; p.Ile172Phe; p.Ser182Thr; p.Glu193Lys; p.Lys198Asn; p.Thr201Arg; p.Phe223Val; p.Glu233Gln; p.Val238Met; p.Val254Leu; silent; p.Gly263Arg; p.Lys267Met; p.Val306Ile; p.Tyr311Cys	RHD*D-CE(3-6)-D	linked to RHCE*cE
DVI type 3.2 BARC not tested	RHD*06.03.02 RHD*DVI.03.02	As above and c.1195G>A	3, 4, 5, 6, 9	As above and p.Ala399Thr	RHD*D-CE(3-6)-D 1195A	
DVI type 4 RH:52 (BARC+)	RHD*06.04 RHD*DVI.4	c.361T>A; c.380T>C; c.383A>G; c.455A>C; c.505A>C; c.509T>G; c.514A>T; c.544T>A; c.577G>A; c.594A>T; c.602C>G; c.667T>G; c.697G>C; c.712G>A; c.733G>C; c.744C>T; c.787G>A; c.800A>T	3,4,5	p.Leu121Met; p.Val127Ala; p.Asp128Gly; p.Asn152Thr; p.Met169Leu; p.Met170Arg; p.Ile172Phe; p.Ser182Thr; p.Glu193Lys; p.Lys198Asn; p.Thr201Arg; p.Phe223Val; p.Glu233Gln; p.Val238Met; p.Val245Leu; silent; p.Gly263Arg; p.Lys267Met	RHD*D-CE(3-5)-D	linked to RHCE*cE
DVII RH:40 (Tar+)	RHD*07.01 RHD*DVII.1	c.329T>C	2	p.Leu110Pro	RHD*329C	
DVII type 2	RHD*07.02 RHD*DVII.2	c.307T>C; c.329T>C	2	p.Ser103Pro; p.Leu110Pro	RHD*307C, 329C	

Common category or name Phenotype(s)	Allele name	Nucleotide change	Exon(s)	Amino Acid(s)	Allele Name Detail	Comments Reported as:
DFV	RHD*08.01 RHD*DFV	c.667T>G	5	p.Phe223Val	RHD*667G	
DAR(T203A)	RHD*09.01 RHD*DAR	c.602C>G; c.607A>G; c.667T>G; c.744C>T; c.957G>A; c.1025T>C	4	p.Thr201Arg; p.Thr203Ala; p.Phe223Val; silent; silent; p.Ile342Thr	RHD*602G,607G,667G,744T,957A,1025C	
DAR1 (weak D 4.2)	RHD*09.01.00 RHD*DAR1.00	c.602C>G; c.667T>G; c.1025T>C	4,5,7	p.Thr201Arg; p.Phe223Val; p.Ile342Thr	RHD*602G,667G,1025C	
DAR1.1 (weak D 4.2.1)	RHD*09.01.01 RHD*DAR1.01	c.602C>G; c.667T>G; c.957G>A; c.1025T>C	4,5,7	p.Thr201Arg; p.Phe223Val; silent; p.Ile342Thr	RHD*602G,667G,1025C	
DAR1.2 (weak D 4.2.2)	RHD*09.01.02 RHD*DAR1.02	c.602C>G; c.667T>G; c.744C>T; c.957G>A; c.1025T>C	4,5,7	p.Thr201Arg; p.Phe223Val; silent; silent; p.Ile342Thr	RHD*602G,667G,1025C	
DAR1.3 (weak D 4.2.3)	RHD*09.01.03 RHD*DAR1.03	c.602C>G; c.667T>G; c.744C>T; c.1025T>C	4,5,7	p.Thr201Arg; p.Phe223Val; silent; p.Ile342Thr	RHD*602G,667G,1025C	
DAR2 (DARE)	RHD*09.02.00 RHD*DAR2.00	c.602C>G; c.667T>G; c.697G>C; c.957G>A; c.1025 T>C	4,5,7	p.Thr201Arg; p.Phe223Val; p.Glu233Gln; silent; p.Ile342Thr	RHD*602G,667G,697C,1025C	Reported as DAR-E
DAR2.1	RHD*09.02.01 RHD*DAR2.01	c.602C>G; c.667T>G; c.697G>C; c.744C>T; c.957G>A; c.1025 T>C	4,5,7	p.Thr201Arg; p.Phe223Val; p.Glu233Gln; silent; silent; p.Ile342Thr	RHD*602G,557G,697C,744T,957A	
DAR3 (weak partial D 4.0.1)	RHD*09.03 RHD*DAR3	c.602C>G; c.667T>G	4,5	p.Thr201Arg; p.Phe223Val	RHD*602G,667G	
DAR3.1 (weak partial D 4.0)	RHD*09.03.01 RHD*DAR3.01	c.602C>G; c.667T>G; c.819G>A	4,5,6	p.Thr201Arg; p.Phe223Val; silent	RHD*602G,667G	

DAR4 (weak D 4.1)	RHD*09.04 RHD*DAR4	c.48G>C; c.602C>G; c.667T>G; c.819G>A	1,4,5,6	p.Trp16Cys; p.Thr201Arg; p.Phe223Val; silent	RHD*48C,602G,667G	
DAR5 (weak D 4.3 or Del)	RHD*09.05 RHD*DAR5	c.602C>G; c.667T>G; c.819G>A; c.872C>G	4,5,6	p.Thr201Arg; p.Phe223Val; silent; p.Pro291Arg	RHD*602G,667G,872G	
DAR6 Or DAR(CE2:V50V-S68N)	RHD*09.06 RHD*DAR6 Or RHD*09.06 RHD*DAR(CE2:V50V-S68N)	c.150T>C; c.178A>C; c.201G>A; c.203G>A; c.602C>G; c.667T>G; c.1025T>C	2,4,5,7	silent; p.Ile60Leu; silent; p.Ser68Asn; p.Thr201Arg; p.Phe223Val; p.Ile342Thr	RHD*150C,178C,201A,203A,602G,667G,1025C	
DAU0	RHD*10.00 RHD*DAU0	c.1136C>T	8	p.Thr379Met	RHD*1136T	
DAU0.01	RHD*10.00.01 RHD*DAU0.01	c.1136C>T; c.579G>A	8 4	p.Thr379Met silent	RHD*1136T,579A	
DAU0.02	RHD*10.00.02 RHD*DAU0.02	c.1136C>T; c.150T>C	8 2	p.Thr370Met Silent(commo n)	RHD*1136T,150C	
DAU1	RHD*10.01 RHD*DAU1	c.689G>T; c.1136C>T	5,8	p.Ser230Ile; p.Thr379Met	RHD*689T,1136T	
DAU2	RHD*10.02 RHD*DAU2	c.209G>A; c.998G>A; c.1136C>T	2,7,8	p.Arg70Gln; p.Ser333Asn; p.Thr379Met	RHD*209A,998A,1136T	
DAU3	RHD*10.03 RHD*DAU3	c.835G>A; c.1136C>T	6,8	p.Val279Met; p.Thr379Met	RHD*835A,1136T	
DAU4	RHD*10.04 RHD*DAU4	c.697G>A; c.1136C>T	5,8	p.Glu233Lys; p.Thr379Met	RHD*697A,1136T	
DAU5	RHD*10.05 RHD*DAU5	c.667T>G; c.697G>C; c.1136C>T	5,8	p.Phe223Val; p.Glu233Gln; p.Thr379Met	RHD*667G,697C,1136T	
DAU5.1	RHD*10.05.01 RHD*DAU5.01	c.667T>G; c.697G>C; c.1122C>T; c.1136C>T	5,8	p.Phe223Val; p.Glu233Gln; silent; p.Thr379Met	RHD*667G,697C,1122T,1136T	
DAU6	RHD*10.06 RHD*DAU6	c.998G>A; c.1136C>T	7,8	p.Ser333Asn; p.Thr379Met	RHD*998A,1136T	
DAU7	RHD*10.07 RHD*DAU7	c.835G>A; c.998G>A; c.1136C>T;	6,7,8	p.Val279Met; p.Ser333Asn; p.Thr379Met	RHD*835A,998A,1136T	

Common category or name Phenotype(s)	Allele name	Nucleotide change	Exon(s)	Amino Acid(s)	Allele Name Detail	Comments Reported as:
DAU8	RHD*10.08 RHD*DAU8	c.340C>T; c.579G>A; c.1136C>T	3, 4, 8	p.Arg114Trp; silent; p.Thr379Met	RHD*340T, 579A, 1136T	
DAU9	RHD*10.09 RHD*DAU9	c.535T>C; c.1136C>T	4, 8	p.Phe179Leu; p.Thr379Met	RHD*535C, 1136T	
DAU10	RHD*10.10 RHD*DAU10	c.579G>A; c.739G>C; c.1136C>T	4, 5, 8	silent; p.Val247Leu; p.Thr379Met	RHD*579A, 739C, 1136T	
DAU11	RHD*10.11 RHD*DAU11	c.254C>T; c.835G>A; c.1136C>T	2, 6, 8	p.Ala85Val; p.Val279Met; p.Thr379Met	RHD*254T, 835A, 1136T	
DAU12	RHD*10.12 RHD*DAU12	c.542T>C; c.1136C>T	4, 8	p.Leu181Pro; p.Thr379Met	RHD*542C, 1136T	
DAU13	RHD*10.13 RHD*DAU13	c.48G>C c.1136C>T	1, 8	p.Trp16Cys; p.Thr379Met	RHD*48C, 1136T	
DAU14	RHD*10.14 RHD*DAU14	c.201G>A; c.203G>A; c.1136C>T	2, 8	silent; p.Ser68Asn; p.Thr379Met	RHD*201A, 203A, 1136T	
RHD(M1V,T379M) Or DAU15	RHD*10.15 RHD*DAU15 Or RHD10.15	c.1A>G; c.1136C>T	1, 8	p.Met1Val; p.Thr379Met	RHD*1G, 1136T	
weak partial 11 or Del	RHD*11 RHD*weak partial 11	c.885G>T	6	p.Met295Ile	RHD*885T	allo-anti-D reported Del phenotype when with RHCE*Ce
DOL1 RH:54(DAK+)	RHD*12.01 RHD*DOL1	c.509T>C; c.667T>G	4,5	p.Met170Th; p.Phe223Val	RHD*509C,667G	
DOL2 RH:54(DAK+)	RHD*12.02 RHD*DOL2	c.509T>C; c.667T>G; c.1132C>G	4,5,8	p.Met170Thr; p.Phe223Val; p.Leu378Val	RHD*509C,667G,1132G	
DOL3	RHD*12.03 RHD*DOL3	c.410C>T; c.509T>C; c.667T>G	3,4,5	p.Ala137Val; p.Met170Thr; p.Phe223Val	RHD*410T,509C,667G	
DOL4	RHD*12.04 RHD*DOL4	c.410C>T c.455A>C c.509T>C c.667T>G	3,4,5	p.Ala137Val; p.Asn152Thr; p.Met170Thr; p.Phe223Val	RHD*410T, 455C, 509C, 667G	

DBS1	RHD*13.01 RHD*DBS1	c.667T>G; c.676G>C; c.697G>C; c.712G>A; c.733G>C; c.744 C>T; c.787G>A; c.800 A>T	5	p.Phe223Val; p.Ala226Pro; p.Glu233Gln; p.Val238Met; p.Val245Leu; silent; p.Gly263Arg; p.Lys267Met	RHD*D-cE(5)-D	
DBS2	RHD*13.02 RHD*DBS2	c.667T>G; c.676G>C; c.697G>C	5	p.Phe223Val; p.Ala226Pro; p.Glu233Gln	RHD*667G,676C,697C	
DBT1	RHD*14.01 RHD*DBT1	c.667T>G; c.697G>C; c.712 G>A; c.733G>C; c.744C>T; c.787G>A; c.800A>T; c.916G>A; c.932A>G; c.941G>T; c.968C>A; c.974G>T; c.979A>G; c.985 G>C; c.986 G>A; c.989 A>C; c.992 A>T; c.1025T>C; c.1048G>C; c.1053C>T; c.1057G>T; c.1059A>G; c.1060G>A; c.1061C>A	5,6,7	p.Phe223Val; p.Glu233Gln; p.Val238Met; p.Val254Leu; silent; p.Gly263Arg; p.Lys267Met; p.Val306Ile; p.Tyr311Cys; p.Gly314Val; p.Pro323His; p.Ser325Ile; p. Ile327Val; p.Gly329His; p.Gly329His; p. Tyr330Ser; p.Asn331Ile; p.Ile342Thr; p.Asp350His; silent; p.Gly353Trp; p.Gly353Trp; p.Ala354Asn; p.Ala354Asn	RHD*D-CE(5-7)-D	

Common category or name Phenotype(s)	Allele name	Nucleotide change	Exon(s)	Amino Acid(s)	Allele Name Detail	Comments Reported as:
DBT2	RHD*14.02 RHD*DBT2	c.667T>G; c.697G>C; c.712G>A; c.733G>C; c.744C>T; c.787G>A; c.800A>T; c.916G>A; c.932A>G; c.941G>T; c.968C>A; c.974G>T; c.979A>G; c.985G>C; c.986G>A; c.989A>C; c.992A>T; c.1025T>C; c.1048G>C; c.1053C>T; c.1057G>T; c.1059A>G; c.1060G>A; c.1061C>A; c.1170T>C; c.1193 A>T	5,6,7,8, 9	p.Phe223Val; p.Glu233Gln; p.Val238Met; p.Val245Leu; silent; p.Gly263Arg; p.Lys267Met; p.Val306Ile; p.Tyr311Cys; p.Gly314Val; p.Pro323His; p.Ser325Ile; p.Ile327Val; p.Gly329His; p.Gly329His; p.Tyr330Ser; p.Asn331Ile; p.Ile342Thr; p.Asp350His; silent; p.Gly353Trp; p.Gly353Trp; p.Ala354Asn; p.Ala354Asn; silent; p.Glu398Val	<i>RHD*D-CE(5-9)-D</i>	
Weak partial Type 15	RHD*15 RHD*weak partial 15	c.845G>A	6	p.Gly282Asp	<i>RHD*845A</i>	allo anti-D reported
DCS1	RHD*16.01 RHD*DCS1	c.667T>G; c.676G>C	5	p.Phe223Val; p.Ala226Pro	<i>RHD*667T,676C</i>	
DCS2	RHD*16.02 RHD*DCS2	c.676G>C	5	p.Ala226Pro	<i>RHD*676C</i>	
DCS-3	RHD*16.02 RHD*DCS3	c.667T>G; c.676G>C; c.697G>C	5	p.Phe223Val; p.Ala226Pro; p.Glu233Gln	<i>RHD*667G,676C,697C</i>	linked to <i>RHCE*cE</i>
DFR1	RHD*17.01 RHD*DFR1	c.505A>C; c.509T>G; c.514A>T	4	p.Met169Leu; p.Met170Arg; p.Ile172Phe	<i>RHD*505C,509G,514T</i>	

DFR2	RHD*17.02 RHD*DFR2	c.505A>C; c.509T>G; c.514A>T; c.544T>A; c.577G>A; c.594A>T; c.602C>G	4	p.Met169Leu; p.Met170Arg; p.Ile172Phe; p.Ser182Thr; p.Glu193Lys; p.Lys198Asn; p.Thr201Arg	<i>RHD*D-CE(4)-D</i>	
DFR3	RHD*17.03 RHD*DFR3	c.505A>C; c.509T>G; c.514A>T; c.539G>C	4	p.Met169Leu; p.Met170Arg; p.Ile172Phe; p.Gly180Ala	<i>RHD*505C,509G,514T,539C</i>	
DFR4	RHD*17.04 RHD*DFR4	c.505A>C; c.509T>G	4	p.Met169Leu; p.Met170Arg	<i>RHD*505C,509G</i>	
DFR5	RHD*17.05 RHD*DFR5	c.361 T>A; c.380 T>C; c.383 A>G; c.455 A>C; c.505 A>C; c.509 T>G; c.514 A>T; c.544 T>A; c.577 G>A; c.594 A>T; c.602 C>G	3,4	p.Leu121Met; p.Val127Ala; p.Asp128Gly; p.Asn152Thr; p.Met169Leu; p.Met170Arg; p.Ile172Phe; p.Ser182Thr; p.Glu193Lys; p.Lys198Asn; p.Thr201Arg	<i>RHD*D-CE(3-4)-D</i>	
DFW	RHD*18 RHD*DFW	c.497A>C	4	p.His166Pro	<i>RHD*497C</i>	
DHMi	RHD*19 RHD*DHMi	c.848C>T	6	p.Thr283Ile	<i>RHD*848T</i>	
DHO	RHD*20 RHD*DHO	c.704A>C	5	p.Lys235Thr	<i>RHD*704C</i>	
Weak partial Type 21	RHD*21 RHD*weak partial D 21	c.938C>T	6	p.Pro313Leu	<i>RHD*938T</i>	allo-anti-D reported
DHR	RHD*22 RHD*DHR	c.686G>A	5	p.Arg229Lys	<i>RHD*686A</i>	
DMH	RHD*23 RHD*DMH	c.161T>C	2	p.Leu54Pro	<i>RHD*161C</i>	
DNAK	RHD*24 RHD*DNAK	c.1070G>A	7	p.Gly357Asp	<i>RHD*1070A</i>	
DNB	RHD*25 RHD*DNB	c.1063G>A	7	p.Gly355Ser	<i>RHD*1063A</i>	
DNU	RHD*26 RHD*DNU	c.1057G>A	7	p.Gly353Arg	<i>RHD*1057A</i>	

Common category or name Phenotype(s)	Allele name	Nucleotide change	Exon(s)	Amino Acid(s)	Allele Name Detail	Comments Reported as:
DDE	RHD*27 RHD*DDE	c.120T>A	1	p.Asp40Glu	RHD*120A	
DFL	RHD*28 RHD*DFL	c.494A>G	4	p.Tyr165Cys	RHD*494G	
DYU (DQC)	RHD*29 RHD*DYU	c.700A>T	5	p.Arg234Trp	RHD*700T	
DTO	RHD*30 RHD*DTO	c.667T>G; c.674C>T	5	p.Phe223Val; p.Ser225Phe	RHD*667G,674T	
DVL1	RHD*31 RHD*DVL1	c.684_686 del GAG	5	p.Arg229del	RHD*684_686delGAG	
DVL2	RHD*32 RHD*DVL2	c.705_707 del GAA	5	p.Lys235del	RHD*705_707delGAA	
DWI (DWLLE)	RHD*33 RHD*DWI	c.1073T>C	7	p.Met358Thr	RHD*1073C	
DIM (DlleM)	RHD*34 RHD*DIM	c.854G>A	6	p.Cys285Tyr	RHD*854A	
DMA	RHD*35 RHD*DMA	c.621G>C	4	p.Leu207Phe	RHD*621C	
DLO	RHD*36 RHD*DLO	c.851C>T	6	p.Ser284Leu	RHD*851T	
DUC2	RHD*37 RHD*DUC2	c.733G>C	5	p.Val245Leu	RHD*733C	
DNT	RHD*38 RHD*DNT	c.455A>C	3	p.Asn152Thr	RHD*455C	
RHD(S103P) RH:—12 (G—)	RHD*39	c.307T>C	2	p.Ser103Pro	RHD*307C	
D-SPM	RHD*40 RHD*D-SPM	c.186G>T; c.410C>T; c.455A>C; c.509T>C; c.667T>G	2,3,4,5	p.Leu62Phe; p.Ala137Val; p.Asn152Thr; p.Met170Thr; p.Phe223Val	RHD*186T,410T,455C ,509C,667G	

DBU	RHD*41 RHD*DBU	c.667T>G; c.676G>C; c.697G>C; c.712G>A; c.733G>C; c.744C>T; c.787G>A; c.800A>T; c.916G>A; c.932A>G; c.941G>T; c.968C>A; c.974G>T; c.979A>G; c.985G>C; c.986G>A; c.989A>C; c.992A>T; c.1025T>C c.1048G>C c.1053C>T c.1057G>T; c.1059A>G; c.1060G>A; c.1061C>A	5,6,7	p.Phe223Val; p.Ala226Pro; p.Glu233Gln; p.Val238Met; p.Val245Leu; silent; p.Gly263Arg; p.Lys267Met; p.Val306Ile; p.Tyr311Cys; p.Gly314Val; p.Pro323His; p.Ser325Ile; p.Ile327Val; p.Gly329His; p.Gly329His; p.Tyr330Ser; p.Asn331Ile; p.Ile342Thr; p.Asp350His; silent; p.Gly353Trp; p.gly353Trp; p.Ala354Asn; p.Ala354Asn		
DCC	RHD*42 RHD*DCC	c.677 C>A	5	p.Ala226Asp	RHD*677A	
DDN	RHD*43 RHD*DDN	c.490G>A	4	p.Asp164Asn	RHD*490A	
DHQ	RHD*44 RHD*DHQ	c.513C>A	4	p.His171Gln	RHD*513A	
DKK	RHD*45 RHD*DKK	c.150T>C; c.178A>C; c.201G>A; c.203G>A; c.307T>C; c.361T>A; c.380T>C; c.383A>G; c.455A>C	2,3	silent; p.Ile60Leu; silent; p.Ser68Asn; p.Ser103Pro; p.Leu121Met; p.Val127Ala; p.Asp128Gly; p.Asn152Thr	RHD*D-CE(2-3)-D	

Common category or name Phenotype(s)	Allele name	Nucleotide change	Exon(s)	Amino Acid(s)	Allele Name Detail	Comments Reported as:
DLX	RHD*46 RHD*DLX	c.667T>G; c.712G>A; c.733G>C; c.744C>T; c.787G>A; c.800A>T; c.916G>A; c.932A>G	5,6	p.Phe223Val; p.Val238Met; p.Val245Leu; silent; p.Gly263Arg; p.Lys267Met; p.Val306Ile; p.Tyr311Cys	RHD*D(F223V)-CE(5:712-6)-D	
DMI	RHD*47 RHD* DMI	c.510G>A	4	p.Met170Ile	RHD*510A	
DMI-1.1	RHD*47.01 RHD*DMI-1.1	c.510G>T	4	p.Met170Ile	RHD*510T	
DNS	RHD*48 RHD*DNS	c.485A>G	3	p.Asn162Ser	RHD*485G	
DWN	RHD*49 RHD*DWN	c.1053C>T; c.1057G>G; c.1059A>G; c.1060G>A; c.1061C>A	7	silent; p.Gly353Trp; p.Gly353Trp; p.Ala354Asn; p.Ala354Asn	RHD*1053T, 1057G, 1059G, 1060A, 1061A	
RHD(A354T)	RHD*50	c.1060G>A	7	p.Ala354Thr	RHD*1060A	
RHD(del44L)	RHD*51	c.130_132 delCTC	1	p.Leu44del	RHD*130_132 delCTC	
RHD(F223S)	RHD*52	c.668T>C	5	p.Phe223Ser	RHD*668C	
RHD(IVS2-2delA)	RHD*53	c.336-2delA	Intron 2	Splice site change	RHD*336-2delA	
RHD(IVS4-2A>C)	RHD*54	c.635-2A>C	Intron 4	Splice site change	RHD*635-2A>C	
RHD(L81P)	RHD*55	c.242T>C	2	p.Leu81Pro	RHD*242C	
DBA	RHD*56 RHD*DBA	c.680T>C	5	p.Leu227Pro	RHD*680C	
weak partial type 57	RHD*57 RHD*weak partial 57	c.640C>T	5	p.Leu214Phe	RHD*640T	

RHD*D-CE(7)-D	RHD*58	c.941G>T; c.968C>A; c.974G>T; c.979A>G; c.985G>C; c.986G>A; c.989A>C; c.992A>T; c.1025T>C; c.1048G>C; c.1053C>T; c.1057G>T; c.1059A>G; c.1060G>A; c.1061C>A	7	p.Gly314Val; p.Pro323His; p.Ser325Ile; p.Ile327Val; p.Gly329His; p.Gly329His; p.Tyr330Ser; p.Asn331Ile; p.Ile342Thr; p.Asp350His; silent; p.Gly353Trp; p.Gly353Trp; p.Ala354Asn; p.Ala354Asn	RHD*D-CE(7)-D	
RHD(F175L)	RHD*59	c.525C>T	4	p.Phe175Leu	RHD*525T	
weak Partial D	RHD*60	c.178A>C; c.689G>T	2,5	p.Ile60Leu; p.Ser230Ile	RHD*178C, 689T	
weak Partial D	RHD*61	c.492C>A	4	p.Asp164Glu	RHD*492A	
DNT(V270G)	RHD*62	c.455A>C; c.809T>G	3,6	p.Asn152Thr; p.Val270Gly	RHD*455C, 809G	

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Τα weak D and Del αλληλόμορφα σύμφωνα με ISBT (v5.0 180207)

Phenotype	Allele name	Nucleotide Change(s)	Exon	AminoAcid change(s)	Allele Name Detail	Comments
Type 1	RHD*01W.1 RHD*weak D type 1	c.809T>G	6	p.Val270Gly	RHD*809G	
Type 1.1	RHD*01W.1.1 RHD*weak D type 1.1	c.52C>G; c.809T>G	1, 6	p.Leu18Val; p.Val270Gly	RHD*52G, 809G	
Type1.2	RHD*01W.1.2 RHD*weak D type 1.2	c.712G>A; c.809T>G	5,6	p.Val238Met; p.Val270Gly	RHD*712A, 809G	
Type 2	RHD*01W.2 RHD*weak D type 2	c.1154G>C	9	p.Gly385Ala	RHD*1154C	Splice site change also
Type 2.1	RHD*01W.2.1 RHD*weak D type 2.1	c.301T>A; c.1154G>C	2 9	p.Phe101Ile; p.Gly385Ala	RHD*301T, 1154C	
Type2.2	RHD*01W.2.2 RHD*weak D type 2.2	c.916G>A; c.932A>G; c.1154G>C	6,9	p.Val306Ile; p.Tyr311Cys; p.Gly385Ala	RHD*916A, 932G, 1154C	
Type 3	RHD*01W.3 RHD*weak D type 3	c.8C>G	1	p.Ser3Cys	RHD*8G	
Type3.1	RHD*01W.3.1 RHD*weak D type 3.1	c.8C>G; c.178A>C	1,2	p.Ser3Cys; p.Ile60Leu	RHD*8G, 178C	
Type 4.0, 4.1, 4.2, 4.2.2 weak partial	*See partial DAR RHD*09.03, 04, 05 RHD*weak partial 4					
Type 5	RHD*01W.5 RHD*weak D type 5	c.446C>A	3	p.Ala149Asp	RHD*446A	
Type 6	RHD*01W.6 RHD*weak D type 6	c.29G>A	1	p.Arg10Gln	RHD*29A	
Type 7	RHD*01W.7 RHD*weak D type 7	c.1016G>A	7	p.Gly339Glu	RHD*1016A	
Type 8	RHD*01W.8 RHD*weak D type 8	c.919G>A	6	p.Gly307Arg	RHD*919A	
Type 9	RHD*01W.9 RHD*weak D type 9	c.880G>C	6	p.Ala294Pro	RHD*880C	
Type 10	RHD*01W.10 RHD*weak D type 10	c.1177T>C	9	p.Trp393Arg	RHD*1177C	
Type 10.1	RHD*01W.10.1 RHD*weak D type 10.1	c.1145T>C; c.1177T>C	8 9	p.Leu382Pro; p.Trp393Arg	RHD*1145C, 1177C,	
Type 10.2	RHD*01W.10.2 RHD*weak D type 10.2	c.1177T>C; c.1199A>C	9	p.Trp393Arg; p.Lys400Thr	RHD*1177C, 1199C	
Type 11 weak partial or Del phenotype	See partial RHD*11	c.885G>T	6	p.Met295Ile	RHD*885T	allo-anti-D reported Del phenotype when with Ce
Type 12	RHD*01W.12 RHD*weak D type 12	c.830G>A	6	p.Gly277Glu	RHD*830A	
Type 13	RHD*01W.13 RHD*weak D type 13	c.826G>C	6	p.Ala276Pro	RHD*826C	
Type 14	RHD*01W.14 RHD*weak D type 14	c.544T>A; c.594A>T; c.602C>G	4	p.Ser182Thr; p.Lys198Asn; p.Thr201Arg	RHD*544A, 594T, 602G	
Type 15 weak partial phenotype	See partial RHD*15					allo-anti-D reported
Type 16	RHD*01W.16 RHD*weak D type 16	c.658T>C	5	p.Trp220Arg	RHD*658C	
Type 17	RHD*01W.17 RHD*weak D type 17	c.340C>T	3	p.Arg114Trp	RHD*340T	

Phenotype	Allele name	Nucleotide Change(s)	Exon	AminoAcid change(s)	Allele Name Detail	Comments
Type 18	RHD*01W.18 RHD*weak D type 18	c.19C>T	1	p.Arg7Trp	RHD*19T	
Type 19	RHD*01W.19 RHD*weak D type 19	c.611T>C	4	p.Ile204Thr	RHD*611C	
Type 20	RHD*01W.20 RHD*weak D type 20	c.1250T>C	10	p.Phe417Ser	RHD*1250C	
Type 21	See partial RHD*21					allo-anti-D reported
Type 22	RHD*01W.22 RHD*weak D type 22	c.1224G>C	9	p.Trp408Cys	RHD*1224C	
Type 23	RHD*01W.23 RHD*weak D type 23	c.634G>T	4	p.Gly212Cys	RHD*634T	
Type 24	RHD*01W.24 RHD*weak D type 24	c.1013T>C	7	p.Leu338Pro	RHD*1013C	
Type 25	RHD*01W.25 RHD*weak D type 25	c.341G>A	3	p.Arg114Gln	RHD*341A	
Type 26	RHD*01W.26 RHD*weak D type 26	c.26T>A	1	p.Val9Asp	RHD*26A	
Type 27	RHD*01W.27 RHD*weak D type 27	c.661C>T	5	p.Pro221Ser	RHD*661T	
Type 28	RHD*01W.28 RHD*weak D type 28	c.1152A>C	8	p.Thr384Thr	RHD*1152C	Splice site change only
Type 29	RHD*01W.29 RHD*weak D type 29	c.178A>C; c.201G>A; c.203G>A; c.594A>T; c.667T>G; c.744C>T; c.957G>A; c.1025T>C	2, 4, 5, 7	p.Ile60Leu; silent; p.Ser68Asn; p.Lys198Asn; p.Phe223Val; silent; silent; p.Ile342Thr	RHD*178C, 201A, 203A, 594T, 667G, 744T, 957A, 1025C	
Type 30	RHD*01W.30 RHD*weak D type 30	c.1018_1019 delinsAT	7	p.Glu340Met	RHD*1018_1019 delinsAT	
Type 31	RHD*01W.31 RHD*weak D type 31	c.17C>T	1	p.Pro6Leu	RHD*17T	
Type 32	RHD*01W.32 RHD*weak D type 32	c.1121T>A	8	p.Ile374Asn	RHD*1121A	
Type 33	RHD*01W.33 RHD*weak D type 33	c.520G>A	4	p.Val174Met	RHD*520A	
Type 34	RHD*01W.34 RHD*weak D type 34	c.809T>A	6	p.Val270Glu	RHD*809A	
Type 35	RHD*01W.35 RHD*weak D type 35	c.260G>A	2	p.Gly87Asp	RHD*260A	
Type 36	RHD*01W.36 RHD*weak D type 36	c.842T>G	6	p.Val281Gly	RHD*842G	
Type 37	RHD*01W.37 RHD*weak D type 37	c.399G>T	3	p.Lys133Asn	RHD*399T	
Type 38	RHD*01W.38 RHD*weak D type 38	c.833G>A	6	p.Gly278Asp	RHD*833A	
Type 39	RHD*01W.39 RHD*weak D type 39	c.1015G>A	7	p.Gly339Arg	RHD*1015A	
Type 40	RHD*01W.40 RHD*weak D type 40	c.602C>G	4	p.Thr201Arg	RHD*602G	
Type 41	RHD*01W.41 RHD*weak D type 41	c.1193A>T	9	p.Glu398Val	RHD*1193T	

Phenotype	Allele name	Nucleotide Change(s)	Exon	AminoAcid change(s)	Allele Name Detail	Comments
Type 41.0.1	RHD*01W.41.0.1 RHD*weak D type 41.0.1	c.1170T>C; c.1193A>T	9	p.Leu390Leu; p.Glu398Val	RHD*1170C, 1193T	
Type 42	RHD*01W.42 RHD*weak D type 42	c.1226A>T	9	p.Lys409Met	RHD*1226T	
Type 43	RHD*01W.43 RHD*weak D type 43	c.605 C > T	4	p.Ala202Val	RHD*605T	
Type 44	RHD*01W.44 RHD*weak D type 44	c.728A>G	5	p.Tyr243Cys	RHD*728G	
Type 45	RHD*01W.45 RHD*weak D type 45	c.1195G>A	9	p.Ala399Thr	RHD*1195A	
Type45.1	RHD*01W.45.1 RHD*weak D type 45.1	c.818C>T; c.1195G>A	6, 9	p.Ala273Val; p.Ala399Thr	RHD*818T, 1195A	
Type45.2	RHD*01W.45.2 RHD*weak D type 45.2	c.208C>T; c.818C>T; c.1195G>A	2,6,9	p.Arg70Trp; p.Ala273Val; p.Ala399Thr	RHD*208T, 818T,1195A	
Type 46	RHD*01W.46 RHD*weak D type 46	c.1221C>A	9	p.Phe407Leu	RHD*1221A	
Type 47	RHD*01W.47 RHD*weak D type 47	c.340C>G	3	p.Arg114Gly	RHD*340G	
Type 48	RHD*01W.48 RHD*weak D type 48	c.182G>T	2	p.Gly61Val	RHD*182T	
Type 49	RHD*01W.49 RHD*weak D type 49	c.770C>T	5	p.Ser257Phe	RHD*770T	
Type 50	RHD*01W.50 RHD*weak D type 50	c.727T>A	5	p.Tyr243Asn	RHD*727A	
Type 51	RHD*01W.51 RHD*weak D type 51	c.594A>T; c.602C>G	4	p.Lys198Asn; p.Thr201Arg	RHD*594T, 602G	
Type 52	RHD*01W.52 RHD*weak D type 52	c.92T>C	1	p.Phe31Ser	RHD*92C	
Type 53	RHD*01W.53 RHD*weak D type 53	c.740T>G	5	p.Val247Gly	RHD*740G	
Type 54	RHD*01W.54 RHD*weak D type 54	c.365C>T	3	p.Ser122Leu	RHD*365T	
Type 55	RHD*01W.55 RHD*weak D type 55	c.895C>G	6	p.Leu299Val	RHD*895G	
Type 56	RHD*01W.56 RHD*weak D type 56	c.65C>A	1	p.Ala22Glu	RHD*65A	
Type 57	RHD*01W.57 RHD*weak D type 57	c.640C>T	5	p.Leu214Phe	RHD*640T	
Type 58	RHD*01W.58 RHD*weak D type 58	c.1006G>C	7	p.Gly336Arg	RHD*1006C	
Type 59	RHD*01W.59 RHD*weak D type 59	c.1148T>C	8	p.Leu383Pro	RHD*1148C	
Type 60	RHD*01W.60 RHD*weak D type 60	c.1219_1224 delTTCTGG	9	p.Phe407_Trp4 08del	RHD* 1219_1224 del	
Type 61	RHD*01W.61 RHD*weak D type 61	c.28C>T	1	p.Arg10Trp	RHD*28T	
Type 62	RHD*01W.62 RHD*weak D type 62	c.661C>A	5	p.Pro221Thr	RHD*661A	
Type 63	RHD*01W.63 RHD*weak D type 63	c.758T>A	5	p.Ile253Asn	RHD*758A	
Type 64	RHD*01W.64 RHD*weak D type 64	c.881C>T	6	p.Ala294Val	RHD*881T	
Type 65	RHD*01W.65 RHD*weak D type 65	c.68C>A	1	p.Ala23Asp	RHD*68A	

Phenotype	Allele name	Nucleotide Change(s)	Exon	AminoAcid change(s)	Allele Name Detail	Comments
Type 66	RHD*01W.66 RHD*weak D type 66	c.916G>A	6	p.Val306Ile	RHD*916A	
Type 67	RHD*01W.67 RHD*weak D type 67	c.722C>T	5	p.Thr241Ile	RHD*722T	
Type 68	RHD*01W.68 RHD*weak D type 68	c.165C>T; c.1213C>G	2, 9	silent; p.Gln405Glu	RHD*165T, 1213G	
Type 69	RHD*01W.69 RHD*weak D type 69	c.953G>A	7	p.Arg318Gln	RHD*953A	
Type 70	RHD*01W.70 RHD*weak D type 70	c.1012C>G	7	p.Leu338Val	RHD*1012G	
Type 71	RHD*01W.71 RHD*weak D type 71	c.29G>C	1	p.Arg10Pro	RHD*29C	
Type 72	RHD*01W.72 RHD*weak D type 72	c.1212C>A	9	p.Asp404Glu	RHD*1212A	
Type 73	RHD* 01W.73 RHD*weak D type 73	c.1241C>T	10	p.Ala414Val	RHD*1241T	
Type 74	RHD* 01W.74 RHD*weak D type 74	c.203G>C	2	p.Ser68Thr	RHD*203C	
Type 75	RHD* 01W.75 RHD*weak D type 75	c.1194G>C	9	p.Glu398Asp	RHD*1194C	
Type 76	RHD* 01W.76 RHD*weak D type 76	c.1215A>C	9	p.Gln405His	RHD*1215C	
Type 77	RHD* 01W.77 RHD*weak D type 77	c.766T>C	5	p.Ser256Pro	RHD*766C	
Type 78	RHD* 01W.78 RHD*weak D type 78	c.1228T>G	10	p.Phe410Val	RHD*1228G	
Type 79	RHD* 01W.79 RHD*weak D type 79	c.560T>C	4	p.Leu187Pro	RHD*560C	
Type 80	RHD* 01W.80 RHD*weak D type 80	c.539G>A	4	p.Gly180Glu	RHD*539A	
Type 81	RHD* 01W.81 RHD*weak D type 81	c.1199A>C	9	p.Lys400Thr	RHD*1199C	
Type 82	RHD* 01W.82 RHD*weak D type 82	c.1184C>T	9	p.Ala395Val	RHD*1184T	
Type 83	RHD* 01W.83 RHD*weak D type 83	c.1238T>G	10	p.Leu413Trp	RHD*1238G	
Type 84	RHD* 01W.84 RHD*weak D type 84	c.227G>A	2	p.Ser76Asn	RHD*227A	
Type 85	RHD* 01W.85 RHD*weak D type 85	c.209G>A	2	p.Arg70Gln	RHD*209A	
Type 86	RHD* 01W.86 RHD*weak D type 86	c.1034T>A	7	p.Val345Glu	RHD*1034A	
Type 87	RHD* 01W.87 RHD*weak D type 87	c.374T>A	3	p.Ile125Asn	RHD*374A	
Type 88	RHD* 01W.88 RHD*weak D type 88	c.182G>C	2	p.Gly61Ala	RHD*182C	
Type 89	RHD* 01W.89 RHD*weak D type 89	c.67G>C	1	p.Ala23Pro	RHD*67C	
Type 90	RHD* 01W.90 RHD*weak D type 90	c.993C>G	7	p.Asn331Lys	RHD*993G	
Type 91	RHD* 01W.91 RHD*weak D type 91	c.1187C>G	9	p.Pro396Arg	RHD*1187G	

Phenotype	Allele name	Nucleotide Change(s)	Exon	AminoAcid change(s)	Allele Name Detail	Comments
Type 92	RHD* 01W.92 RHD*weak D type 92	c.1145T>C	8	p.Leu382Pro	RHD*1145C	
Type 93	RHD* 01W.93 RHD*weak D type 93	c.359C>A	3	p.Ala120Asp	RHD*359A	
Type 94	RHD* 01W.94 RHD*weak D type 94	c.884T>C	6	p.Met295Thr	RHD*884C	
Type 95	RHD* 01W.95 RHD*weak D type 95	c.730G>C	5	p.Ala244Pro	RHD*730C	
Type 96	RHD* 01W.96 RHD*weak D type 96	c.731C>T	5	p.Ala244Val	RHD*731T	
Type 97	RHD* 01W.97 RHD*weak D type 97	c.542T>C	4	p.Leu181Pro	RHD*542C	
Type 98	RHD* 01W.98 RHD*weak D type 98	c.751A>C	5	p.Thr251Pro	RHD*751C	
Type 99	RHD* 01W.99 RHD*weak D type 99	c.1107A>C	8	p.Glu369Asp	RHD*1107C	
Type 100	RHD* 01W.100 RHD*weak D type 100	c.787G>A	5	p.Glu263Arg	RHD*787A	
Type 101	RHD* 01W.101 RHD*weak D type 101	c.62A>C	1	p.Glu21Ala	RHD*62C	
Type 102	RHD* 01W.102 RHD*weak D type 102	c.73A>T	1	p.Ile25Phe	RHD*73T	
Type 103	RHD* 01W.103 RHD*weak D type 103	c.91T>A	1	p.Phe31Ile	RHD*91A	
Type 104	RHD* 01W.104 RHD*weak D type 104	c.157G>T	2	p.Asp53Tyr	RHD*157T	
Type 105	RHD* 01W.105 RHD*weak D type 105	c.200C>G	2	p.Ser67Trp	RHD*200G	
Type 106	RHD* 01W.106 RHD*weak D type 106	c.220T>G	2	p.Trp74Gly	RHD*220G	
Type 107	RHD* 01W.107 RHD*weak D type 107	c.223A>T	2	p.Ser75Cys	RHD*223G	
Type 108	RHD* 01W.108 RHD*weak D type 108	c.287G>A	2	p.Gly96Asp	RHD*287A	
Type 109	RHD* 01W.109 RHD*weak D type 109	c.376T>C	3	p.Ser126Pro	RHD*376C	
Type 110	RHD* 01W.110 RHD*weak D type 110	c.413A>G	3	p.Gln138Arg	RHD*413G	
Type 111	RHD* 01W.111 RHD*weak D type 111	c.634G>A	4	p.Gly212Ser	RHD*634A	
Type 112	RHD* 01W.112 RHD*weak D type 112	c.635G>A	5	p.Gly212Asp	RHD*635A	
Type 113	RHD* 01W.113 RHD*weak D type 113	c.874T>C	6	p.Trp292Arg	RHD*874C	
Type 114	RHD* 01W.114 RHD*weak D type 114	c.968C>T	7	p.Pro323Leu	RHD*968T	
Type 115	RHD* 01W.115 RHD*weak D type 115	c.983T>A	7	p.Met328Lys	RHD*983A	
Type 116	RHD* 01W.116 RHD*weak D type 116	c.346G>C	3	p.Ala116Pro	RHD*346C	

Phenotype	Allele name	Nucleotide Change(s)	Exon	AminoAcid change(s)	Allele Name Detail	Comments
Type 117	RHD* 01W.117 RHD*weak D type 117	c.346G>A	3	p.Ala116Thr	RHD*346A	
Type 118	RHD* 01W.118 RHD*weak D type 118	c.347C>T	3	p.Ala116Val	RHD*347T	
Type 119	RHD* 01W.119 RHD*weak D type 119	c.818C>T	6	p.Ala273Val	RHD*818T	
Type 120	RHD* 01W.120 RHD*weak D type 120	c.818C>A	6	p.Ala273Glu	RHD*818A	
Type 121	RHD* 01W.121 RHD*weak D type 121	c.176C>A	2	p.Ala59Asp	RHD*176A	
Type 122	RHD* 01W.122 RHD*weak D type 122	c.208C>T	2	p.Arg70Trp	RHD*208T	
Type 123	RHD* 01W.123 RHD*weak D type 123	c.379 G>T	3	p.Val127Leu	RHD*379T	
Type 124	RHD* 01W.124 RHD*weak D type 124	c.594A>T	4	p.Lys198Asn	RHD*594T	
Type 125	RHD* 01W.125 RHD*weak D type 125	c.671A>G	5	p.Asn224Ser	RHD*671G	
Type 126	RHD* 01W.126 RHD*weak D type 126	c.1199A>T	9	p.Lys400Ile	RHD*1199T	
Type 127	RHD* 01W.127 RHD*weak D type 127	c.1200A>T	9	p.Lys400Asn	RHD*1200T	
Type 128	RHD* 01W.128 RHD*weak D type 128	c.1207G>T	9	p.Asp403Tyr	RHD*1207T	
Type 129	RHD* 01W.129 RHD*weak D type 129	c.1208A>T	9	p.Asp403Val	RHD*1208T	
Type 130	RHD* 01W.130 RHD*weak D type 130	c.163A>C	2	p.Thr55Pro	RHD*163A	
Type 131	RHD* 01W.131 RHD*weak D type 131	c.254C>G	2	p.Ala85Gly	RHD*254G	
Type 132	RHD* 01W.132 RHD*weak D type 132	c.394G>A	3	p.Gly132Arg	RHD*394A	
Type 133	RHD* 01W.133 RHD*weak D type 133	c.395G>A	3	p.Gly132Glu	RHD*395A	
Type 134	RHD* 01W.134 RHD*weak D type 134	c.1168C>G	9	p.Leu390Val	RHD*1168G	
Type 135	RHD* 01W.135 RHD*weak D type 135	c.884T>A	6	p.Met295Lys	RHD*884A	
Type 136	RHD* 01W.136 RHD*weak D type 136	c.41C>T	1	p.Pro14Leu	RHD*41T	
Type 137	RHD* 01W.137 RHD*weak D type 137	c.780C>A	5	p.His260Gln	RHD*780A	
Type 138	RHD* 01W.138 RHD*weak D type 138	c.871C>T	6	p.Pro291Ser	RHD*871T	
Type 139	RHD* 01W.139 RHD*weak D type 139	c.1169T>C	9	p.Leu390Pro	RHD*1169C	
Type 140	RHD* 01W.140 RHD*weak D type 140	c.1229T>C	10	p.Phe410Ser	RHD*1229C	
Type 141	RHD* 01W.141 RHD*weak D type 141	c.668T>C	5	p.Phe223Ser	RHD*668C	

Phenotype	Allele name	Nucleotide Change(s)	Exon	AminoAcid change(s)	Allele Name Detail	Comments
Type 142	RHD*01W.142 RHD*weak D type 142	c.67G>T	1	p.Ala23Ser	RHD*67T	
Type 143	RHD*01W.143 RHD*weak D type 143	c.173C>T	2	p.Ala58Val	RHD*173T	
Type 144	RHD*01W.144 RHD*weak D type 144	c.579G>C	4	p.Glu193Asp	RHD*579C	
Type 145	RHD*01W.145 RHD*weak D type 145	c.41 C>G	1	p. Pro14Arg	RHD*41G	
Del defined as weak D expression primarily detectable only by adsorption and elution						
Del	RHD*01EL.01 RHD*DEL1	c.1227G>A	9	p.Lys409Lys	RHD*1227A	Splice site affected
Del	RHD*01EL.02 RHD*DEL2	c.3G>A	1	p.Met1Ile	RHD*3A	
Del	RHD*01EL.03 RHD*DEL3	c.53T>C	1	p.Leu18Pro	RHD*53C	
Del	RHD*01EL.04 RHD*DEL4	c.147delA	1	p.Val50Leufs*5	RHD*147delA	
Del	RHD*01EL.05 RHD*DEL5	c.148+1G>A	Intron 1	Splice site mutation	RHD*148+1A	
Del or weak D	RHD*01EL.06 RHD*DEL6	c.251T>C	2	p.Leu84Pro	RHD*251C	
Del or weak D	RHD*01EL.07 RHD*DEL7	c.410C>A	3	p.Ala137Glu	RHD*410A	
Del	RHD*01EL.08 RHD*DEL8	c.486+1G>A	Intron 3	Splice site mutation	RHD*486+1A	
Del or D negative	RHD*01EL.09 RHD*DEL9	c.486+2T>A	Intron 3	Splice site mutation	RHD*486+2A	
Del	RHD*01EL.10 RHD*DEL10	c.1222T>C	9	p.Trp408Arg	RHD*1222C	
Del	RHD*01EL.11 RHD*DEL11	c.1252_1253 insT	10	p.*418Leuext*70	RHD*1252_1253insT	
Del	RHD*01EL.12 RHD*DEL12	c.458T>C	3	p.Leu153Pro	RHD*458C	
Del or D negative	RHD*01EL.13 RHD*DEL13	c.785delA	5	p.Lys264Argfs*24	RHD*785delA	
Del	RHD*01EL.14 RHD*DEL14	c.634+5G>T	Intron 4	Splice site mutation	RHD*634+5T	G>A associated with weak D
Del or D negative	RHD*01EL.15 RHD*DEL15	c.922G>T	6	p.Gly308Ter	RHD*922T	
Del	RHD*01EL.16 RHD*DEL16	c.634G>C	4	p.Gly212Arg	RHD*634C	212Cys reported as weak D; 212Val as D neg
Del	RHD*01EL.17 RHD*DEL17	c.1203T>A	9	p.Tyr401*	RHD*1203A	
Del	RHD*01EL.18 RHD*DEL18	c.93_94insT	1	p.Thr32Tyrf*4	RHD*93_94insT	
Del	RHD*01EL.19 RHD*DEL19	c.635-2A>G	Intron 4	Splice site mutation	RHD*635-2G	
Del	RHD*01EL.20 RHD*DEL20	c.1154-8T>A	Intron 8	Splice site mutation	RHD*1154-8A	

Phenotype	Allele name	Nucleotide Change(s)	Exon	AminoAcid change(s)	Allele Name Detail	Comments
Del	RHD*01EL.21 RHD*DEL21	c.148+5G>C	Intron 1	Splice site mutation	RHD*148+5C	Hyland
Del	RHD*01EL.22 RHD*DEL22	c.336-2delA	Intron 2	Splice site mutation	RHD*336-2delA	Hyland
Del Partial D	RHD*01EL.23 RHD*DEL23	RHD-CE(5-7)-D	5 6 7	Hybrid allele	RHD*-CE(5-7)-D	DBU
Del	RHD*01EL.24 RHD*DEL24	c.838G>A	6	p.Ala280Thr	RHD*838A	
Del	RHD*01EL.25 RHD*DEL25	c.1252T>A	10	p.Ter418Lysext*?	RHD*1252A	
Del	RHD*01EL.26 RHD*DEL26	c.1248_1249 insG	10	p.Phe417Valfs*?	RHD*1248_1249insG	
Del	RHD*01EL.28 RHD*DEL28	c.993delC	7	p.Phe332Serfs*27	RHD*993delC	
Del	RHD*01EL.29 RHD*DEL29	c.1210G>C	9	p.Asp404His	RHD*1210C	
Del	RHD*01EL.30 RHD*DEL30	c.1074-100_1153+?del	Intron 7 8 Intron 8	Large Deletion	RHD* Ex8del	
Del	RHD*01EL.31 RHD*DEL31	c.148+1G>T	1	Splice site mutation	RHD*148+1T	
Del	RHD*01EL.32 RHD*DEL32	c.149-29G>C	Intron 1	Intron polymorphism	RHD*149-29C	
Del	RHD*01EL.33 RHD*DEL33	c.336-2A>G	2	Splice site mutation	RHD*336-2G	
Del	RHD*01EL.35 RHD*DEL35	c.802-38_35del	5	Intron polymorphism	RHD*802-38_35del	frequently observed in normal D phenotypes-obsolete
Del	RHD*01EL.36 RHD*DEL36	c.1227G>A c.1073+152C>A	9 Intron 7	Splice site mutation	RHD*(1227A, 1073+152A)	
Del	RHD*01EL.37 RHD*DEL37	c.1154-31C>T	8	Intron polymorphism	RHD*1154-31T	
Del	RHD*01EL.38 RHD*DEL38	c.1010T>G	7	p.Leu337Arg	RHD*1010G	
Del	RHD*01EL.39 RHD*DEL39	c.113T>A	1	p.Leu38*	RHD*113A	
Del	RHD*01EL.40 RHD*DEL40	c.278T>G	2	p.Leu93Arg	RHD*278G	
Del	RHD*01EL.41 RHD*DEL41	c.872C>G	6	p.Pro291Arg	RHD*872G	
Del	RHD*01EL.42 RHD*DEL42	c.335G>C; c.149-29G>C	2 Intron 1	p.Ser112Thr	RHD*(335G>C 149-29C)	
Del	RHD*01EL.43 RHD*DEL43	c.46T>C	1	p.Trp16Arg	RHD*46C	
Del	RHD*01EL.44 RHD*DEL44	RHD-CE(4-9)-D	4 - 9	Hybrid allele	RHD*-CE(4-9)-D	
Del	RHD*01EL.45 RHD*DEL45	c.721A>C	5	p.Thr241Pro	RHD*721C	
Del	RHD*01EL.46 RHD*DEL46	c.884T>C	6	p.Met295Thr	RHD*884C	

3. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Η κλινική σημαντικότητα του συστήματος Rhesus οφείλεται στο γεγονός ότι τα αντισώματα έναντι του Rhesus εμπλέκονται στην ανοσο-επαγόμενη καταστροφή των RBCs μετά από μετάγγιση με Rhesus ασύμβατο αίμα ή στην αιμολυτική νόσο του νεογνού. Το αντιγόνο D παρουσιάζει υψηλή ανοσογονικότητα. Ο προσδιορισμός του φαινότυπου RhD σε όλους τους αιμοδότες και στους προς μετάγγιση ασθενείς έχει ως στόχο οι D(-) ασθενείς να λαμβάνουν D(-) αίμα, γεγονός το οποίο έχει μειώσει στο ελάχιστο τις επιπλοκές λόγω ασυμβατότητας κατά τη μετάγγιση. Αντιθέτως, παρόλη τη χρήση θεραπείας ανοσοκαταστολής με anti-D ανοσοσφαιρίνη, εξακολουθεί να παρατηρείται anti-D αλλοανοσοποίηση στην εγκυμοσύνη.

3.1 Αλλοαντισώματα

Τα αλλοαντισώματα, τα οποία αναγνωρίζουν τα Rh αντιγόνα συνήθως ανήκουν στην IgG τάξη των ανοσοσφαιρινών, ανιχνεύονται με έμμεση Coombs (Indirect Antiglobulin Test – IAT) και μπορεί να προκαλέσουν καταστροφή των μεταγγισθέντων καθώς και των εμβρυϊκών RBCs στην αιμολυτική νόσο του νεογνού. Άτομα με τον σπάνιο φαινότυπο Rhnull, ο οποίος οφείλεται στη μη έκφραση όλων των αντιγόνων Rhesus αναπτύσσουν άμεσα αλλοαντισώματα.

Η κλινική σημασία του έγκειται στο γεγονός ότι οι ασθενείς, οι οποίοι έχουν το σύνδρομο Rhnull, εμφανίζουν στοματοκύτταρα, σφαιροκύττωση, μη φυσιολογική οργάνωση των φωσφολιπιδίων της πλασματικής μεμβράνης τους, αυξημένη οσμωτική ευθραυστότητα, διαταραχή στην ανταλλαγή κατιόντων, αυξημένη ενεργότητα της Na^+/K^+ ATPase και διαταραγμένο κυτταρικό όγκο. Τα άτομα αυτά παρουσιάζουν χρόνια αιμολυτική αναιμία ποικίλης βαρύτητας και αναπτύσσουν αλλοαντισώματα όταν λάβουν αίμα Rh(+), τα οποία αντιδρούν με όλα τα αντιγόνα του Rhesus. Οι άνθρωποι με Rhnull φαινότυπο μπορεί να αναπτύξουν anti-Rh29 (ένα αντίσωμα έναντι ολόκληρου του

συστήματος Rhesus), anti-Rh17 (ένα αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης RhCc/Ee), anti-D, anti-C, ή ένα συνδυασμό αυτών. Η μετάγγιση τέτοιων ασθενών απαιτεί αίμα του ίδιου φαινοτύπου, ο οποίος εκτός του ότι είναι σπάνιος, τα άτομα που τον έχουν συνήθως δεν πληρούν τις προϋποθέσεις της δωρέας αίματος καθότι έχουν αιμολυτική αναιμία σε κάποιο βαθμό.²⁵

3.2 Αυτοαντισώματα

Τα αυτοαντισώματα αντιδρούν με αντιγόνα τα οποία βρίσκονται στα RBCs του ασθενούς που τα παράγει. Το 80% των ασθενών με αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (Α.Α.Α.) θερμού τύπου έχει στον ορό του αυτοαντισώματα, τα οποία λειτουργούν βέλτιστα στους 37°C.²⁶ Αν και τα περισσότερα δεν έχουν ειδικότητα, υπάρχουν και αρκετά ειδικά, κυρίως anti-e. Τα αυτοαντισώματα συνήθως αντιδρούν ασθενέστερα με RhD(-) παρά με RhD(+) RBCs, χωρίς να σημαίνει ότι τα RhD(-) επιβιώνουν περισσότερο in vivo.³ Αυτοαντισώματα έχουν ταυτοποιηθεί και σε ασθενείς με παραλλαγές του RHD, όπως σε weak D type 1³⁷, weak D type 2³⁷ και weak D type 4.0³⁸.

- Αντιδράσεις μετά μετάγγιση οφειλόμενες σε αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα

Προκαλούνται από αλλοανοσοποίηση και μπορεί να συμβούν όταν η ομάδα αίματος του δότη είναι ασύμβατη με αυτήν του λήπτη. Τα αντισώματα αυτά οφωνοποιούν τα μεταγγισθέντα RBCs με συνέπεια την εξωαγγειακή τους αιμόλυση στο σπλήνα. Ήπιες αντιδράσεις όπως ρίγη, πυρετός και αναιμία οφείλονται στη μικρή διάρκεια ζωής των μεταγγισθέντων RBCs και η διάρρηξή τους αυξάνει τη χολερυθρίνη και την γαλακτική αφυδρογονάση (LDH). Μείζονες αντιδράσεις μετά τη μετάγγιση όπως υπόταση, αναφυλακτικό σοκ, διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη (Δ.Ε.Π.) και νεφρική ανεπάρκεια μπορούν να οδηγήσουν σε θάνατο.

Το συχνότερο πρόβλημα σχετικά με την αλλοανοσοποίηση είναι όταν το αλλοαντίσωμα σε έναν ασθενή υπάρχει σε τόσο χαμηλό τίτλο ώστε να μην ανιχνεύεται στο screening ή στη διασταύρωση. Ο λήπτης λίγα 24ωρα μετά τη

μετάγγιση θα εμφανίσει απότομη πτώση της αιμοσφαιρίνης του (Hb) και αύξηση της χολερυθρίνης και της (LDH) λόγω αύξησης του τίτλου των αντισωμάτων (καθυστερημένη αιμολυτική αντίδραση μετάγγισης).

Το 80% RhD-αρνητικών ασθενών που θα λάβουν 200 mL RhD-θετικό αίμα θα αναπτύξουν anti-D αντισώματα μετά από μια τουλάχιστον μετάγγιση.^{3,4} Τα anti-D αντισώματα μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες αντιδράσεις κατά τη μετάγγιση και αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (A.A.A.). Μελέτες^{42,43} ακόμα και σε ασθενείς οι οποίοι μεταγγίσθηκαν με κοινούς ασκούς αιμοπεταλίων κατέγραψαν την παραγωγή anti-D αλλοαντισωμάτων, με δεδομένο ότι αρκεί 0,5-1 mL ερυθροκυττάρων για να διεγείρει τον ανοσολογικό μηχανισμό δημιουργίας τους⁶.

- Αιμολυτική νόσος του νεογνού (Hemolytic Disease of the Newborn – HDN)

Στα νεογνά οι αντιγονικοί επίτοποι του Rhesus είναι πλήρως ανεπτυγμένοι. Η αιμολυτική νόσος προκαλείται ως επί τω πλείστον από μητρικά αντισώματα τα οποία μέσω του πλακούντα κατευθύνονται κατά των εμβρυϊκών ερυθρών και προκαλούν την καταστροφή τους. Στις περισσότερες περιπτώσεις ανήκουν στο σύστημα Rhesus και συχνότερα είναι anti-D. Πριν την έλευση της anti-D προφύλαξης η νόσος εμφανίζονταν σε 1:23 RhD(-) μητέρες.²⁷ Η προφύλαξη γίνεται με τη χρήση βιολογικού σκευάσματος το οποίο περιέχει συμπυκνωμένο αντίσωμα έναντι του RhD αντιγόνου (Rh immune globulin - RhIg) αποτρέποντας την HDN. Η RhIg χορηγείται στη μητέρα κατά τη διάρκεια της κύησης και 72 ώρες μετά τον τοκετό ενός RhD(+) νεογνού, με σκοπό την αποφυγή παραγωγής anti-D αντισωμάτων. Η δράση της γίνεται μέσω καταστροφής των D(+) RBCs του μωρού, τα οποία βρίσκονται στην κυκλοφορία της μητέρας, αλλά ενδεχομένως και με την καταστολή της ανοσολογικής της απάντησης στα “ξένα” αντιγόνα.

Το Rhc είναι το αμέσως σημαντικότερο αντιγόνο Rhesus στην HDN. Ποσοστό 14 έως 21% των νεογνών Rhc(+) τα οποία γεννήθηκαν από μητέρες με anti-c αντισώματα χρειάστηκαν αφαιμαξομεταγγίσεις⁵. Αιμολυτική νόσο του νεογνού μπορεί να προκληθεί επίσης από anti-C, -E, -e και -G αλλά η

συχνότητα αυτή είναι μικρή και η έκβαση σπανίως είναι σοβαρή⁶. Στο έμβρυο τα καλυμμένα με μητρικά αντισώματα RBCs καταστρέφονται κυρίως εξωαγγειακά με φαγοκυττάρωση ή με αντισωματο-εξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα, γεγονός που οδηγεί σε υπερχολερυθριναιμία και αναιμία.

Τα αντισώματα δημιουργούνται μετά από αλλοανοσοποίηση της μητέρας από εμβρυϊκά RBCs κατά τον τοκετό ή κατά το τελευταίο τρίμηνο της πρώτης κύησης. Σε επόμενες κυήσεις θα ήταν σημαντικό να ελεγχθεί ο γονότυπος Rhesus του εμβρύου ειδικά αν ο πατέρας είναι ετερόζυγος ως προς αυτό (Dd). Έτσι μπορούν να αποφευχθούν αφαιμαξομεταγγίσεις και προφυλακτική χορήγηση anti-D σφαιρίνης στην Rhesus αρνητική μητέρα (μετά αποβολή ή τοκετό) για την πρόληψη της ανοσοποίησής της, μέτρα τα οποία έχουν μεν μειώσει δραματικά τη θνησιμότητα όμως έχουν υψηλό κόστος και εγκυμονούν άλλους κινδύνους για τη μητέρα και το παιδί. Η προφύλαξη έναντι του Rhesus δεν έχει αποτέλεσμα στις ήδη ανοσοποιημένες γυναίκες. Έτσι, ακόμα και ένα χαμηλός τίτλος anti-D αντισωμάτων, τα οποία προήλθαν από μετάγγιση μιας μονάδας αίματος με φαινότυπο DEL, θα αποτρέψει την anti-D προφύλαξη και θα πυροδοτήσει την ενίσχυση του τίτλου των αντισωμάτων έναντι του D σε κάθε εγκυμοσύνη. Ο μηχανισμός αυτός είναι μοναδικός για το αντιγόνο D. Δεν χρησιμοποιείται προφύλαξη για τα άλλα αντιγόνα των RBCs και πολύ σπανιότερα αντισώματα έναντι άλλων αντιγόνων προξενούν τέτοια βλάβη όσο ένας υψηλός τίτλος anti-D.²⁸

3.3 Ανοσοποίηση και Weak D

Αν και η ανοσογονικότητα των weak D αμφισβητήθηκε²⁹ λόγω του μικρού αριθμού αναφορών, σήμερα είναι αναμφίβολη η πιθανότητα της αλλοανοσοποίησης RhD(-) ασθενών από weak D αιμοδότες. Ακόμα και πριν την διευκρίνιση της μοριακής βάσης των weak φαινοτύπων είχαν ήδη καταγραφεί 3 περιπτώσεις δημιουργίας anti-D αντισωμάτων, συμπεριλαμβανομένης μιας πρωτογενούς ανοσοποίησης από μονάδα RBCs με 800-1.500 αντιγόνα D/κύτταρο.³⁰ Με την πάροδο του χρόνου εμφανίζονται στη βιβλιογραφία περιστατικά ανοσοποίησης τόσο έναντι συχνών όσο και

σπάνιων weak D. Στη Νέα Ζηλανδία αιμοδότης ccD.Ee weak D type 2 με περίπου 450 αντιγόνα/κύτταρο προκάλεσε την παραγωγή anti-D.³¹ Στη Βραζιλία το ίδιο συνέβη από weak D type 1 αιμοδότη, ο οποίος είχε Cde in trans καταστέλλοντας περαιτέρω τον αριθμό των αντιγόνων D σε 357/κύτταρο.³² Το 2005 καταγράφεται περίπτωση εγκύου γυναίκας RhD(-) στην 4^η εγκυμοσύνη να αναπτύσσει anti-D μετά από τη χορήγηση 3 D(-) μονάδων αίματος, χωρίς την ύπαρξη anti-D κατά τις προηγούμενες 3 κυήσεις. Αποδείχτηκε ότι η αλλοανοσοποίηση οφείλονταν σε ασκό αίματος με το σπάνιο weak D type 26 και μόνον 70 αντιγόνα/κύτταρο.³³

Στα δείγματα αίματος με weak D, το αντιγόνο D είτε δεν ανιχνεύεται είτε δίνει ασθενώς θετικό αποτέλεσμα με άμεση συγκολλητινοαντίδραση (Direct Agglutination Test - DAT) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όμως τις περισσότερες φορές προσδιορίζονται μετά από επώαση με anti-D και τη χρήση αντισφαιρινικού ορού (AHG). Αν ένας ασθενής έχει DAT(+), το τεστ για την ανίχνευση του weak D μπορεί να είναι ψευδώς θετικό λόγω της κάλυψης των RBCs με ανοσοσφαιρίνη. Για τον αξιόπιστο προσδιορισμό του πρέπει πρώτα να απομακρυνθούν οι ανοσοσφαιρίνες από την επιφάνεια των κυττάρων ή να γίνει έλεγχος DNA για το RHD. Η ικανότητα των weak RBCs να δίνουν θετική αντίδραση εξαρτάται από το είδος των αντιδραστηρίων του κάθε κατασκευαστή και τη μέθοδο ανίχνευσης που χρησιμοποιείται.

Όσο αφορά τη μετάγγιση των weak D ασθενών δεν έχει καταγραφεί έως τώρα αλλοανοσοποίηση εκείνων που ανήκουν στους τύπους weak D type 1, type 2 και type 3. Στατιστικά είναι οι τύποι με ποσοστό άνω του 90% στην Ευρώπη και οι φορείς τους μπορούν να δέχονται D(+) αίμα, ώστε να αποφεύγεται η αναίτια χρήση του πολύτιμου για τις Τράπεζες Αίματος D(-).³³

3.4 Ανοσοποίηση και DEL Αιμοδότες

Η αλλοανοσοποίηση από DEL αιμοδότες έχει καταγραφεί αν και η συχνότητά της είναι πολύ χαμηλότερη από αυτήν που συμβαίνει από RhD(+).

Μια 58χρονη γυναίκα στην Αυστρία με γονότυπο ccddee, χωρίς ιστορικό μεταγγίσεων, μητέρα ενός RhD(-) παιδιού, αποδείχτηκε ότι ανέπτυξε anti-D μετά από μετάγγιση μιας μονάδας αίματος DEL. Τα αντισώματα ανιχνεύτηκαν 3 ημέρες μετά τη μετάγγιση και με προσρόφηση/έκλουση αποδείχτηκε ότι ο αιμοδότης είχε το σπάνιο DEL αλληλόμορφο RHD(IVS5-38 del4). Ένα χρόνο μετά ο τίτλος anti-D στον ορό αίματος της γυναίκας ήταν 1:128 σε έλεγχο με κάρτα γέλης.³⁴ Μια 67χρονη RhD(-) Γιαπωνέζα ευαισθητοποιήθηκε μετά από 1 μετάγγιση με RhD(+) RBCs και τα anti-D ήταν μη ανιχνεύσιμα μέχρι το 2000. Από το 2000 έως το 2003 η ασθενής μεταγγίστηκε με 59 συμβατές μονάδες αίματος RhD(-). Δύο από τις μονάδες αργότερα γονοτυπήθηκαν ως DEL (K409K;1227 G>A). Ο τίτλος του anti-D αυξήθηκε από 1:8 το 2001 σε 1:128 το 2003, χωρίς να αναφερθεί καμιά αιμολυτική αντίδραση λόγω της μετάγγισης.³⁵ Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η μετάγγιση με DEL RBCs μπορεί να ενεργοποιήσει τη δευτερογενή ανοσιακή απάντηση σε λήπτες RhD(-) με ιστορικό παραγωγής anti-D αλλοαντισωμάτων.

3.5 Ανοσοποίηση και Partial D

Ο φαινότυπος partial D περιγράφηκε μετά την παρατήρηση ότι μερικοί ασθενείς οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν ως D(+) ανέπτυξαν anti-D όταν μεταγγίστηκαν με RhD(+) αίμα. Οι αντιδράσεις των partial D ατόμων με τους κοινούς anti-D αντιορούς μπορεί να είναι ισχυρές (π.χ. DIII, DIVa), μεταβλητές ανάλογα με την έκφραση των επιτόπων (π.χ. DVa, DVII) ή ασθενείς (π.χ. DVI type 1, DAR). Οι τελευταίοι φαινότυποι αναφέρονται ως weak partial D. Η παραλλαγή του D αντιγόνου βρίσκεται σε κάποιο εξωκυττάριο βρόχο της πρωτεΐνης και ενώ δεν είναι τέτοια που να αποτρέπει την θετική αντίδραση με τους αντιορούς, είναι ικανή να ωθήσει το ανοσοποιητικό σύστημα του partial D ασθενούς να θεωρήσει "ξένο" το φυσιολογικό D και να δημιουργήσει αλλοαντίσωμα. Αυτό οδηγεί σε προβλήματα για το σωστό προσδιορισμό του RhD των ασθενών αλλά και των αιμοδοτών, διότι οι ασθενείς πρέπει να μεταγγιστούν με D(-) αίμα και οι έγκυες γυναίκες να λάβουν RhIg. Δυστυχώς στις περισσότερες περιπτώσεις

αυτό αποκαλύπτεται μετά τη δημιουργία anti-D. Ο φαινότυπος DVI είναι ο πιο συχνός τύπος partial D στους Καυκάσιους και έχει καταγραφεί θανάσιμη περίπτωση HDN από αλλοαντίσωμα anti-D από partial DVI μητέρα.³⁹

Ως αιμοδότες οι weak D και partial D μπορεί να προάγουν τη δημιουργία anti-D σε RhD(-) ασθενή και γι' αυτό πρέπει να θεωρούνται RhD(+). Ως υποψήφιοι λήπτες RBCs όμως μπορεί ανάλογα με το αλληλόμορφο που έχουν να συμπεριληφθούν στους RhD(-). Έτσι στην εποχή της ανάλυσης του DNA, πρέπει ο γενετικός πολυμορφισμός να αποτελεί μέρος του ιστορικού κάθε αιμοδότη και ασθενή, όταν είναι εφικτός.

Στον Πίνακα 4. φαίνονται συνοπτικά οι κλινικές πληροφορίες σχετικά με το αντιγόνο D.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.

Φαινότυπος D	Αλλαγές αμινοξέων πρωτεΐνης RhD	Έκφραση του D	Τεστ ανίχνευσης του D	Στον ασθενή			Ο αιμοδότης Μπορεί να ευαισθητοποιήσει RhD(-) λήπτη
				Ανάπτυξη anti-D μέσω μετάγγισης ή εγκυμοσύνης	Κατάλληλα RBC για μετάγγιση	Σύσταση για προφύλαξη με RhIgG	
D(+)	ΟΧΙ	Κ.Φ.	Άμεση Coombs	ΟΧΙ	D(+)	ΟΧΙ	ΝΑΙ
Partial D	Συνήθως εξωκυττάρια	Τροποποιημένη (κάποιοι επίτοποι D υπάρχουν και κάποιοι όχι)	Άμεση ή Έμμεση Coombs	ΝΑΙ	D(-) ή συμβατός partial D φαινότυπος	ΝΑΙ	ΝΑΙ
Weak partial D	Συνήθως εξωκυττάρια	Τροποποιημένη (κάποιοι επίτοποι D υπάρχουν και κάποιοι όχι) ασθενής ή variable	Άμεση ή Έμμεση Coombs	ΝΑΙ	D(-) ή συμβατός weak D φαινότυπος	ΝΑΙ	ΠΙΘΑΝΟΝ
Weak D	Συνήθως στο εσωτερικό της μεμβράνης ή εσωκυττάρια	Κ.Φ. αλλά ασθενής	Έμμεση Coombs (Άμεση Coombs για μερικά)	ΟΧΙ	D(+) ή D(-)	ΟΧΙ	ΠΙΘΑΝΟΝ
D(-)	Απουσία RhD	Απουσία RhD	Έμμεση Coombs	ΝΑΙ	D(-)	ΝΑΙ	ΟΧΙ

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στα πλαίσια της σωστής μετάγγισης αίματος, ο ακριβής προσδιορισμός του D φαινότυπου έχει μεγάλη σημασία στην αποφυγή της αλλοανοσοποίησης. Ο καθορισμός ενός μεγάλου αριθμού αλληλομόρφων του RHD, στα οποία οφείλονται οι D weak και D partial φαινότυποι, είναι μια από τις κυριότερες εξελίξεις της τελευταίας εικοσαετίας στο πεδίο αυτό. Η πολυπλοκότητα του συστήματος Rhesus έχει οδηγήσει σε σημαντική ποικιλομορφία στη συχνότητα των weak και partial φαινοτύπων ανάμεσα στις διάφορες εθνότητες.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του συστήματος Rhesus σε αιμοδότες και ασθενείς, οι οποίοι ελέγχθηκαν από το Τμήμα Αιμοδοσίας του Νοσοκομείου «Ο Ευαγγελισμός».

Ο πρώτος άξονας στον οποίο κινήθηκε η μελέτη ήταν η κατανομή/συχνότητα των Rh(+) και Rh(-) καθώς επίσης και των παραλλαγών του RHD σε ένα σύνολο 27251 αιμοδοτών και 36551 ασθενών.

Από το 1997 και μετά άρθρα από όλο τον κόσμο αλλά και από την Ευρώπη⁴⁰, έδωσαν εναλλακτικές ερμηνείες στους D- φαινότυπους βασιζόμενες στο μοριακό έλεγχο του RHD γονιδίου, καταρρίπτοντας την έως τότε άποψη ότι RHD(+) σημαίνει D+. Η ύπαρξη RHD(+) αλληλομόρφου σε D- άτομα, κυρίως συνδυαζόμενο με την ύπαρξη C ή E αντιγόνου παρατηρήθηκε σε Καυκάσιους, Ιάπωνες και άλλους. Ο Wagner και οι συνεργάτες του μελέτησαν τη μοριακή βάση του RHD σε 754 D- Καυκάσιους, οι οποίοι είχαν τουλάχιστον ένα εκ των C, E αντιγόνων.⁴¹ Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, το δεύτερο σκέλος της μελέτης είχε στόχο την αναζήτηση RHD αλληλομόρφων σε αιμοδότες με αντιγόνο C ή αντιγόνο E, οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν D αρνητικοί με άμεση αλλά και με έμμεση Coombs. Ο πίνακας 5 παρουσιάζει μελέτες που έγιναν σε διαφορετικούς πληθυσμούς D- αιμοδοτών. Εδώ φαίνεται ότι η συχνότητα των DEL στους Ευρωπαίους είναι από 1:350 έως 1:2.000, ενώ αυτή φτάνει έως και το 1:5 στους Ασιάτες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η

ανίχνευση weak D ή partial D σε αιμοδότες οι οποίοι ήταν χαρακτηρισμένοι ως Rhesus D αρνητικοί και ccee. Επίσης εμφανίζονται εκτός από τα αλληλόμορφα τα οποία βρέθηκαν και η συχνότητά τους σε κάθε πληθυσμό, η στρατηγική ελέγχου των περιοχών του RHD γονιδίου κάθε ερευνητικής ομάδας.²⁸ Στην παρούσα εργασία και με στόχο τον εντοπισμό weak D, partial D, DEL ή υβριδικά RHD-CE-D γονίδια σε D- δείγματα επιλέχθηκαν περιοχές του υποκινητή (RHD promoter), του εσωνίου (intron) 4, του εξωνίου (exon) 7 και της 3' μη μεταφραζόμενης (3' untranslated) περιοχής του εξωνίου 10, ακολουθώντας το πρωτόκολλο του Wagner και συνεργατών.⁴¹

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Μετά τον προσδιορισμό των ομάδων αίματος ως προς το ABO και το Rhesus σύστημα με ορολογικές μεθόδους, δείγματα αίματος σε EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) από 140 άτομα (93 ασθενείς και 47 αιμοδότες) με D^{u+} αφορούσαν το πρώτο σκέλος της μελέτης, ενώ 112 δείγματα αίματος αιμοδοτών σε EDTA (71 άνδρες και 41 γυναίκες) με C ή/και E και D^{u-} το δεύτερο.

2.2 ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ

Ο προσδιορισμός του RhD είναι ένα δύσκολο εγχείρημα κατά τον καθημερινό έλεγχο screening τόσο των ασθενών όσο και των αιμοδοτών. Ασθενείς μπορεί να χαρακτηριστούν ως RhD(-) ενώ στην πραγματικότητα διαθέτουν μεταλλάξεις στο RHD γονίδιο τέτοιες που δεν χρειάζονται μετάγγιση με RhD(-) αίμα, ενώ αιμοδότες να θεωρηθούν λάθος ως RhD(-) με συνέπεια την αλλοανοσοποίηση. Γι' αυτό είναι απαραίτητος ένας συνδυασμός αντιδραστηρίων και μεθόδων με στόχο την καλύτερη δυνατή ειδικότητα και ευαισθησία.

2.2.1 Screening ABO-Rhesus ασθενών

Ο καθορισμός της ομάδος ABO (ευθείας και ανάστροφης), του RhD και των Rh φαινοτύπων έγινε σε αυτόματο αναλυτή Qwalys 3 της εταιρείας

Diagast, ο οποίος χρησιμοποιεί μικροπλάκες και τεχνολογία βασισμένη στο μαγνητισμό των ερυθρών (E.M. Technology). Η φυγοκέντρηση αντικαθίσταται με μαγνητική δύναμη που ελκύει τα ερυθροκύτταρα. Στην ανάστροφη ομάδα ABO μαγνητικά σωματίδια έχουν εναποτεθεί στα RBC, ενώ στην ευθεία τα προς έλεγχο RBC αφού εναιωρηθούν σε διάλυμα $FeCl_2$ και βρωμελίνης μεταφέρονται σε θέσεις της μικροπλάκας προεπικαλυμμένες με μονοκλωνικά αντισώματα. Μετά από ήπια ανακίνηση και επώαση η μικροπλάκα τοποθετείται σε μαγνητικό πεδίο και τα συσσωρευμένα, λόγω αιμοσυγκόλλησης, RBC δημιουργούν μια κουκίδα στον πυθμένα του βοθρίου της μικροπλάκας. Όλοι οι χρησιμοποιούμενοι αντιοροί ανήκουν στις IgM ανοσοσφαιρίνες και προέρχονται είτε από κυτταρικές σειρές ποντικού (anti-A, anti-B, anti-AB) είτε ανθρώπου [anti-C, anti-c, anti-E, anti-e, anti-D1 (P3X61), anti-D2 (HM10)]. Η ανίχνευση του αντιγόνου D στα δείγματα των ασθενών έγινε και στην πλάκα (slide test) με άμεση συγκολλητινοαντίδραση χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό ανθρώπινο IgM/IgG αντιορό anti-D (κυτταρικές σειρές: TH-28/MS-26) της εταιρείας New Diagnostic Dimension και σε επιλεγμένες περιπτώσεις ο προσδιορισμός του RhD έγινε και σε σωληνάριο με τον ίδιο αντιορό.

2.2.2 Screening ABO-Rhesus αιμοδοτών

Ο προσδιορισμός του ABO συστήματος, του RhD και των Rh φαινοτύπων στους αιμοδότες έγινε με προτυποποιημένη μέθοδο καρτών γέλης ID-Card ABO/Rh (BIO-RAD, Switzerland). Η κάρτα περιέχει μίγμα αντισωμάτων ανθρωπείας προέλευσης εναιωρημένα στο gel και συγκεκριμένα: πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα anti-A (κυτταρική σειρά: A5), πολυκλωνικό anti-B, anti-AB, anti-D και anti-CDE. Το μικροσωληνάριο (ctl) είναι το αρνητικό control. Η ανίχνευση του αντιγόνου D στα δείγματα των αιμοδοτών έγινε επίσης στην πλάκα και σε επιλεγμένες περιπτώσεις και σε σωληνάριο με τον ίδιο τρόπο όπως και στους ασθενείς.

2.2.3 Επιβεβαίωση

Τα RhD (-) αρνητικά αποτελέσματα καθώς και εκείνα τα οποία αντέδρασαν με θετικότητα μικρότερη από ++++ επιβεβαιώθηκαν με έμμεση

Coombs με τη χρήση του ID-DiaClon Anti-D (BIO-RAD, Switzerland), ένα μονοκλωνικό anti-D IgG αντίσωμα της κυτταρικής σειράς ESD1, σε κάρτα γέλης ID-Card "LISS/Coombs" της ίδιας εταιρείας. Θετικότητα έμμεσης Coombs (D^{u+}) ίση ή μικρότερη από +++ θεωρήθηκε ότι υποδηλώνει παραλλαγή του RhD και προχώρησε σε περαιτέρω έλεγχο.

Τα D^{u-} δείγματα ελέγχθηκαν επιπλέον και με αυτοματοποιημένη μέθοδο μικροπλάκας NEO/Immucor Gamma Capture solid phase (Immucor, Germany) χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα Anti-D immuClone rapid IgM της κυτταρικής σειράς RUM1 καθώς και το Novaclone Anti-D IgM + IgG Monoconal Blend. Το τελευταίο περιέχει μίγμα δύο ανθρώπινων μονοκλωνικών anti-D αντισωμάτων, IgM Anti-D (D-175-2) και IgG Anti-D (D415 1E4). Ο έλεγχος απέβη αρνητικός με τη μέθοδο NEO και στα 112 δείγματα της μελέτης.

Σε όλα τα παραπάνω δείγματα έγινε επίσης και άμεση δοκιμασία Coombs (DAT) και εκείνα με θετική αντίδραση αποκλείστηκαν από τη συνέχεια της μελέτης.

Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των D^{u+} δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το "ID-Partial RhD Typing Set" (BIO-RAD, Switzerland). Το σετ αποτελείται από 6 μονοκλωνικά anti-D τα οποία μπορούν να συμβάλλουν στον περαιτέρω χαρακτηρισμό του RhD αντιγόνου μετά από τον καθορισμό του RhD. Οι οροί μπορεί να διαχωρίσουν τις κατηγορίες II, IV, V, VI, VII, DFR, DBT και R₀Har. Η κατηγορία I είναι ξεπερασμένη και στην κατηγορία III τα ερυθροκύτταρα αντιδρούν με όλα τα anti-D αντιδραστήρια αλλά μπορούν να διαχωριστούν από τα φυσιολογικά RhD θετικά κύτταρα από την παρουσία allo-anti-D στον ορό. Η ποικιλία DVI παραμένει η πιο σημαντική κατηγορία προσδιορισμού. Κλινικά, ασθενείς με RBC ποικιλίας DVI πρέπει να αντιμετωπίζονται όπως τα άτομα με RhD (-) τόσο επί μετάγγισης όσο και κατά τη διάρκεια ή μετά από κύηση για την αποφυγή δημιουργίας αλλοαντισωμάτων anti-D έναντι των ελλειπόντων επιτόπων με πιθανές κλινικές επιπτώσεις.

Η αντίδραση γίνεται σε ID-Card "ID-Partial RhD Typing Set" με 6 μικροσωληνάρια τα οποία περιέχουν πολυδύναμο αντισφαιρινικό ορό [anti-IgG κονίκλου, μονοκλωνικό anti-C3d (κυτταρική σειρά C139-9)], εναιωρημένα στο

gel. Σε κάθε μικροσωληνάριο επωάζεται εναιώρημα RBC με διαφορετικό μονοκλωνικό αντίσωμα των κυτταρικών σειρών: LHM76/55 (IgG), LHM77/64 (IgG), LHM70/45 (IgG), LHM59/19 (IgG), LHM169/80 (IgG) και LDM1 (IgM). Στο τέλος της επώασης η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται με βάση το συνδυασμό των θετικών αντιδράσεων.

2.3 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

2.3.1 Απομόνωση DNA

Το περιφερικό δείγμα αίματος συλλέχθηκε σε σωληνάριο που περιείχε EDTA και φυγοκεντρήθηκε στις 4000 στροφές (rpm) για 10 min. Ακολούθως η πλούσια σε λευκοκύτταρα στοιβάδα (buffy coat) διαχωρίστηκε και καταψύχθηκε στους -20°C μέχρι τη χρήση. Η απομόνωση του DNA έγινε από 200 μL αρχικού όγκου buffy coat με τη χρήση του QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη μέθοδο έγινε αρχικά λύση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών με απορρυπαντικά και χαοτροπικά άλατα, και χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνάση K για τη διάσπαση των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια με τη χρήση στηλών στο εσωτερικό των οποίων υπάρχει μεμβράνη πάνω στην οποία προσδένονται παροδικά τα μόρια του DNA, απομακρύνθηκαν μετά από φυγοκέντρηση όλα τα υπόλοιπα κυτταρικά στοιχεία. Ο καθαρισμός του DNA πάνω στη μεμβράνη ολοκληρώθηκε με δυο διαδοχικά πλυσίματα με τα διαλύματα AW1 και AW2, τα οποία περιέχονται στο kit και είχαν αραιωθεί με αιθανόλη 99%. Στα προς εξέταση δείγματα η τελική έκλυση του DNA έγινε με 100 μL ήπια αλκαλικού buffer AE. Η συγκέντρωση του DNA σε κάθε δείγμα προσδιορίστηκε σε φασματοφωτόμετρο Eppendorf BioPhotometer. Η καθαρότητα του απομονωμένου DNA προσδιορίστηκε μέσω του λόγου $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$. Σε όλα τα δείγματα οι τιμές κυμαίνονταν μεταξύ 1,7-1,9 γεγονός που υποδηλώνει την ελάχιστη πρόσμιξη πρωτεϊνών και RNA. Τέλος κάθε δείγμα DNA αραιώθηκε με H_2O (PCR-grade) σε τελική συγκέντρωση 35 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Τα δείγματα καταγράφηκαν σε αρχείο και διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι τη χρήση τους.

2.3.2 RHD γονοτύπηση D^u(+)

Για τον προσδιορισμό του RHD γονοτύπου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση εκκινητών (primers) ειδικών στο 3' άκρο τους ως προς κάποιο πολυμορφικό νουκλεοτίδιο (**PCR-SSP**). Η μέθοδος αυτή οδηγεί στον προσδιορισμό γνωστών, σημειακών πολυμορφισμών στους οποίους οφείλονται συγκεκριμένες παραλλαγές του RHD γονιδίου και χρησιμοποιήθηκαν τα kit RBC-Ready Gene D weak και RBC-Ready Gene CDE της εταιρείας Inno-train Diagnostik GmbH, Kronberg/Taunus, Germany. Τα kit περιέχουν strips κωνικών σωληναρίων όγκου 0,2 mL στα οποία είναι προδιαμοιρασμένο λυοφιλοποιημένο μίγμα primers (ειδικών για το γονίδιο της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης [HGH], που λειτουργεί ως εσωτερικό control, και συγκεκριμένων αλληλουχιών του RHD) καθώς και νουκλεοτίδια. Η κάθε δοκιμασία αποτελείται από 12 σωληνάρια (για το RBC-Ready Gene D weak kit) και 16 σωληνάρια (για το RBC-Ready Gene CDE kit) με διαφορετικούς primers στο καθένα και γίνεται στο ίδιο πρωτόκολλο PCR. Μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων αξιολογούνται και καταγράφονται σε έντυπο οι θέσεις οι οποίες εμφανίζουν θετική αντίδραση.

Κάθε δείγμα DNA αρχικά ελέγχθηκε με το RBC-Ready Gene D weak kit, το οποίο μπορεί να διακρίνει τους συχνότερους στην Ευρώπη τύπους weak D type weak D type 1, 1.1, 2, 3, 4.0/ 4.1, 4.2 (DAR), 5, 11 (M295I), 14, 15, 17, 20, 31, 38

Επειδή αυτό το test ανιχνεύει την ύπαρξη συγκεκριμένων μεταλλάξεων weak D, τα σπανιότερα weak καθώς επίσης τα partial και υβριδικά αλληλόμορφα δεν μπορεί να διευκρινιστούν. Έτσι τα δείγματα εκείνα τα οποία δεν ανήκαν σε κάποιον από τους παραπάνω weak D τύπους ελέγχθηκαν με το RBC-Ready Gene CDE kit, το οποίο προσδιορίζει τα γονίδια του RHCE: C, C^W, c, E, e καθώς και τα RHD-CE-D υβριδικά γονίδια, υπεύθυνα για τους τύπους partial DIIIa, DIIIb, DIIIc, DIII type 4-7, DIVa, DIVb, DIV type 3-5, DVa, DVa type 1-9, DBS-0,-1, DCS, DVI type 1-4, DVII, DNB, DAU-0,1,2,3,4, DHMi, DHMii, DBT type 1&2, DAR, DFR type 1&2, DHAR, D psi, D-CE(1-9)-D, D-CE(2-9)-D, D-CE(8-9)-D, D-CE(3-7)- D, D-CE(4-7)-D, d(C)es.

Η αντίδραση της PCR σε τελικό όγκο 10 μ L έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, το οποίο βελτιστοποιήθηκε για το θερμοκυκλοποιητή BioRad PTC-200. Ο διαχωρισμός των πολλαπλασιασμένων προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια πηκτή (gel) αγαρόζης (UltraPure Agarose, Invitrogen) συγκέντρωσης 2% σε TBE buffer 1x. Μετά από 40 min σε τάση 120V ακολούθησε χρώση του gel σε ethidium bromide (EtBr) 0,5 μ g/mL και η τελική ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε σε τράπεζα υπεριώδους UV transilluminator (220-310 nm) με φωτογραφικό σύστημα DNR Bio-Imaging System, MiniBis Pro.

Η φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης κάθε δείγματος αξιολογήθηκε σύμφωνα με τους εσώκλειστους στα kit πίνακες 6 και 7 (RBC-Ready Gene D weak και RBC-Ready Gene CDE Protocol for Documentation της εταιρείας Inno-train). Στην εικόνα 7 παρουσιάζονται φωτογραφίες ηλεκτροφορήσεων όλων των πολυμορφισμών οι οποίοι βρέθηκαν στη μελέτη.

2.3.3 Screening με PCR-SSP δειγμάτων D^u(-)

- Επιλογή εκκινητών (primers)

Τα D- δείγματα των ασθενών και των αιμοδοτών, τα οποία έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα με τις ορολογικές μεθόδους ελέγχθηκαν με PCR-SSP χρησιμοποιώντας primers ειδικών για την ενίσχυση περιοχών του RHD γονιδίου. Συγκεκριμένα τα 4 ζεύγη primers αφορούσαν τις περιοχές: RHD promoter, intron 4, exon 7 και exon 10. Η πλήρης αλληλουχία βάσεων του RHD γονιδίου συμπεριλαμβανομένων των 5'-UTR και 3'-UTR περιοχών καθώς και των εσωνίων παρουσιάζεται παρακάτω. Με γκρι σκίαση εμφανίζονται οι περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών.

Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 11 (GRCh38.p11)

Chromosome 1: 25,272,393-25,330,445 = 58053 bp

>RHD-201 Promoter

```
caaaaccgctccctggcgccaaaaagcttggggaccctgatctaggctacagttaagtggtcaaacac  
ccaggtcctgaagttaggctgcctgggttaaatcccagctctactgcttactagccctgtgacctgagca  
agtcacttagttttctgtgcctcagttcactcatttgaataaatcctaatagtacccatcccagtgatgaa
```

ctaagttcatatatgtaaagtagttagaatgggtgcctagcaagtagtacttaataacagttagctctgaaaatgta
taaagcaaaattaaccaatgttttagtggttgagccaactttttctatgctgtgtaacatattattttataa
gagtggaatatattgtacatgctgttatataacttgcttttactaaacagtagctatcctctgtgcagtttgat
aaaagcgttttctctgtctttcctgcatatgttcagaacctcatattggtagcaagtttcatgtcctgtagttt
cttaaccaacccccctgtagtggacatttaggttagtctcagtttttctctgtaaataaagctgcactgag
caagaagtgactgatgccaagtactagatgaccttaggtatgacctctctgggtcttggttcttggtctaa
aaacaaaatgacaggattcgactgggtgattaaatctcctctgatctacataggaattgtttcaagacat
ttctgacttctctagtgacaggggtgctactacctcatgagatttcagtggaacaactgtaatggtcaataa
agtatccactttccacctccctgcagctcctggccctggctttattctctggggctccacacattcagttaca
ctcagtggccagtggtggtggaccattgtagaaaataaggaactccaattccttcttttcttcttcttca
tcttcttctccctctctacatccctctcttcttcttctcctcgacacttacctgtaccagaccttctgccag
gcacatggatgggagcacaggggaagttggctgcagggtagaactaagtccaagccccctaaagc
tcatgccaggggactggactgtccagtagggatggggatgctgaggctggtggccttctcaaatg
cactgtagtccccagcagagctcctgggtgacctgtgaggaggtgaccagaggtagagcaacttca
ccctaaggctggatcaggatccccctcaggttttactagagccaaacccacatctccttcttctgcccac
cccccttaaatgcttagaacaacatagattaaatacaaatcaaatgtaagtaattcaactgtgtaac
tatgaggagtcagttctacgtgggtctatctgtatctcccagggtcagctccattcttcttcttcttctt
ctcattcaatacattgttgaagagctcactgggtgacctctctgtcatgtagtaaggttttaaagaagaag
cctcttctgagctcagtttcttattcataaaataggagattgatccattcctgtcttcttacaaggatagct
gaagatgactgaagtacagagtaaagaaggattatgtttgggtgcaaaaggaatagaatgcccttcttca
aactgagcacagcaggaacctgtaacaggaacacagcaactgttgaatgaatgacaatattggaaa
acatacatttctccccctccccatcatagtcctctgcttccgtgtt

>RHD-201 ENSE00003585230 **exon 1**:protein_coding
AACTCCATAGAGAGGCCAGCACACCAGCCTTGCAGCCTGAGATAAG
GCCTTTGGCGGGTGTCTCCCCTATCGCTCCCTCAAGCCCTCAAGTAGG
TGTTGGAGAGAGGGGTGATGCCTGGTGTGCTGGTGGAAACCCCTGCACAG
AGACGGACACAGGATGAGCTCTAAGTACCCGCGGTCTGTCCGGCGCT
GCCTGCCCTCTGGGCCCTAACACTGGAAGCAGCTCTCATTCTCCTCT
TCTATTTTTTTACCCACTATGACGCTTCTTAGAGGATCAAAGGGGCT
CGTGGCATCCTATCAAG

gtgagagttcattggaaaagtggtcacaggagcaaatagcaggggcaggggcgggggaggcctgtg
gttctccaggggcacagatgttcttctacaaaatccaaggaagattccccatcttctccgtaga
ttgaccgaaattcagccaacaatgtagcttctttagaagcagcctgggcatgccctcttctgtgaagc
ctgcttgatcttctcagcacagtgagagcctcttcttgggttctcctcaaatccctctaccaaattggtcttcat
aattctctgcttct

>RHD-201 ENSE00003511155 **exon 2**:protein_coding
TTGGCCAAGATCTGACCGTGATGGCGGCCATTGGCTTGGGCTTCCTCA
CCTCGAGTTTCCGGAGACACAGCTGGAGCAGTGTGGCCTTCAACCTCT
TCATGCTGGCGCTTGGTGTGCAGTGGGCAATCCTGCTGGACGGCTTC
CTGAGCCAGTTCCTTCTGGGAAGGTGGTCATCACACTGTTTCTCAG

gtattgggatggtggctggatcacttctgggtcatagaggaatggaccccgaaaggacaggttccaga
agatctgggatattgccccctctctgtctagcaccagtgctgtgcaatatttaggacatccttatactaaaag
attattcattgtttaaattcaaatgactgggcatcctgtattttactggacagccctactccgtgtatcacia
ggaatccaggcctacattcctcctgcatccttcttctgattatgtcagattatgattttgaaagttacataatc
aatata

>RHD-201 ENSE00003524278 **exon 3**:protein_coding
TATTCGGCTGGCCACCATGAGTGCTTTGTCGGTGCTGATCTCAGTGGA
TGCTGTCTTGGGGAAGGTCAACTTGGCGCAGTTGGTGGTGGTGGTGC
TGGTGGAGGTGACAGCTTTAGGCAACCTGAGGATGGTCATCAGTAATA
TCTTCAAC

gtgagtcattggtgctgggaggaggacctgggagaaaaggccaaaagctccattggtggggttcc
agggttttgaaaaataaagacaacctgtaatcccagctacttgggaggtgaggaggaagatcacttg
aggccaggagttgagaccagcctgggcatcatagcaagatcctcatctctaaaaagtaatttttctaaat
tatccagttggtggcatgcacctgtagtctcagtactcaggaggctgaggtgtgagttggaaggattgtt
tgagcccaggagttagg

>RHD-201 ENSE00003669934 **exon 4**:protein_coding
ACAGACTACCACATGAACATGATGCACATCTACGTGTTTCGCAGCCTAT
TTTGGGCTGTCTGTGGCCTGGTGCCTGCCAAAGCCTCTACCCGAGGG
AACGGAGGATAAAGATCAGACAGCAACGATACCCAGTTTGTCTGCCAT
GCTGG

gtaaggacaaggtggggtgagtggtctcctacttgggctgagcagaatggctcagaaaaggctctggct
gaaaaaatctccctcctttaccaagttcccctgggtgtctgaagccctccatcatgattcatttcttgagtag
tgtttgctaaattcatacctttgaattaagcacttcacagagcaggttcaggaggcctggggtatgcagattt
caaccctctggcctttgttcctgtctgtaaaatgtggtagctgggtatcagcttgagagctcggaggggag
acgtgactt

>RHD-201 ENSE00003644044 **exon 5**:protein_coding
GCGCCCTCTTCTTGTGGATGTTCTGGCCAAGTTTCAACTCTGCTCTGC
TGAGAAGTCCAATCGAAAGGAAGAATGCCGTGTTCAACACCTACTATG
CTGTAGCAGTCAGCGTGGTGGACAGCCATCTCAGGGTCATCCTTGGCTC
ACCCCAAGGGAAGATCAGCAAG

gtgagcagggcgctgcccttgggagcacttgggtctaacaggactagcacacatattatgccctccc
caccagggccagcgtgggtgggagagggcatgccgggtgggagctgtgcctgccttacagtg
gagctctaggtagaatgctgggtggtcacagtgggctgggactcaggagactgtccagtatcaaag
gctttctggggtagtgattaaatccatccatgtaaacagacctcagttgaacccatttctgct
agttgctaaagtcagtcacca

>RHD-201 ENSE00003682971 **exon 6**:protein_coding
ACTTATGTGCACAGTGCAGGTGTTGGCAGGAGGCGTGGCTGTGGGTAC
CTCGTGTACCTGATCCCTTCTCCGTGGCTTGCCATGGTGTGGGTCT
TGTGGCTGGGCTGATCTCCGTCCGGGGAGCCAAGTACCTGCCG

gtaagaaactagacaactaacctcctctgcttggctgaaggccagcaggacgctgggacctgatggg
ccactgtgcagtcacagctgcattaggcaggtgcggcgcttctcttattggctcaacgcctagtgag
ggatccatcctggctcgggtggcgcatttgttaagatgctcgggagcaggtggcagaacccatttgagcttg
cttgggcattgggagaaattgttatcaggctactggggtgtcacagaactcaaggacagggactggagt
gttggtgggagccccgaagc

>RHD-201 ENSE00001333242 **exon 7**:protein_coding
GGGTGTTGTAACCGAGTGCTGGGGATTCCCCACAGCTCCATCATGGG
CTACAACTTCAGCTTGCTGGGTCTGCTTGGAGAGATCATCTACATTGT
GCTGCTGGTGCTTGATACCGTTCGGAGCCGGCAATGGCAT

gtgggtcactgggcttacccttaacactcccctccaactcaggaagaaatgtgtgcagagt
ccttagctggggcgtgtgcactcggggccaggtgctcagtaggcttcggtgaatattgttgctgattattc
agaaattctgtccagcccctaccttgatggattatcacctctccaggccacctcttcttccaaatagggc
cacctaggatagaccaaagacacgaaatctttgtgatcccacaaacacagagcagggtcaaatagggc
ccaagccaattgaga

>RHD-201 ENSE00003680748 **exon 8**:protein_coding
GATTGGCTTCCAGGTCCTCCTCAGCATTGGGGAACCTCAGCTTGGCCAT
CGTGATAGCTCTCATGTCTGGTCTCCTGACAG

gtcagtgtgaggccaccttctccaccattgccaggacacagcaccacgtccagagcgcaccctgcc
gtgtggctggatgtctatgtgccccatctcctccctgaggatcacataattcagaattggaaaggttcttag
aggtcacctgtgctaattgtggactgtgaggccaggcaggggaaggacatccctgaggttataagta
gggtgagtggcaacgttgcagactttgaaccagggtggtgatcacactcagtttgcacagaagccc
gagaaaatccttacacca

>RHD-201 ENSE00001686760 **exon 9**:protein_coding
GTTTGCTCCTAAATCTTAAAATATGGAAAGCACCTCATGAGGCTAAATA
TTTTGATGACCAAGTTTTCTGGAAG

gtaagattttcacctattaacgtgatagatttgagtgcataactaaaaacatacctgagtatatatgttg
acttgctgtttatgagtaaaacaaaaacaaaaatggagtaaggagcattgcaggaggaactagagga
gaaacaaatccatgatgatgtgtgtggggagggtggcggggaggtgtaagggtcaccatttccc
tgatacctcaaattcattcagagtcagggatgagacagcttactggccacactcccctcccctatctg
cagtcctcagcgtagcca

>RHD-201 ENSE00001653457 **exon 10**:protein_coding
TTTCCTCATTTGGCTGTTGGATTTAAGCAAAGCATCCAAGAAAAACA
AGGCCTGTTCAAAAACAAGACAACCTTCTCTACTGTTGCCTGCATTTG
TACGTGAGAAACGCTCATGACAGCAAAGTCTCCAATGTTTCGCGCAGGC
ACTGGAGTCAGAGAAAATGGAGTTGAATCCTTTCTCTGCCACTCTTTGA
GGAGAATCTCACCATTTATTATGCACTGTAGAATACAACAATAAAATAC
AGCCATGTACCACATAACAACATCTTGGTAAACAACAGACTGCATATAT
GATGGTGGTCATCCAGTAAGCTAAGGTTAATTTATTATTATTCCTTGTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGATGTAGTCTTACTCTGTCACCCAGGC
TAGAGTGCAATGGCACCATCTTGGCTCACTGCAACCTCTACCTCCTGG
GTTCAAGCAAATCTCCTGCCTCAGCCTCAAAGTAGCTGGGATTACAG
GCACCCACCACATCTGGCTAATTTTTTTGTATTTTTAGTAAAGATGGGGT
TTCACCATGTTGGCCAGGCTGATCTCAAACCTCCTGACCTCAAGTGATC
TGCCCGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGAACCACAGGCCTGAGCCAC
TGTGCCAGCCTTGTTTGCTTTTTTAAACAGATAACAGTGTGCTCATAGA
AACTGCTTTGACATGACTGCAATCATGTGCTTCATAGAACTTAATTAG
ATTATACCACTAGAGTCTTCAGATTTTTTATACTTTTTTTTTTTTTGAAACGG

AGTCTCACTCTGTCACCAGGCTGGAGTGCAGTGCCGCAATCTCGGCT
CACTGCAACCTCCGCCTCCAGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCC
TCCCGAGTAGCTGGAATTACAAGTGCGCACTACCACACCCAGCTAATT
TTTGCATTTTTACTTGACAGGGTTTCACCATGTTGGCTAGGATAGTTTC
ACCAGGATCTCTTGGCCTCATGATCAGCCTGCCTCGGCCTCCCAAAGT
GCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACCGTGCCAGCCTATACTTCCCTTT
TTGAATACCATTTGGTGTTTTGAAGAATTAACAGCTTTGTGAACGTGGC
AGTGCTTGTGATTGAGGCTTCCATTGAGACCAAGGGGAGAACCTGGTT
GCAGGACAAACAGACGGACAGCGTGTGGCAGTGTAAATGCTCTTCT
GAAGGCTGATACGACAGCTCTCTGTGCACTGATTGCATATGCATCCCA
AGATTATATTATTGTTTTCTACTGCTATGTGTCACTTTGCCAAACAGG
ATGTGGAAAATGAATAAGCGTTTTCTTAGGCACTTCTAACAGACAAT
TGGTCAAATGAACTCCATTGCTTAAGAAACACATAAACACCATTTAGT
CACTGAACATAGCTATATGTATGGTTGTTACTATGGGAAATCTTGT
GCCAATTTCTTTGAAAATTCTGGCAGACCAAGGTTCTTTTTGTTTACAT
AATACTTGAAAAATAAAAATGAACAAGCTAACAAACTA

ccaagtttctacttacataaatgtagttgcatacagaaaatgtgactgtgaattaattttctaggacttttaaa
ctataagcactatttgcacaaaagagaaccaatctatcaattacaaactcacataattttacagatttttttt
cctacacagcacataaaacagaaggaattgaagccaccctccaaacacaggggaaggaggctgtg
tgtatatcctcattgtctttcacattctaaggtggtccactcagtgactgaaatccttaagcgttgattagtctg
cttgggc

Επιπλέον, για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος primers για την ενίσχυση περιοχής του γονιδίου της HGH, και συμπεριλήφθηκε ως εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος (Internal Control - I.C.) σε κάθε σωληνάριο αντίδρασης PCR. Όλοι οι primers εξετάστηκαν για την ειδικότητά τους ως προς το RHD γονίδιο μέσω του Basic Local Alignment Search Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Στον Πίνακα 8 φαίνονται οι αλληλουχίες των primers, η θερμοκρασία T_m , η θέση πρόσδεσής τους στο γονιδίωμα και το μέγεθος του προϊόντος που πολλαπλασιάζεται με PCR. Οι αλληλουχίες των primers ex7s, ex7a, ex4s, in4a, ex10s, prDs, prDa συντέθηκαν σύμφωνα με την εργασία του Wagner και των συνεργατών του⁴¹, ενώ οι ex10a HGH-s και HGH-a συντέθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης.

- Multiplex PCR-SSP

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με τη χρήση ειδικών εκκινητών (PCR-SSP) διενεργήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή BioRad PTC-200. Για τη δημιουργία του μίγματος αντίδρασης (reaction mix) της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα εξής προϊόντα:

a) H₂O (PCR-grade)

b) Invitrogen Platinum Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific). Η συσκευασία περιελάμβανε 10x PCR Buffer και MgCl₂ σε συγκέντρωση 50 mM.

c) dNTPs (Invitrogen). Το set των περιελάμβανε τα 4 δεσοξυνουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) σε συγκέντρωση 100 mM το καθένα. Μετά από τη μίξη τους σε ίσες ποσότητες παρασκευάστηκε dNTPs Mix τελικής συγκέντρωσης 2mM για τη χρήση του στην PCR.

d) Οι primers συντέθηκαν από την εταιρεία Thermo Fisher Scientific. Αμέσως μετά την παραλαβή τους ανασυστάθηκαν με H₂O (PCR-grade) σε τελική συγκέντρωση 100 μM. Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν aliquots συγκέντρωσης 10 μM για χρήση στην PCR.

Κάθε δείγμα ελέγχθηκε σε δύο σωληνάρια όγκου 0,2 mL. Η σύνθεση του μίγματος (mix-1 και mix-2) αντίδρασης σε κάθε σωληνάριο διέφερε ως προς τους primers.

	mix 1 (μL)	mix 2 (μL)
H ₂ O	9,8	9,8
Buffer 10x	2	2
dNTPs Mix [2mM]	3	3
MgCl ₂ [50 mM]	0,6	0,6
Primer ex7s [10 μM]	0,4	
Primer ex7a [10 μM]	0,4	
Primer ex4s [10 μM]		0,4
Primer in4a [10 μM]		0,4
Primer ex10s [10 μM]	0,4	
Primer ex10a [10 μM]	0,4	
Primer prDs [10 μM]		0,4
Primer prDa [10 μM]		0,4
Primer HGH-s [10 μM]	0,4	0,4
Primer HGH-a [10 μM]	0,4	0,4
Taq Platinum	0,2	0,2
DNA (35 ng/μL)	2	2
Τελικός όγκος (μL)	20	20

Η εκτέλεση των αντιδράσεων έγινε ταυτόχρονα στον θερμοκυκλοποιητή με πρόγραμμα το οποίο περιλάμβανε τις εξής συνθήκες:

Στάδιο 1:	94°C	2 min	(αποδιάταξη του DNA και ενεργοποίηση της πολυμεράσης)	1 κύκλος
Στάδιο 2:	94°C	10 sec	(αποδιάταξη του DNA)	10 κύκλοι
	65°C	1 min	(υβριδισμός των εκκινητών)	
Στάδιο 3:	94°C	30 sec	(αποδιάταξη του DNA)	25 κύκλοι
	61°C	1 min	(υβριδισμός των εκκινητών)	
	72°C	30 sec	(σύνθεση DNA)	
Στάδιο 4:	72°C	5 min	(σύνθεση DNA)	1 κύκλος
Στάδιο 5:	4°C		(διατήρηση των προϊόντων)	

Ο διαχωρισμός των πολλαπλασιασμένων προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια πηκτή (gel) αγαρόζης (Low melting temperature agarose, NuSieve GTG Agarose) συγκέντρωσης 4% σε TBE buffer 1x. Μετά από 140 min σε τάση 125V ακολούθησε χρώση του gel σε ethidium bromide (EtBr) 0,5 μg/mL και η τελική ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε σε τράπεζα υπεριώδους UV transilluminator (220-310

nm) με φωτογραφικό σύστημα DNR Bio-Imaging System, MiniBis Pro. Στην Εικόνα 8 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης 7 δειγμάτων DNA. Στην διαδικασία της PCR συμπεριλήφθηκε δείγμα με γνωστά θραύσματα DNA (φΧ174 RF DNA/Hae III Fragments) και δείγμα PCR control, στο οποίο προστέθηκαν 2 μ L H₂O αντί DNA στο reaction mix. Σε κάθε δείγμα διακρίνονται καθαρά τα υπάρχοντα εξώνια. Για τα δείγματα εκείνα στα οποία βρέθηκε ένα τουλάχιστον εξώνιο ανασύρθηκε από το αρχείο το δείγμα DNA και εκτελέστηκε η προτυποποιημένη εμπορική δοκιμασία RBC-Ready Gene CDE kit για την ανίχνευση πιθανών υβριδικών και D Partial γονοτύπων. Στην περίπτωση που με το προαναφερθέν kit το δείγμα χαρακτηρίστηκε ως RHD(+), χρησιμοποιήθηκε το RBC-Ready Gene D weak kit για τον έλεγχο ύπαρξης D weak γονοτύπου.

Τέλος για τον αποκλεισμό της ύπαρξης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων το παρόν πρωτόκολλο της PCR χρησιμοποιήθηκε σε 8 RHD(-) δείγματα με csee, τα οποία για διαφορετικό λόγο το καθένα έφτασαν στο εργαστήριο μοριακού ελέγχου και ελέγχθηκαν με το RBC-Ready Gene CDE kit. Τα εν λόγω δείγματα αποδείχθηκαν αρνητικά ως προς το RHD με το συγκεκριμένο kit χωρίς την ύπαρξη κανενός από τα 9 εξώνια που ανιχνεύονται με αυτό. Κανένα από τα 8 δείγματα δεν εμφάνισε προϊόν στις 4 περιοχές των εξωνίων οι οποίες επιλέχθηκαν στην in-house multiplex PCR.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Μελέτες του RHD σε D- αιμοδοτές και οι περιοχές του γονιδίου που χρησιμοποιήθηκαν.

Population	RHD exons screened	D-negative donors screened	DEL detected	Frequency of DEL among D-negative	Most frequent alleles	Number of different DEL alleles found
Brazil [52]	intron 4, exon 10	239	0	<1:80		
Brazil [48]	intron 4, exon 7, pools of 10	2,450	19 (including weak D)	1:129		
Central Europe [23], donors with C or E	5' UTR, 3, 10	1,700	15 DEL + 5 weak D / partial D	1:113	<i>RHD</i> (M295I), <i>RHD</i> (IVS3+1G>A)	3
China [53]	intron 4, exon 7, (5'UTR, exon 10)	155 (negative on direct agglutination)	31 (+3 weak D)	1:5	<i>RHD</i> (K409K)	1
China (Shanghai) [37]	(serologic screening)	1,585	279	1:6	<i>RHD</i> (K409K)	
Denmark [9]	5,7,8	5,058 (4,932 results available)	2*	1:2,029		2
Denmark [47], donors with C or E	exon 10	233	3 DEL + 1 weak D	1:78		3
Germany(South-West) [8], donors with C or E	5' UTR, intron 4, exons 7, 10	754	15 DEL + 4 weak D / partial D	1:50	<i>RHD</i> (M295I), <i>RHD</i> (K409K)	3
Germany(South-West) [8], ccddee donors	5' UTR, intron 4, exon 10	7,688	1 chimeric donor	<1:2,500		
Germany (South-West) [28]	intron 4 (pools of 20)	46,133	47	1:982	<i>RHD</i> (IVS3+1G>A), <i>RHD</i> (M295I)	10
Germany (North) [31, 35]	exon 7 (pools of up to 40)	46,756	76	1:615	<i>RHD</i> (IVS3+1G>A), <i>RHD</i> (M295I)	15
Italy [54]	commercial PCR systems, pools of 5	235	1	1:235	<i>RHD</i> (M295I)	1
Korea [43]	intron 4, exon 7	126	16 + weak D	1:8	<i>RHD</i> (K409K)	1
Korea [40]	3,5,7,10 plus intron 4	264	43	1:6	<i>RHD</i> (K409K)	
Upper Austria [39]	4,7,10 in pools of 20	2,427	3	1:809	<i>RHD</i> (IVS3+1G>A)	2
Upper Austria [30]	4,7,10 in pools of 20	23,330	66	1:353	<i>weak D type 4.3</i> , <i>RHD</i> (IVS3+1G>A)	6
Thailand [55]	(serologic screening)	254	50	1:5	<i>RHD</i> (K409K)	
Tunisia [56]		488	3 weak D, 1 partial D (missed despite IAT)			

*In addition, an *RHD*(IVS3+1G>A) sample was detected but characterized as D-negative.



Interpretationstabelle / Interpretation Table

Reaktion / Reaction	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PCR-Produkt/ PCR product (bp)	250 150	125	165	140	110	225	175 100	220 125	220 135	145	190	120
RHD*01W.1/1.2 (RHD*weak D type 1/1.2)/RHD*62	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHD*01W.1.1 (RHD*weak D type 1.1)	250 150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHD*01W.2/2.1/2.2 (RHD*weak D type 2/2.1/2.2)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHD*01W.3/3.1 (RHD*weak D type 3/3.1)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHD*09.01/01.01/01.02 (RHD*DAR/DAR1.01/1.02)/RHD*09.02.00/.01 (RHD*DAR2.00/.01)	-	-	-	+	-	-	-	125	-	-	-	-
RHD*01.00/01.03 (RHD*DAR1.00/1.03)/RHD*09.03 (RHD*DAR3)/RHD*09.06 (RHD*DAR6)/RHD*03.07 (RHD*DI11.07)/RHD*01W.14 (RHD*weak D type 14)/RHD*01W.40/51 (RHD*weak D type 40/51)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RHD*09.03.01 (RHD*DAR3.01)/RHD*09.05 (RHD*DAR5)/RHD*03.01/.06 (RHD*DI11a/DI11.06)/RHD*01N.72	-	-	-	+	-	-	175	-	-	-	-	-
RHD*09.04 (RHD*DAR4)	-	-	-	+	-	+	175	-	-	-	-	-
RHD*01.01 (DUC-3)/RHD*10.13 (RHD*DAU13)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RHD*01W.29 (RHD*weak D type 29)	-	-	-	-	-	-	-	125	-	-	-	-
RHD*01W.5 (RHD*weak D type 5)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RHD*11 (RHD*weak partial 11)	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-
RHD*15 (RHD*weak partial 15)	-	-	-	-	-	-	-	-	135	-	-	-
RHD*01W.17 (RHD*weak D type 17)/RHD*10.08 (RHD*DAU8)	-	-	-	-	-	-	-	220	220	-	-	-
RHD*01W.20 (RHD*weak D type 20)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
RHD*01W.31 (RHD*weak D type 31)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
RHD*01W.38 (RHD*weak D type 38)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ergebnis / Result												
Reaktion / Reaction												

1	2*	3**	4	5	6	7	8
weak D type 1.1 weak D type 1 434 bp IC 250 bp 150 bp	weak D type 2 434 bp IC 125 bp	weak D type 3 434 bp IC 165 bp	weak D type 4.0/4.1/4.2.1/4.2.2/DAR (weak D type 4.2)/4.3/14 434 bp IC 140 bp	weak D type 5 434 bp IC 110 bp	weak D type 4.1 434 bp IC 225 bp	weak D type 4.0/4.1 weak D type 11 434 bp IC 175 bp 100 bp	weak D type 17§ weak D type 15 434 bp IC 220 bp 135 bp
	weak D type 20 434 bp IC 145 bp	weak D type 31 434 bp IC 190 bp	weak D type 38 434 bp IC 120 bp				

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων των D weak γονοτύπων. Σε κάθε θέση ανιχνεύεται προϊόν μεγέθους 434 bp του γονιδίου της HGH.

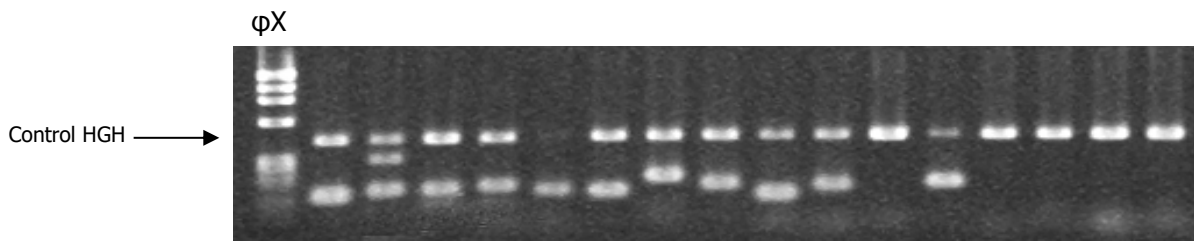
Reaction No.	1	2	3 ^A	4 ^A	5	6	7	8	9	10	11	12	13 ^A	14 ^A	15 ^A	16 ^A	Commonly associated haplotype
PCR-Product (Size in bp)	124	149	139	152	139	122	186	147	106	145	157	155	166	166	139	139	
Specificity	D ₁	D ₂ C D ₃	D ₄	D ₅ psi	D ₆	D ₇	D ₈	D ₉	C „W“	c	E	e	D ^W DHMI	D ^W DAU	DNB 697A	DNB 697C	
	D Exon Block								CcEe Block				CATPA Block				
D, #	+	149	305	+	152	+	+	+									
d	-	-	-	-	-	-	-	-									
C	-	149	-	-	-	-	-	-	106	-	-	-					
C ^W									106	298	-	-					
C ^W (rare)									298	+	-	-					
C									-	+	-	-					
E									-	-	+	-					
e									-	-	-	+					
D cat IIIa	+	149	-	152	+	+	+	+									cDe
D cat III type 5 + 6	+	149	-	152	+	+	+	+									cDe
D cat III type 7 **	+	-	-	152	+	+	+	+									cDe
D cat IIIb **	+	305	+	152	+	+	+	+									cDe
D cat IIIc	+	149	+	152	+	+	+	+									CDe
D cat III type 4	+	149	+	152	+	+	+	+									CDe
D cat IVa	+	149	+	152	+	-	+	+									cDe
D cat IVb																	CDe
D cat IV type 5	+	149	305	+	152	+	-	-	+								CDe
D cat IV type 3	+	149	305	+	152	-	-	-	+								CDe
D cat IV type 4	+	149	305	+	152	-	-	-	+								CDe
D cat VI typ 1 ^A	+	149	305	-	-	-	+	+	+								cDE
D cat VI typ 2	+	149	305	-	-	-	+	+	+								CDe
D cat VI typ 3	+	149	-	-	-	-	+	+	+								CDe
D cat VI typ 4	+	149	-	-	-	-	+	+	+								CDe
D cat Va type 2, D cat Va, D cat V type 7, DCS	+	149	305	+	-	+	+	+									CDe
D cat V type 3, DBS-6, DBS-1, D cat Va type 6 (identical to DV type 3?)	+	149	305	+	-	+	+	+									CDe
D cat V type 1, D cat Va type 9	+	149	305	+	152	+	+	+					-	-	-	133	CDe
D cat Va FK, D cat Va TO	+	149	305	+	152	+	+	+					-	-	-	133	open
D cat V TT, D cat Va type 8	+	149	305	+	?	+	+	+					-	-	-	133	open
D cat Va (SM), D cat Va type 4	+	149	305	+	152	+	+	+					-	-	-	133	CDe
D cat Va (DHK,DYD), D cat Va type 5	+	149	305	+	152	+	+	+					-	-	135	-	CDe
D cat VII	+	149	305	+	152	+	+	+					166	166	-	-	CDe
DNB	+	149	305	+	152	+	+	+					-	-	139	139	CDe
DAU-0,1,2,3	+	149	305	+	152	+	+	+					-	165	-	-	cDe
DAU-4	+	149	305	+	152	+	+	+					-	165	135	-	cDe
DHMI	+	149	305	+	152	+	+	+					107	-	-	-	cDE
DHMI	+	-	-	-	-	-	+	+									cDE
DBT type 1	+	149	305	+	-	-	-	-									open
DBT type 2	+	149	305	+	-	-	-	-									CDe
DAR (weak D type 4.1) ^A weak D type 4.0, 4.1, 4.4	+	149	305	-	152	+	+	+									cDe
weak D type 4.2.1, 4.2.2 ^A	+	149	305	-	-	+	+	+					-	-	-	133	cDe
DFR type 1 + 2	+	149	305	+	152	+	+	+									CDe
DHAR (Rh33)	-	-	-	152	-	-	-	-									cDe
D psi	+	149	305	+	101	+	+	+									cDe
RHD-CE(1-9)-D(10)	-	-	-	-	-	-	-	-									cdE
RHD-CE(2-9)-D	+	149	-	-	-	-	-	-									Cde
RHD-CE(3-7)-D d(C)ce ^A	+	149	-	-	-	-	-	-									Cde
RHD-CE(4-7)-D	+	149	305	-	-	-	-	-									cdE
RHD-CE(8-9)-D weak D type 45 ^A , 75	+	149	305	+	152	+	+	-									CDELe
Result:																	
Reaction No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων των D Partial και DEL γονοτύπων. Σε κάθε θέση ανιχνεύεται προϊόν μεγέθους 434 bp του γονιδίου της HGH.

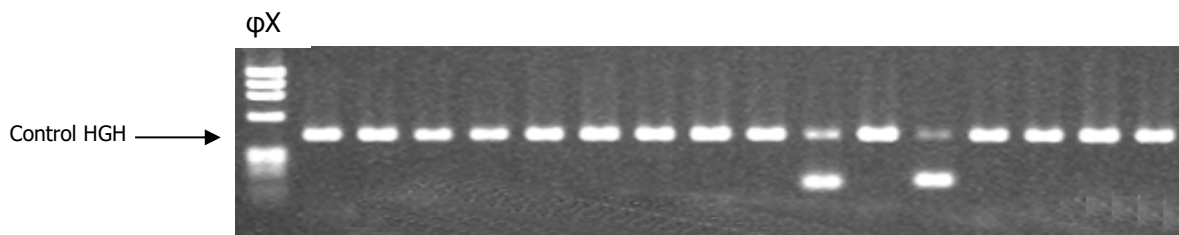
Primer	Αλληλουχία	Ειδικότητα	T _m (°C)	Προϊόν (bp)	Περιοχή γονιδίου
ex7s	5'-GTTGTAACCGAGTGCTGGGGATTC-3'	sense RHD/RHCE	64,29	123	exon 7
ex7a	3'-TGCCGGCTCCGACGGTATC-5'	antisense RHD	64.92		exon 7
ex4s	5'-CGATACCCAGTTTGTCTGCCATGC-3'	sense RHD/RHCE	64.85	224	exon 4
in4a	3'-TCCTGAACCTGCTCTGTGAAGTGC-5'	antisense RHD	65.46		intron 4
ex10s	5'-TGTTGCCTGCATTTGTACGTGAG-3'	sense RHD/RHCE	62.73	236	exon 10
ex10a	3'-CCTTAGCTTACTGGATGACCACCA-5'	antisense RHD	62.51		exon 10
prDs	5'-TCCACTTTCCACCTCCCTGC-3'	sense RHD	62.37	256	promoter
prDa	3'-GCAGCCAACTTCCCCCTGTG-5'	antisense RHD	61.85		promoter
HGH-s	5'-TGCCTTCCCAACCATCCCTTA-3'	sense HGH	62.26	434	HGH
HGH-a	3'-CCACTCACGGATTCTGTGTGTTTC-5'	antisense HGH	63.44		HGH

ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Τα χαρακτηριστικά των primers

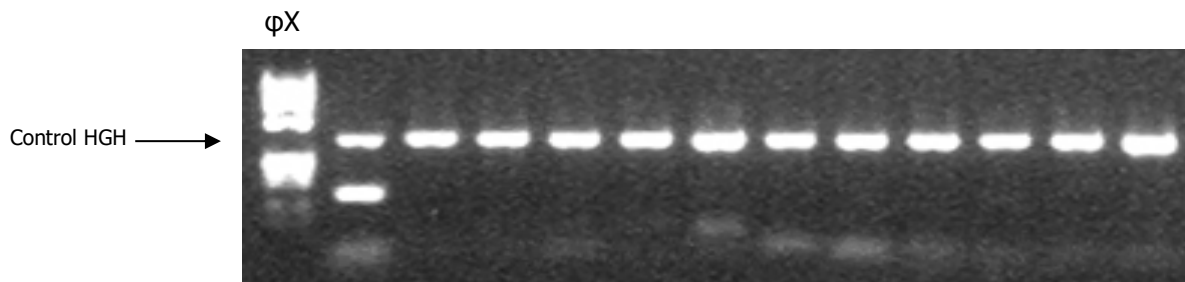
Εικόνα 7. Απεικόνιση όλων των πολυμορφισμών του RHD γονιδίου οι οποίοι ανιχνεύτηκαν στη μελέτη



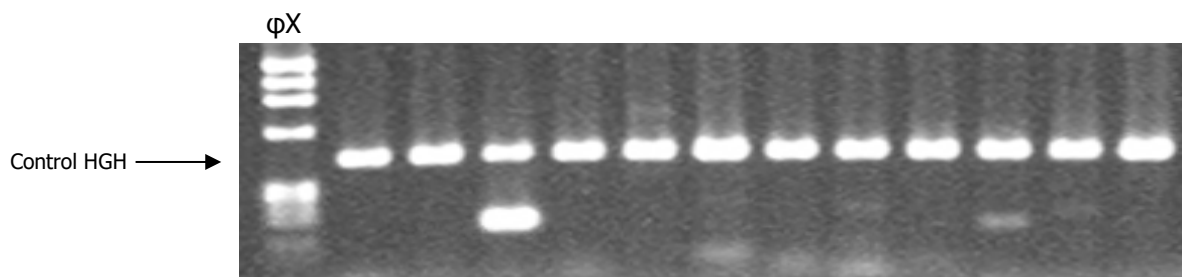
Rhesus D (+) positive Ccee



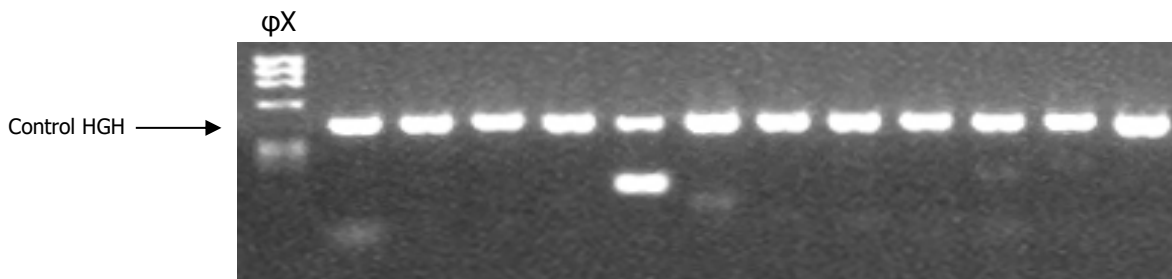
Rhesus D (-) negative ccee



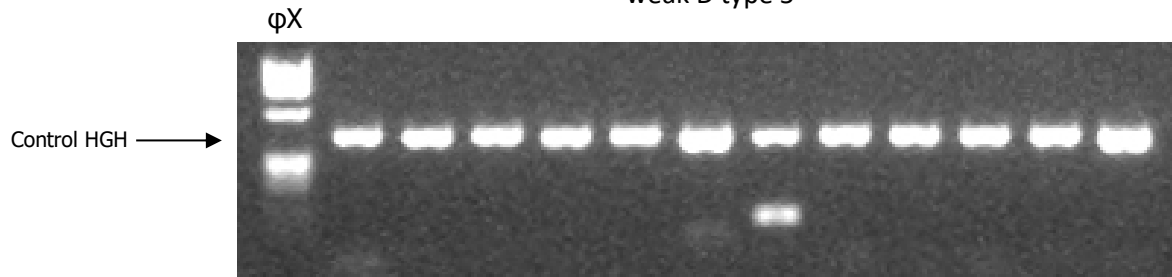
weak D type 1



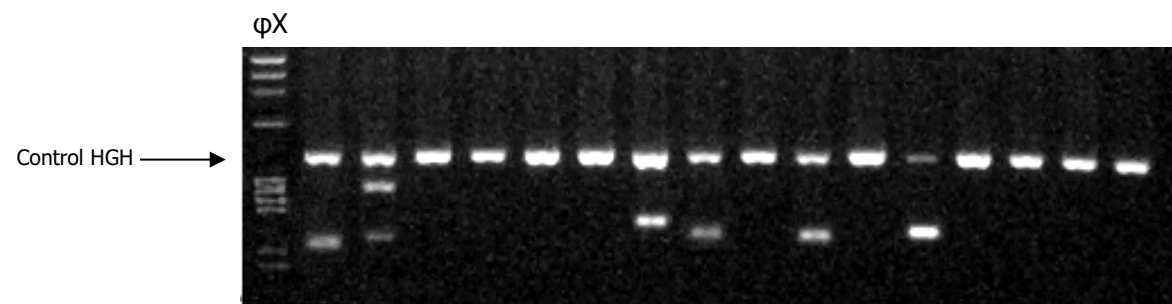
weak D type 3



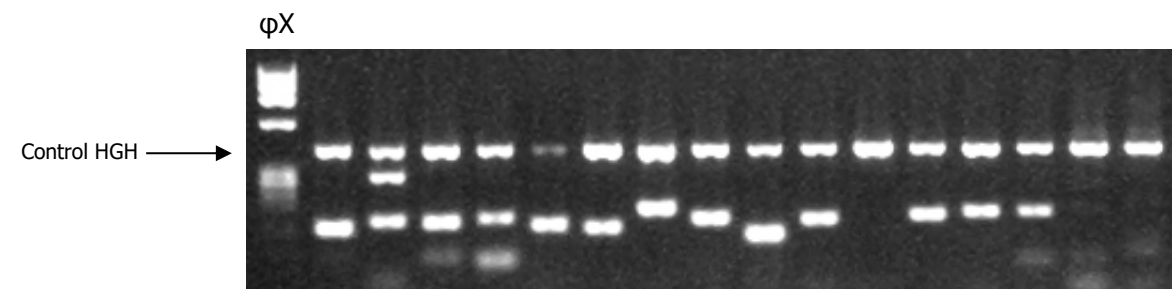
weak D type 5



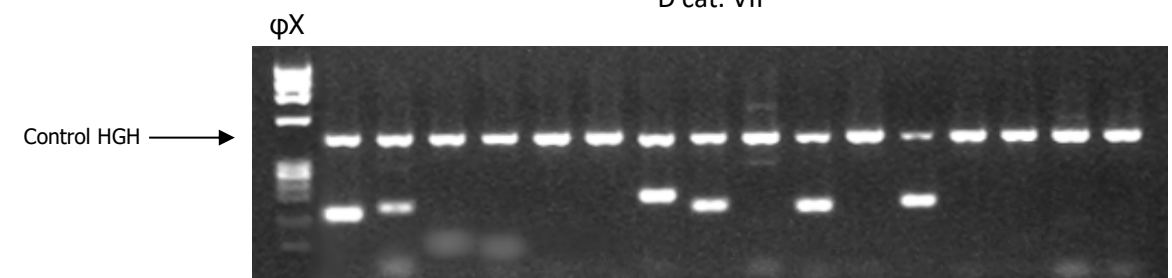
weak partial 11 (σε συνδυασμό με απλότυπο cDe)
DEL RHD(M295I) (σε συνδυασμό με απλότυπο CDe)



RHD-CE(4-7)-D



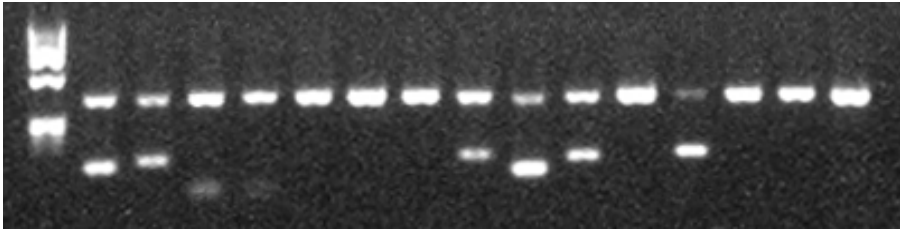
D cat. VII



RHD-CE(3-7)-Dd(C)ce

φΧ

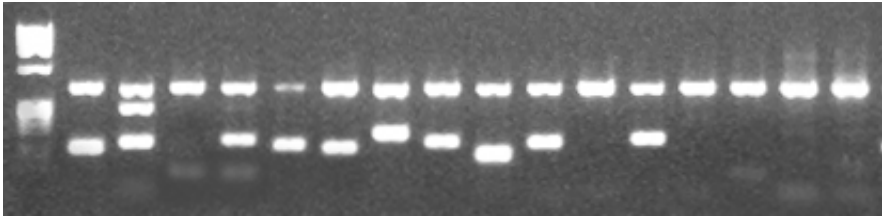
Control HGH →



RHD-CE(2-9)-D

φΧ

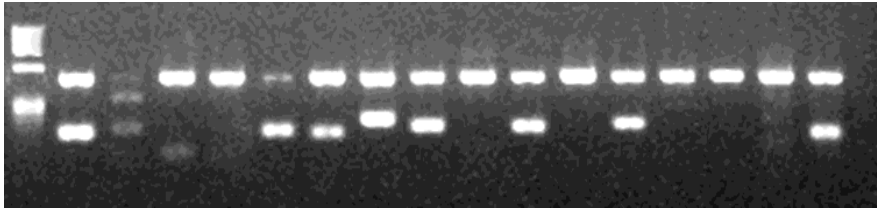
Control HGH →



DFR type 1+2 (Σε συνδυασμό με Ccee)

φΧ

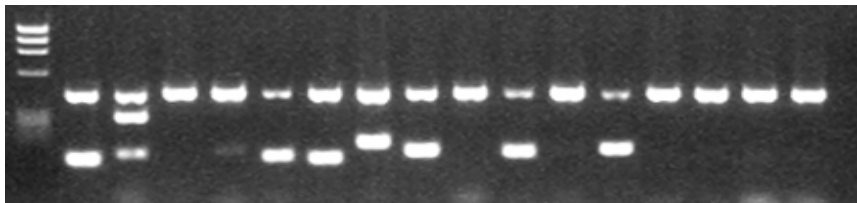
Control HGH →



Weak D type 4.2.1,4.2.2

φΧ

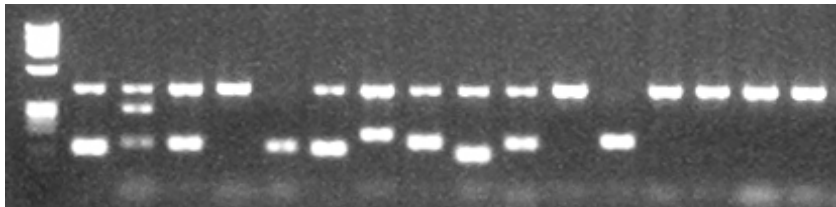
Control HGH →



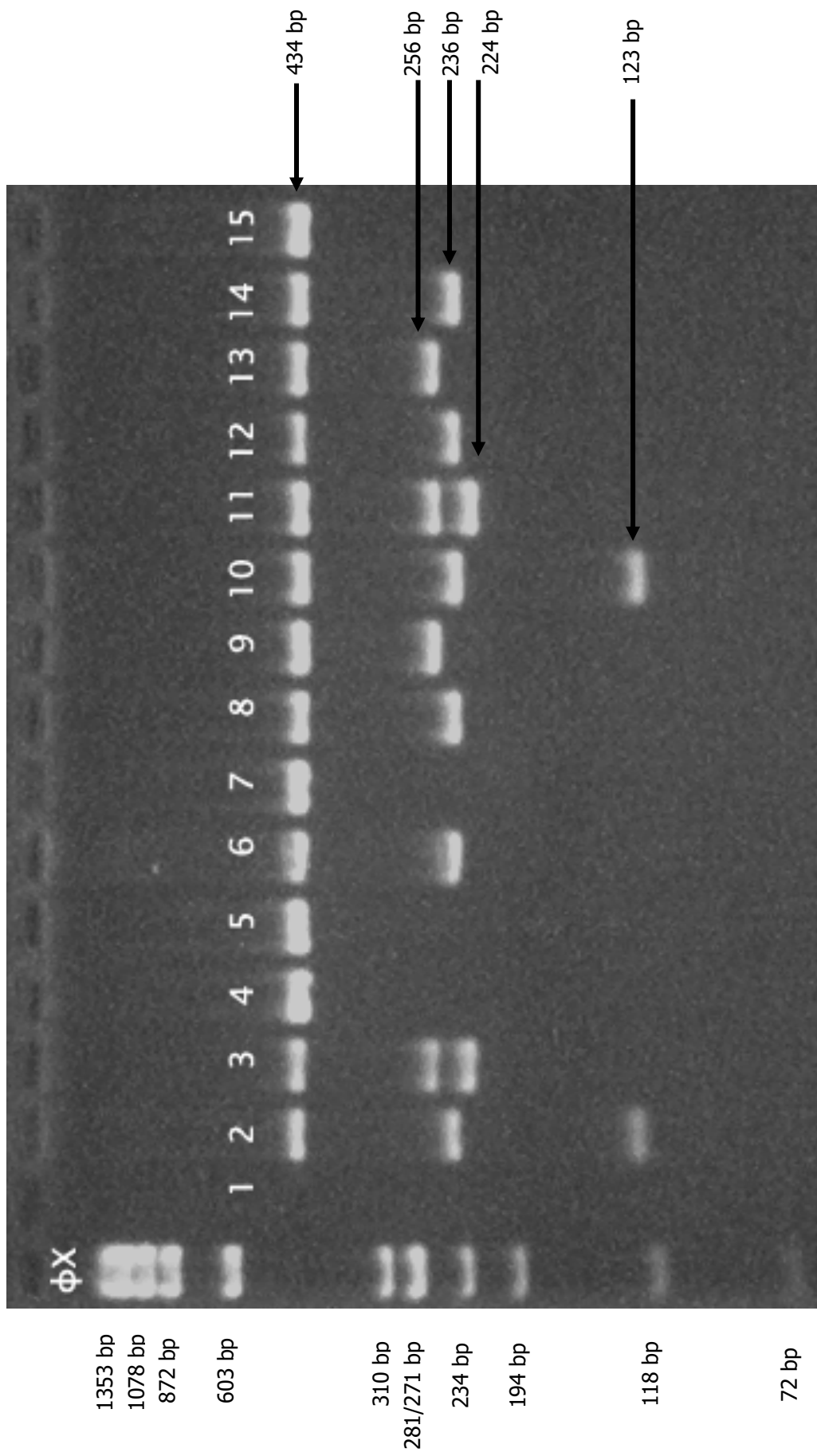
weak D type 4.0,4.1 (Σε συνδυασμό με ccee)

φΧ

Control HGH →



D cat Va type2, Va, V type 7, DCS



1 = PCR Control
 2,3 = Sample 1, Weak partial 11, Ccee
 4,5 = Sample 2, RHD (-)
 6,7 = Sample 3, RHD-CE(3-7)-Dd(C)ce, ccee
 8,9 = Sample 4, RHD-CE(2-9)-D
 10,11 = Sample 5, CDE(+), D weak (-)
 12,13 = Sample 6, RHD-CE(4-7)-D, ccee
 14,15 = Sample 7, RHD-CE(3-7)-Dd(C)ce, ccee

Εικόνα 8.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Συχνότητα των παραλλαγών του RHD

Κατά το χρονικό διάστημα από 15-12-2015 έως 15-5-2018 στο Τμήμα Αιμοδοσίας του Νοσοκομείου "Ο Ευαγγελισμός" προσδιορίστηκαν οι ομάδες αίματος ως προς τα συστήματα ABO και Rhesus συνολικά σε n=27251 αιμοδότες και n=36551 ασθενείς. Να σημειωθεί πως τόσο οι αιμοδότες όσο και οι ασθενείς της μελέτης προσμετρήθηκαν μια φορά ανεξαρτήτως πόσες φορές έδωσαν αίμα (αιμοδότες) ή πόσες φορές ελέγχθηκε η ομάδα τους (ασθενείς). Ως προς το ABO σύστημα από τους 27251 αιμοδότες οι 10613 (38,95%) ήταν A, οι 3611 (13,25%) B, οι 1348 (4,94%) AB και οι 11679 (42,86%) ομάδος O. Όσον αφορά τους ασθενείς προσδιορίστηκαν 14488 (39,64%) A, 5089 (13,92%) B, 1932 (5,29%) AB και 15042 (41,15%) ομάδος O.

Στον πίνακα 9 φαίνεται η συσχέτιση του αντιγόνου RhD με τα υπόλοιπα αντιγόνα του συστήματος Rhesus για τους αιμοδότες, ενώ στον πίνακα 10 η συσχέτιση αφορά 9913 από το σύνολο των 36551 ασθενών της μελέτης για τους οποίους σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου προσδιορίστηκε ο φαινότυπος RhCE.

Μετά το αρχικό screening με τη μέθοδο καρτών γέλης, στα RhD(-) και στα δείγματα με ασθενή θετικότητα διενεργήθηκε έμμεση Coombs. Αν η θετικότητα της έμμεσης Coombs (D^{u+}) ήταν ίση ή μικρότερη από +++ ζητήθηκε νέο δείγμα αίματος σε EDTA για τους ασθενείς ενώ για τους αιμοδότες αξιοποιήθηκε το stock EDTA σωληνάριο, προκειμένου να γίνει μοριακή τυποποίηση ενδεχομένων παραλλαγών του RHD. Παράλληλα στα δείγματα αυτά έγινε DAT και εκείνα με θετικό αποτέλεσμα δεν συμπεριελήφθησαν στη μελέτη.

Στον πίνακα 11 φαίνεται η κατανομή των RhD θετικών, αρνητικών και των πιθανών παραλλαγών του RhD ($Du+$) στο σύνολο των αιμοδοτών και ασθενών οι οποίοι εξετάστηκαν, ενώ στον πίνακα 12 η συσχέτιση των $Du+$ με τον RhCE φαινότυπο. Συνολικά 143 αιμοδότες και ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια για περαιτέρω μοριακό έλεγχο αλλά για διαφορετικούς λόγους 3 από αυτά δεν είχαν πλήρη στοιχεία ορολογικού ελέγχου. Ο πίνακας 13 παρουσιάζει τον πλήρη

ορολογικό έλεγχο ως προς Rhesus των 140 δειγμάτων στα οποία διενεργήθηκε μοριακός έλεγχος.

Η συχνότητα των παραλλαγών του RHD υπολογίστηκε σε 140 δείγματα αίματος (93 ασθενών και 47 αιμοδοτών), τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως Du(+) κατά τον ορολογικό έλεγχο με DAT(-). Στον πίνακα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μοριακής τυποποίησής τους, ο φαινότυπος RhCE, η ομάδα αίματος στο ABO σύστημα καθώς και τα δημογραφικά τους στοιχεία, ενώ στον πίνακα 15 και στην εικόνα 9 η συχνότητα των παραλλαγών του RHD. Να σημειωθεί ότι 126 δείγματα ανήκαν σε αιμοδότες ή ασθενείς με ελληνική καταγωγή και 14 σε αλλοδαπούς. Για τις συχνότητες των ποικιλιών του RhD στον ελληνικό πληθυσμό παρατίθεται ο πίνακας 16 και η εικόνα 10.

Πίνακας 9. Συσχέτιση του RhD με RhCE στους 27251 αιμοδότες

	RhD(+)*		RH(-)	
	n	%	n	%
CCEE	0	0,00	0	0,00
CCEe	68	0,28	0	0,00
CCee	7391	30,39	4	0,14
CcEE	13	0,05	0	0,00
CcEe	4257	17,51	1	0,03
Ccee	8943	36,78	237	8,08
ccEE	594	2,44	0	0,00
ccEe	2567	10,56	23	0,78
cc ee	485	1,99	2668	90,97
Σύνολο	24318	100	2933	100

* Οι αριθμοί και τα ποσοστά αφορούν όλα τα RhD θετικά δείγματα ανεξαρτήτως έντασης θετικότητας κατά τον ορολογικό έλεγχο (συμπεριλαμβανομένων των Du+).

Πίνακας 10. Συσχέτιση του RhD με RhCE σε 9913 ασθενείς

	RhD(+)*		RH(-)	
	n	%	n	%
CCEE	0	0,00	0	0,00
CCEe	15	0,24	0	0,00
CCee	1865	29,66	8	0,23
CcEE	7	0,11	0	0,00
CcEe	1041	16,56	1	0,03
Ccee	2392	38,04	254	7,19
ccEE	182	2,89	0	0,00
ccEe	615	9,78	28	0,79
cc ee	171	2,72	3242	91,76
Σύνολο	6288	100	3533	100

* Οι αριθμοί και τα ποσοστά αφορούν όλα τα RhD θετικά δείγματα ανεξαρτήτως έντασης θετικότητας κατά τον ορολογικό έλεγχο (συμπεριλαμβανομένων των Du+).

Πίνακας 11. Συχνότητα των RhD (+), RhD (-) και ενδεχομένως RhD παραλλαγών στους αιμοδότες και ασθενείς της μελέτης.

	Αιμοδότες	Ασθενείς	Σύνολο
RhD θετικοί (%)	24268 (89,05)	32915 (90,05)	57183 (89,63)
RhD αρνητικοί (%)	2933 (10,76)	3543 (9,69)	6476 (10,15)
RhD παραλλαγές (%)	50 (0,19)	93 (0,25)	143 (0,22)
Σύνολο	27251	36551	63802

Πίνακας 12. Συσχέτιση των Du+ με RhCE

	Αιμοδότες (n=50)		Ασθενείς (n=93)		Σύνολο (n=143)	
	n	%	n	%	n	%
CCEE	0	0,00	0	0,00	0	0,00
CCEe	0	0,00	0	0,00	0	0,00
CCee	1	2,00	4	4,30	5	3,50
CcEE	1	2,00	0	0,00	1	0,70
CcEe	2	4,00	1	1,08	3	2,09
Ccee	38	76,00	74	79,57	112	78,32
ccEE	1	2,00	0	0,00	1	0,70
ccEe	6	12,00	10	10,75	16	11,19
cc ee	1	2,00	4	4,30	5	3,50
Σύνολο	50	100	93	100	143	100

Πίνακας 13. Ορολογικός έλεγχος Rhesus των 140 Du+ δειγμάτων

Α.Α.	ΦΑΙΝΟΤΥ- ΠΟΣ RhCE	ΠΛΑΚΑ	ΤΥΒΕ	ΚΑΡΤΑ ΓΕΛΗΣ	ΙΑΤ (Du)	ID-Partial RhD (BIO-RAD)					
						1	2	3	4	5	6
SG-432	Ccee	[-]	[+/-]	2+	3+	3+	3+	[-]	1+	3+	[-]
SG-433	Ccee	[-]	[-]	1+	2+	3+	3+	[-]	2+	3+	[-]
SG-446	Ccee	[+/-]		3+	3+	3+	3+	[-]	3+	3+	[-]
SG-458	Ccee	[-]	[+/-]		1+	3+	3+	[-]	2+	3+	[-]
SG-496	Ccee	[-]	[-]		1+	3+	3+	[-]	2+	3+	[-]
SG-545	Ccee	[-]	[-]	2+	3+	4+	3+	[-]	3+	4+	[-]
SG-410	Ccee	1+	2+	2+	2+	3+	4+	3+	[-]	4+	4+
SG-485	Ccee	3+		3+	3+	3+	3+	3+	[-]	3+	3+
SG-488	Ccee	2+	1+	3+	1+	4+	4+	3+	[-]	4+	4+
SG-520	Ccee	2+	2+		3+						
SG-543	Ccee	1+	1+		1+	4+	4+	4+	1+	4+	4+
SG-549	Ccee	1+	3+	3+	3+	4+	4+	3+	[+/-]	4+	4+
SG-594	Ccee	2+	2+	[+/-]	1+	4+	4+	4+	1+	4+	4+
SG-600	Ccee	1+	1+/2+	3+	2+	4+	4+	4+	[-]	4+	4+
SG-403	Ccee	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	[-]	3+	3+
SG-372	Ccee	[-]	[-]		3+	3+	2+	[-]	2+	2+	[-]
SG-386	Ccee	[-]		[-]	1+	2+	2+	2+	2+	2+	[-]
SG-402	Ccee	1+	1+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
SG-407	Ccee	[-]		[-]	2+	3+	2+	[-]	[-]	3+	[-]
SG-425	CcEE	2+	2+		3+						
SG-431	Ccee	3+			3+						
SG-435	ccEe	3+			3+	3+	[-]	3+	3+	3+	3+
SG-436	CcEe	3+	3+		3+	3+	[-]	3+	3+	3+	3+
SG-437	CcEe	3+	4+		3+	[-]	4+	4+	4+	3+	3+
SG-457	ccEe	1+	1+		2+						
SG-518	Ccee	1+	3+	3+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	3+
SG-541	ccEe	[-]	[-]	[+/-]	2+						
SG-548	Ccee		1+		2+	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]	[+/-]
SG-565	CCee	1+		2+	2+	4+	4+	3+	3+	3+	1+
SG-566	Ccee	[-]	3+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
SG-634	ccEE	3+	3+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
SG-625	Ccee	3+		3+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
SG-392	ccce	[-]	[-]	[+/-]	1+						
SG-377	Ccee	[-]	[+/-]	[+/-]	1+	1+/2+	1+/2+	1+	1+	1+/2+	1+
SG-385	Ccee	[-]	[-]	[-]	[-]	1+	1+	[-]	1+	1+	[-]
SG-421	Ccee	[+/-]	[-]		2+	3+	3+	[-]	[-]	3+	[-]
SG-422	Ccee	[-]	[-]	[-]	2+	2+	2+	[-]	[-]	2+	[-]
SG-441	Ccee	[-]	[+/-]		2+	2+	2+	2+	2+	2+	[+/-]
SG-445	Ccee	[-]	[+/-]	[-]	1+	1+	[+/-]	[-]	[-]	[+/-]	[-]
SG-468	Ccee	[-]	[-]	[-]	1+	1+	1+	[-]	[-]	1+	[-]
SG-498	Ccee	[-]	[-]	[-]	[+/-]	1+	[-]	[-]	[-]	1+	[-]
SG-510	Ccee	[-]	[-]	[-]	1+	1+	[+/-]	[-]	[-]	1+	[-]
SG-540	Ccee	[-]	[-]	[-]	1+						

Πίνακας 13. Ορολογικός έλεγχος Rhesus των 140 Du+ δειγμάτων

Α.Α.	ΦΑΙΝΟΤΥ- ΠΟΣ RhCE	ΠΛΑΚΑ	ΤΥΒΕ	ΚΑΡΤΑ ΓΕΛΗΣ	ΙΑΤ (Du)	ID-Partial RhD (BIO-RAD)					
						1	2	3	4	5	6
SG-554	Ccee	[-]		[-]	1+	1+	2+	[+/-]	[+/-]	2+	[-]
SG-591	Ccee	[-]	[-]	3+	1+	1+/2+	1+	[+/-]	[+/-]	1+	[-]
SG-613	Ccee	[-]	[-]	[-]	1+	1+	[-]	[-]	[-]	1+	[-]
SG-616	Ccee	[-]	[-]	[-]	2+	1+	[-]	[-]	[-]	1+	[-]
SG-624	Ccee	[-]			3+	1+	[+/-]	[-]	[-]	2+	[-]
SG-626	Ccee	[-]	[-]	[-]	2+	2+	[+/-]	[+/-]	[+/-]	2+	[-]
SG-629	Ccee	[-]	[-]	[-]	1+	1+	[+/-]	[-]	[-]	1+	[-]
SG-427	ccee	1+/2+	1+/2+	2+/3+	3+	4+	3+	3+	3+	3+	3+
SG-497	ccee	2+	2+/3+	1+/2+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+
SG-361	Ccee	[-]		2+	2+	4+	4+	3+	3+	4+	3+
SG-362	Ccee	[-]	[-]	2+/3+	2+	4+	4+	2+	4+	3+	4+
SG-366	Ccee	[+/-]	[-]	2+	1+	3+	4+	[+/-]	3+	4+	[+/-]
SG-369	Ccee	[-]	1+/2+	3+	1+	4+	4+	2+	4+	4+	4+
SG-371	Ccee	[-]	1+	3+	2+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
SG-374	Ccee	[-]	1+/2+	1+	1+	4+	4+	3+	4+	4+	4+
SG-375	Ccee	[-]	[-]	[-]	1+	4+	4+	2+	3+	3+	2+
SG-389	Ccee	1+	1+/2+	2+/3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+
SG-398	Ccee	1+		2+	2+	3+	3+	2+	3+	3+	2+
SG-400	Ccee	2+		2+	2+	3+	3+	2+	3+	3+	3+
SG-401	Ccee	2+		2+	2+						
SG-404	Ccee	[-]		[-]	[-]						
SG-412	Ccee	2+			2+	3+	4+	2+	3+	3+	2+
SG-413	Ccee	2+	1+	3+	3+	4+	4+	3+	4+	4+	3+
SG-415	Ccee	[-]	1+	1+	3+	3+	3+	[-]	3+	3+	1+
SG-420	Ccee	[-]		3+	3+	4+	3+	2+	4+	4+	2+
SG-423	Ccee	[-]		2+/3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	[+/-]
SG-440	Ccee	[-]	1+	2+/3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	2+
SG-443	Ccee	2+	2+/3+	3+	3+						
SG-454	Ccee	[-]	1+	3+	1+	4+	4+	2+	4+	4+	2+
SG-461	Ccee	[-]	1+/2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	1+
SG-467	Ccee	2+	2+	3+	1+	3+	3+	2+	3+	3+	[+/-]
SG-471	Ccee	1+		3+	1+	4+	4+	2+	4+	4+	1+
SG-472	Ccee	[-]	1+	3+	3+	3+	2+	2+	3+	3+	[-]
SG-490	Ccee	2+	3+		3+/4+	4+	4+	3+	3+	3+	3+
SG-491	Ccee	[-]	[-]	1+/2+	1+	4+	2+	3+	4+	4+	1+
SG-495	Ccee	1+	1+	3+	3+	3+	2+/3+	2+	3+	3+	1+
SG-501	Ccee	2+		2+	3+/4+	3+	3+	2+	3+	3+	1+
SG-511	Ccee	[+/-]	1+/2+	3+	3+	4+	3+	[+/-]	[+/-]	4+	[+/-]
SG-512	Ccee	1+	1+/2+	1+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	[+/-]
SG-521	Ccee	1+	2+	1+	3+	4+	4+	3+	3+	4+	3+
SG-524	Ccee	[-]	[+/-]	1+	3+	4+	4+	2+	2+	2+	2+
SG-529	Ccee	[+/-]	2+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SG-532	Ccee	1+	1+	1+/2+	1+	3+	3+	3+	2+	2+	1+

Πίνακας 13. Ορολογικός έλεγχος Rhesus των 140 Du+ δειγμάτων

Α.Α.	ΦΑΙΝΟΤΥ- ΠΟΣ RhCE	ΠΛΑΚΑ	ΤΥΒΕ	ΚΑΡΤΑ ΓΕΛΗΣ	ΙΑΤ (Du)	ID-Partial RhD (BIO-RAD)					
						1	2	3	4	5	6
SG-537	Csee	[-]	[-]	3+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	2+
SG-538	Csee	[-]	1+	[+/-]	3+	4+	4+	4+	4+	4+	1+
SG-539	Csee	1+	1+	1+	2+	3+	3+	2+	3+	3+	1+
SG-542	Csee	1+	1+	1+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	[+/-]
SG-544	CCee	[-]	[-]	1+/2+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	1+
SG-546	Csee	1+	1+	2+/3+	3+	3+	2+/3+	2+	2+/3+	3+	3+
SG-547	Csee	1+	1+	2+	3+	3+	3+	2+	4+	4+	4+
SG-560	Csee	[-]	[-]	2+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	1+/2+
SG-567	Csee	[+/-]	1+	[+/-]	2+	3+	1+	[-]	2+	4+	[-]
SG-575	Csee	1+	1+	2+		3+	3+	3+	3+	3+	2+
SG-579	Csee	3+	[+/-]	3+	3+	4+	4+	3+	3+	3+	1+
SG-586	Csee	1+	1+	1+/2+	3+	3+	3+	[+/-]	[+/-]	[+/-]	[+/-]
SG-587	Csee	1+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SG-596	Csee	[-]	1+/2+	3+	2+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
SG-598	Csee	[-]	[-]		3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SG-603	Csee		2+/3+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SG-610	Csee	1+	2+		2+						
SG-611	Csee	[-]	2+	2+	3+	3+	3+	2+	3+	4+	1+
SG-622	Csee	1+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SG-627	Csee	[-]	[-]		1+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SG-636	Csee	[-]	1+	1+	3+	4+	4+	1+	4+	4+	[+/-]
SG-641	Csee	[-]	[-]	[-]	2+						
SG-370	Csee	1+	1+		2+	4+	4+	3+	4+	4+	4+
SG-381	Csee	[+/-]	[+/-]	1+/2+	1+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SG-388	CCee	[-]	[-]	3+	2+	3+	4+	1+	4+	4+	1+
SG-406	Csee	1+		2+	2+	3+	4+	3+	4+	4+	3+
SG-450	Csee	[-]	1+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+
SG-477	Csee	1+	2+	3+	3+	4+	4+	4+	2+	4+	2+
SG-478	Csee	[-]	[-]		3+	3+	3+	2+	4+	3+	[-]
SG-484	Csee	1+		1+	1+	4+	4+	4+	4+	4+	3+
SG-504	Csee	3+	2+/3+	3+	3+	4+	1+	3+	4+	3+	4+
SG-523	Csee	[+/-]	[+/-]	3+	1+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SG-555	Csee	[-]	2+	4+	4+	3+	4+	2+	4+	4+	4+
SG-563	Csee	[+/-]	1+		3+	4+	4+	4+	4+	4+	2+
SG-570	Csee	1+	1+		2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SG-571	ccEe	[-]	[-]		2+	3+	3+	1+	2+	3+	2+
SG-609	Csee	[+/-]	1+		3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SG-621	Csee	[+/-]	1+/2+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	2+
SG-638	Csee	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SG-639	Csee	[+/-]	2+/3+	2+/3+	4+	3+	4+	3+	4+	4+	2+
SG-408	ccee	[-]	2+	3+	4+	3+	3+	[-]	3+	4+	3+
SG-564	ccee	[+/-]	1+	2+	2+	4+	3+	[-]	2+	3+	[+/-]
SG-396	ccEe	[-]	[+/-]	[-]	3+	3+	3+	[-]	[-]	3+	[-]

Πίνακας 13. Ορολογικός έλεγχος Rhesus των 140 Du+ δειγμάτων

Α.Α.	ΦΑΙΝΟΤΥ- ΠΟΣ RhCE	ΠΛΑΚΑ	ΤΥΒΕ	ΚΑΡΤΑ ΓΕΛΗΣ	ΙΑΤ (Du)	ID-Partial RhD (BIO-RAD)					
						1	2	3	4	5	6
SG-419	ccEe	[+/-]	[+/-]		1+	3+	2+	[-]	[-]	3+	[-]
SG-451	ccEe	[-]	[-]	[-]	2+	3+	3+	[-]	[-]	3+	[-]
SG-452	ccEe	[-]	[-]	[-]	[+/-]						
SG-456	ccEe	[-]	[-]	3+	3+	3+	3+	[-]	1+	3+	[-]
SG-465	ccEe	[-]	[-]	2+	2+	3+	3+	[-]	1+	4+	[-]
SG-480	CcEe	[-]	[+/-]		2+	2+	1+	[-]	[-]	3+	[-]
SG-509	ccEe	[-]	[-]	[-]	2+	2+	2+	[-]	[-]	2+	[-]
SG-515	ccEe	[-]	[-]	[-]	3+	2+	2+	1+	[-]	3+	[-]
SG-522	CcEe	[-]		[-]	1+	3+	2+	[-]	1+	3+	1+
SG-531	ccEe	[-]	1+	[-]	1+	3+	3+	[-]	2+	2+	1+
SG-557	ccEe	[-]	[-]		3+	3+	2+	1+	1+	[+/-]	[+/-]

Πίνακας 14. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και οι παραλλαγές του RHD στους 47 αιμοδοτές και στους 93 ασθενείς.

	A.A.	ΦΥΛΟ	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΟΜΑΔΑ ABO	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	Weak D/Partial D
1	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	D cat Va type2, Va, V type 7, DCS
2	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	D cat Va type2, Va, V type 7, DCS
3	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	D cat Va type2, Va, V type 7, DCS
4	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	D cat Va type2, Va, V type 7, DCS
5	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	D cat Va type2, Va, V type 7, DCS
6	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	D cat Va type2, Va, V type 7, DCS
7	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	D cat VII
8	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	D cat VII
9	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	D cat VII
10	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	D cat VII
11	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2	Ccee	D cat VII
12	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	D cat VII
13	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1B	Ccee	D cat VII
14	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	D cat VII
15	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	D cat VII
16	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	D-positive
17	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΡΩΣΙΚΗ	A1	Ccee	D-positive
18	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	D-positive
19	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	D-positive
20	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	CcEe	D-positive
21	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	D-positive
22	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	ccEe	D-positive
23	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	CcEe	D-positive
24	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	CcEe	D-positive
25	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	ccEe	D-positive
26	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	D-positive
27	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	ccEe	D-positive

	A.A.	ΦΥΛΟ	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΟΜΑΔΑ ΑΒΟ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	Weak D/Partial D
28	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	D-positive
29	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	D-positive
30	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	D-positive
31	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2	ccEE	D-positive
32	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	DFR type 1+2
33	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	ccee	RHD-CE(4-7)-D
34	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	RHD(M295I)
35	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	RHD(M295I)
36	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	RHD(M295I)
37	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2	Ccee	RHD(M295I)
38	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	RHD(M295I)
39	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2	Ccee	RHD(M295I)
40	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	RHD(M295I)
41	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	RHD(M295I)
42	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1B	Ccee	RHD(M295I)
43	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΣΥΡΙΑ	O	Ccee	RHD(M295I)
44	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	RHD(M295I)
45	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	RHD(M295I)
46	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	RHD(M295I)
47	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2	Ccee	RHD(M295I)
48	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	RHD(M295I)
49	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	RHD(M295I)
50	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	RHD(M295I)
51	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	ccee	weak D 4.0,4.1
52	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	ccee	weak D 4.0,4.1
53	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
54	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΑΛΒΑΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
55	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
56	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	weak D type 1

	A.A.	ΦΥΛΟ	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΟΜΑΔΑ ΑΒΟ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	Weak D/Partial D
57	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
58	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2	Ccee	weak D type 1
59	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΟΥΓΓΑΡΙΑ	A1	Ccee	weak D type 1
60	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
61	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
62	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
63	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	weak D type 1
64	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
65	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2	Ccee	weak D type 1
66	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΡΩΣΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
67	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
68	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΚΑΖΑΚΣΤΑΝ	A1	Ccee	weak D type 1
69	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
70	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
71	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
72	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
73	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
74	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
75	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
76	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2	Ccee	weak D type 1
77	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
78	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
79	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
80	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
81	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
82	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2	Ccee	weak D type 1
83	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1B	Ccee	weak D type 1
84	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
85	ΑΣΘΕΝΗΣ	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1

		A.A.	ΦΥΛΟ	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΟΜΑΔΑ ΑΒΟ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	Weak D/Partial D
86	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-532	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
87	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-537	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
88	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-538	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
89	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-539	ΑΡΡΕΝ	ΠΟΛΩΝΙΑ	A2	Ccee	weak D type 1
90	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-542	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	weak D type 1
91	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-544	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	CCee	weak D type 1
92	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-546	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	weak D type 1
93	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-547	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2	Ccee	weak D type 1
94	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-560	ΘΗΛΥ	ΑΙΓΥΠΤΟΣ	O	Ccee	weak D type 1
95	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-567	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
96	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-575	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
97	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-579	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
98	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-586	ΑΡΡΕΝ	ΠΑΚΙΣΤΑΝ	B	Ccee	weak D type 1
99	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-587	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2B	Ccee	weak D type 1
100	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-596	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
101	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-598	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2B	Ccee	weak D type 1
102	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-603	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
103	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-610	ΘΗΛΥ	ΛΕΤΟΝΙΑ		Ccee	weak D type 1
104	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-611	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	weak D type 1
105	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-622	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
106	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-627	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 1
107	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-636	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 1
108	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-641	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	weak D type 1
109	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-370	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 3
110	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-381	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 3
111	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-388	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	CCee	weak D type 3
112	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-406	ΘΗΛΥ	ΟΥΖΜΠΕΚΙΣΤΑΝ	A1	Ccee	weak D type 3
113	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-450	ΑΡΡΕΝ	ΑΛΒΑΝΙΚΗ	A2B	Ccee	weak D type 3
114	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-477	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 3

		A.A.	ΦΥΛΟ	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΟΜΑΔΑ ΑΒΟ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	Weak D / Partial D
115	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-478	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 3
116	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-484	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	Ccee	weak D type 3
117	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-504	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 3
118	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-523	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2	Ccee	weak D type 3
119	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-555	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 3
120	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-563	ΘΗΛΥ	ΟΥΚΡΑΝΙΑ	O	Ccee	weak D type 3
121	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-570	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 3
122	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-609	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 3
123	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-621	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	Ccee	weak D type 3
124	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-638	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 3
125	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-639	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	Ccee	weak D type 3
126	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-408	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	ccee	weak D type 4.2.1,4.2.2
127	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-564	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	ccee	Weak D type 4.2.1,4.2.2
128	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-396	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	ccEe	weak D type 5
129	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-419	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	ccee	weak D type 5
130	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-451	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	ccEe	weak D type 5
131	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-452	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1B	ccEe	weak D type 5
132	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-456	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2	ccEe	weak D type 5
133	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-465	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1B	ccEe	weak D type 5
134	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-480	ΑΡΡΕΝ	ΙΣΡΑΗΛ	A1	CcEe	weak D type 5
135	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-509	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	ccEe	weak D type 5
136	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-515	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	ccEe	weak D type 5
137	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-522	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	O	ccEe	weak D type 5
138	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-531	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A1	ccEe	weak D type 5
139	ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ	SG-557	ΑΡΡΕΝ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	A2	ccEe	weak D type 5
140	ΑΣΘΕΝΗΣ	SG-571	ΘΗΛΥ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	B	ccEe	weak D type 5

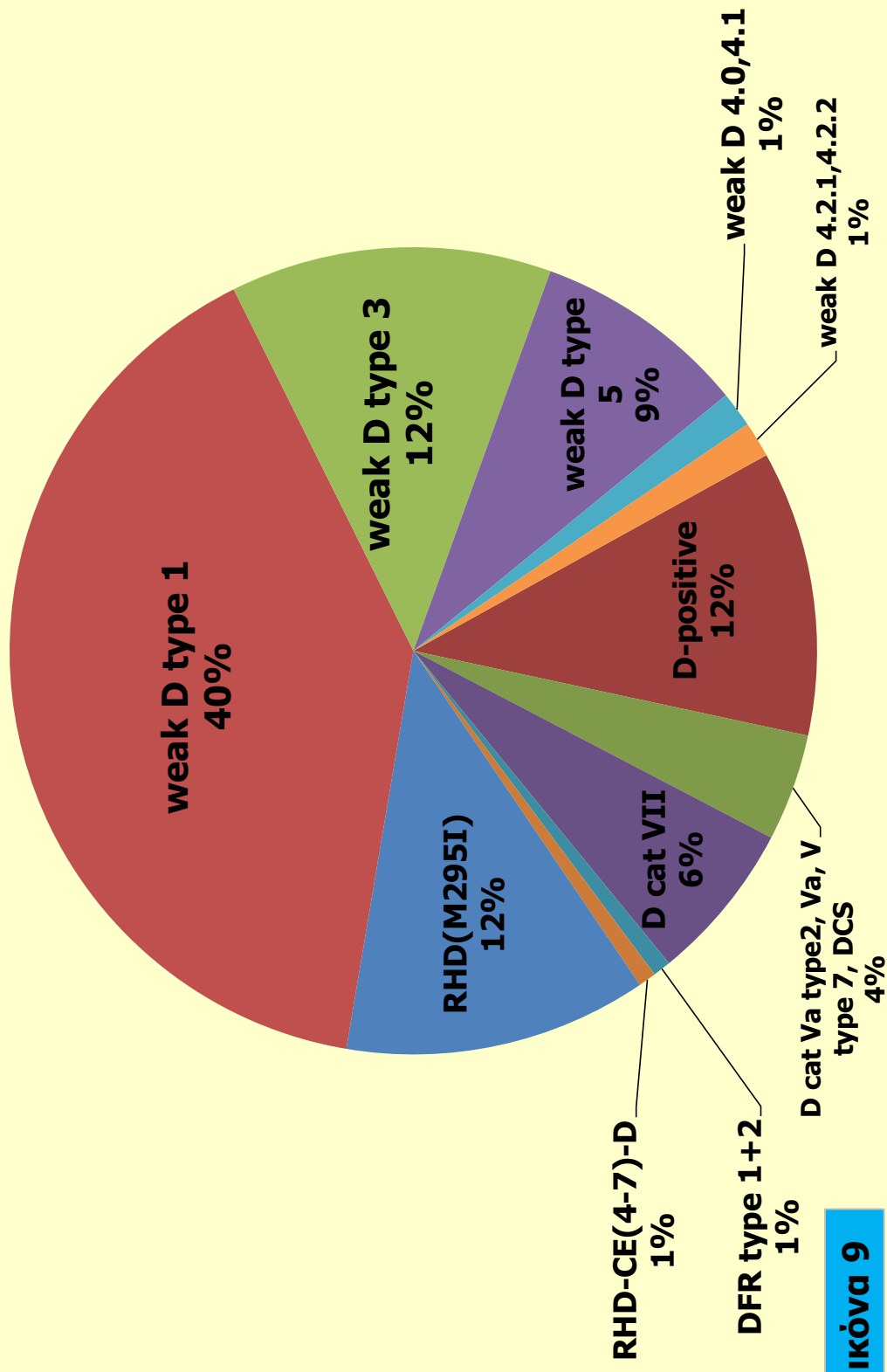
Πίνακας 15. Οι παραλλαγές του RHD όπως ταυτοποιήθηκαν από τα χρησιμοποιούμενα kit ελέγχου. Το ποσοστό κάθε παραλλαγής υπολογίστηκε επί του συνόλου των 140 δειγμάτων.

		Αιμοδότες	Ασθενείς	Σύνολο (%)
Weak D	weak D type 1	23	33	56 (40,00)
	weak D type 3	3	14	17 (12,14)
	weak D type 4.0,4.1	0	2	2 (1,43)
	weak D type 4.2.1,4.2.2	0	2	2 (1,43)
	weak D type 5	6	7	13 (9,29)
Partial D	D cat Va type2, Va, V type 7, DCS	1	5	6 (4,29)
	D cat VII	0	9	9 (6,43)
	DFR type 1+2	0	1	1 (0,71)
DEL	weak type 11 [RHD(M295I)] Ccee	9	8	17 (12,14)
Υβριδικά RHD-CE-D	RHD-CE(4-7)-D	0	1	1 (0,71)
Απροσδιόριστες παραλλαγές του RHD	D-positive	5	11	16 (11,43)
	Σύνολο	47	93	140 (100)

Πίνακας 16. Οι παραλλαγές του RHD σε αιμοδότες και ασθενείς ελληνικής καταγωγής. Το ποσοστό κάθε παραλλαγής υπολογίστηκε επί του συνόλου των 126 δειγμάτων.

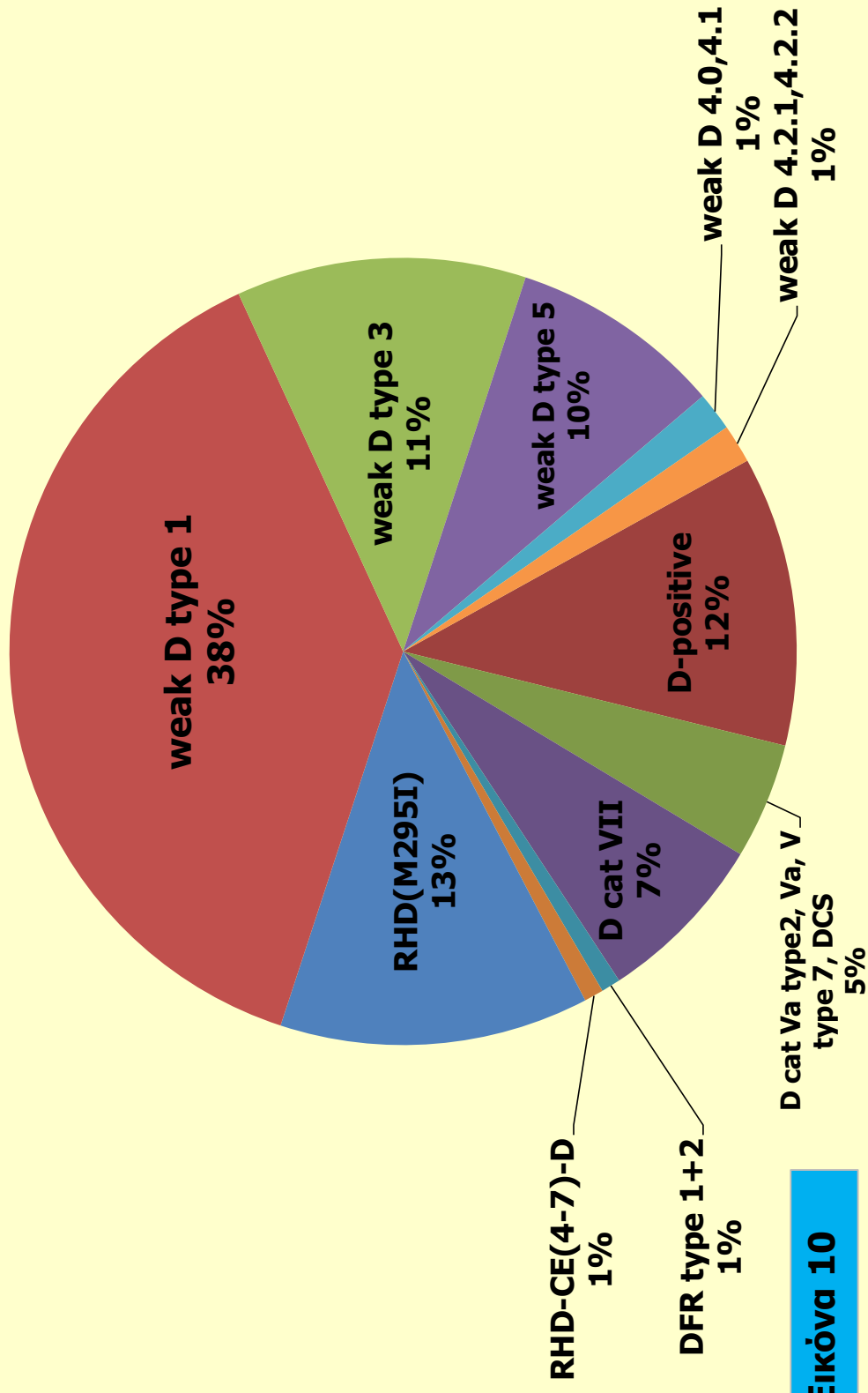
		Αιμοδότες	Ασθενείς	Σύνολο (%)
Weak D	weak D type 1	23	25	48 (38,09)
	weak D type 3	2	12	14 (11,11)
	weak D type 4.0,4.1	0	2	2 (1,59)
	weak D type 4.2.1,4.2.2	0	2	2 (1,59)
	weak D type 5	5	7	12 (9,52)
Partial D	D cat Va type2, Va, V type 7, DCS	1	5	6 (4,76)
	D cat VII	0	9	9 (7,14)
	DFR type 1+2	0	1	1 (0,80)
DEL	weak type 11 [RHD(M295I)] Ccee	8	8	16 (12,70)
Υβριδικά RHD-CE-D	RHD-CE(4-7)-D	0	1	1 (0,80)
Απροσδιόριστες παραλλαγές του RHD	D-positive	5	10	15 (11,90)
	Σύνολο	44	82	126 (100)

Κατανομή των παραλλαγών του RHD σε Du(+)



Εικόνα 9

**Κατανομή των παραλλαγών του RHD σε Du(+)
ελληνικής καταγωγής**



Εικόνα 10

3.2 Κατανομή RHD αλληλομόρφων σε Du(-) αιμοδοτές με C ή/και E

Στον πίνακα 17 παρουσιάζονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά, ο ορολογικός έλεγχος ως προς το σύστημα ABO και Rhesus των 112 αιμοδοτών (71 άνδρες/41 γυναίκες) τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως Rhesus D(-) και Du(-) με C ή/και E, καθώς επίσης και η ανίχνευση των εξωνίων κατά το μοριακό έλεγχο. Οι 101 αιμοδοτές είχαν ελληνική καταγωγή ενώ οι υπόλοιποι 11 ήταν αλλοδαποί.

Πίνακας 17. Αιμοδοτές RhD(-) με C ή/και E.

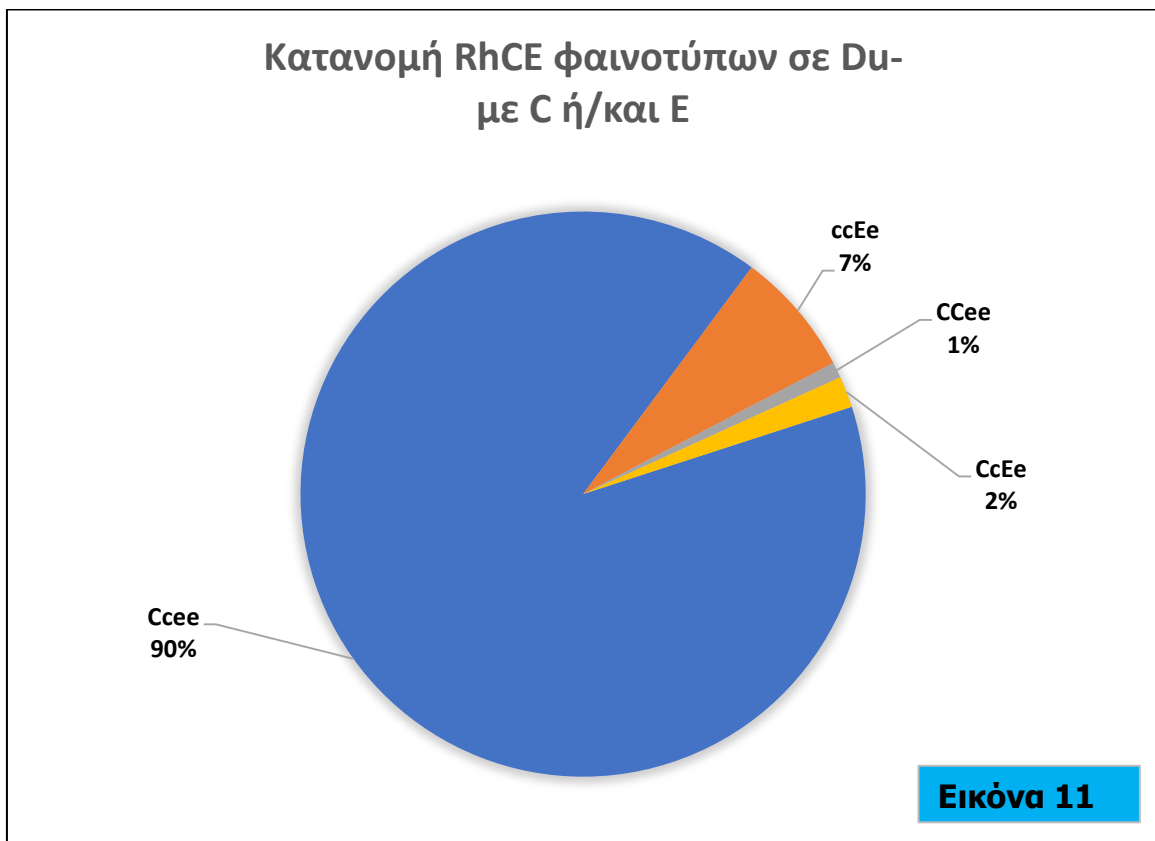
	Κωδικός δείγματος	ΟΜΑΔΑ ABO	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ RhCE	ΦΥΛΟ	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΕΧΩΝS (1,4,7,10)
1	L-1	A1B	Ccee	άρρεν	ΑΛΒΑΝΙΑ	[-]
2	L-2	O	ccEe	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
3	L-4	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
4	L-5	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
5	L-6	B	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
6	L-7	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
7	L-8	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
8	L-9	O	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
9	L-10	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
10	L-11	A2	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
11	L-12	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
12	L-13	A1	Ccee	θήλυ	ΓΕΩΡΓΙΑ	1,10
13	L-14	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
14	L-15	B	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
15	L-16	B	ccEe	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
16	L-17	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
17	L-20	A1B	Ccee	θήλυ	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	[-]
18	L-21	B	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
19	L-22	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
20	L-23	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
21	L-24	A1B	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
22	L-25	O	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
23	L-26	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	10
24	L-27	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
25	L-28	A2	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
26	L-29	O	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
27	L-30	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
28	L-31	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]

	Κωδικός δείγματος	ΟΜΑΔΑ ΑΒΟ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ RhCE	ΦΥΛΟ	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΕΧΩΝΣ (1,4,7,10)
29	L-32	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
30	L-33	A2	Csee	θήλυ	ΓΕΩΡΓΙΑ	[-]
31	L-34	A2	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
32	L-35	A1	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	10
33	L-36	A1B	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
34	L-37	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
35	L-38	B	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
36	L-39	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
37	L-40	O	Csee	άρρεν	ΑΛΒΑΝΙΑ	[-]
38	L-41	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
39	L-42	A1	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
40	L-43	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
41	L-44	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
42	L-45	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
43	L-46	A2	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
44	L-47	B	Csee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
45	L-48	B	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
46	L-49	O	Csee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
47	L-50	A1	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
48	L-51	O	Csee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
49	L-52	A1	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
50	L-53	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
51	L-54	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
52	L-55	O	Csee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
53	L-56	O	ccEe	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
54	L-57	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
55	L-58	O	Csee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
56	L-59	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
57	L-60	A1	ccEe	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
58	L-61	A1	Csee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
59	L-62	O	Csee	θήλυ	ΑΛΒΑΝΙΑ	[-]
60	L-63	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
61	L-64	O	Csee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
62	L-79	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
63	L-81	O	CCee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
64	L-85	O	Csee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
65	L-86	A1	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
66	L-89	O	CcEe	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]

	Κωδικός δείγματος	ΟΜΑΔΑ ABO	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ RhCE	ΦΥΛΟ	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΕΧΩΝΣ (1,4,7,10)
67	L-93	A1B	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	1,4,7,10
68	L-94	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
69	L-95	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
70	L-96	B	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
71	L-97	A1	ccEe	θήλυ	ΚΑΝΑΔΑΣ	[-]
72	L-98	A2	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
73	L-102	O	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
74	L-105	A1	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
75	L-106	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	1,4,7,10
76	L-108	O	Ccee	θήλυ	ΑΛΒΑΝΙΑ	[-]
77	L-109	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
78	L-111	A2	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
79	L-112	B	ccEe	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
80	L-114	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	1,10
81	L-116	O	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
82	L-119	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
83	L-120	A1	ccEe	άρρεν	ΛΙΒΑΝΟΣ	[-]
84	L-121	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
85	L-122	A2	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
86	L-130	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
87	L-131	B	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
88	L-132	O	ccEe	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
89	L-141	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
90	L-142	A2	Ccee	άρρεν	ΑΛΒΑΝΙΑ	[-]
91	L-150	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
92	L-154	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
93	L-155	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	1,4,7,10
94	L-156	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
95	L-161	O	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
96	L-162	O	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
97	L-165	B	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
98	L-171	B	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
99	L-172	A1	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
100	L-173	O	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
101	L-174	B	CcEe	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
102	L-175	A1	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
103	L-181	B	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
104	L-183	O	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]

	Κωδικός δείγματος	ΟΜΑΔΑ ABO	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ RhCE	ΦΥΛΟ	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΕΧΩΝΣ (1,4,7,10)
105	L-185	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
106	L-186	A2	Csee	θήλυ	ΓΕΩΡΓΙΑ	1,10
107	L-187	A1	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
108	L-192	O	Csee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
109	L-194	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
110	L-195	O	Csee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
111	L-199	O	Csee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]
112	L-213	O	Csee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	[-]

Η εικόνα 11 δείχνει την κατανομή των φαινοτύπων RhCE σε όλους τους αιμοδότες της μελέτης ενώ ο Πίνακας 18 τη συσχέτιση του RhCE με τα θετικά δείγματα.

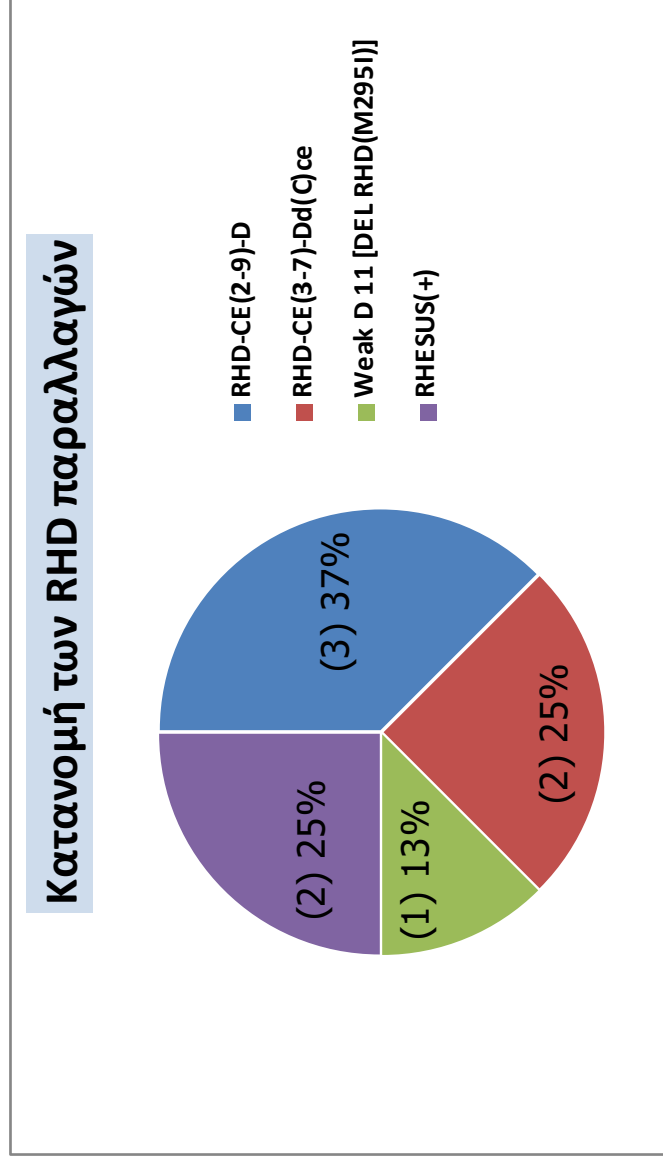


Πίνακας 18.

Φαινότυποι RhCE	Αριθμός δειγμάτων	
	Ελέγχθηκαν	PCR-SSP (+)
Ccee	101	8
ccEe	8	0
CCee	1	0
CcEe	2	0
ΣΥΝΟΛΟ	112	8

Στον πίνακα 19 αναλύονται τα 8 θετικά με PCR-SSP δείγματα και φαίνεται η τυποποίηση της παραλλαγής του RHD γονιδίου η οποία έγινε με τα kit RBC-Ready Gene D weak kit και RBC-Ready Gene CDE kit της εταιρείας INNOTRAIN. Τα 2 δείγματα τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως RHD(+) πιθανότατα έχουν σπάνιους πολυμορφισμούς οι οποίοι δεν προσδιορίζονται με τα συγκεκριμένα kit και απαιτούν περαιτέρω ανάλυση με sequencing. Από τα τυποποιημένα 6 δείγματα το ένα ανήκε στην κατηγορία Weak D type 11 με φαινότυπο DEL λόγω της συνύπαρξης με το φαινότυπο Ccee και τα 5 ήταν υβριδικά γονίδια RHD-CE-D. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι 6 στους 101 αιμοδότες Du(-) ελληνικής καταγωγής ήταν θετικοί με PCR-SSP, ποσοστό 5,94%.

Κωδικός Δείγματος	ΟΜΑΔΑ ΑΒΟ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ RhCE	ΦΥΛΟ	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΕΞΩΝΙΑ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	
						RHD	RHCE
L-13	A1	Ccee	θήλυ	ΓΕΩΡΓΙΑ	1,10	RHD-CE(2-9)-D	Ccee
L-26	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	10	RHD-CE(3-7)-Dd(C)ce	ccee
L-35	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	10	RHD-CE(3-7)-Dd(C)ce	ccee
L-93	A1B	Ccee	θήλυ	ΕΛΛΑΔΑ	1,4,7,10	Weak D 11 [DEL RHD(M295I)]	Ccee
L-106	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	1,4,7,10	RHESUS(+)	Ccee
L-114	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	1,10	RHD-CE(2-9)-D	Ccee
L-155	A1	Ccee	άρρεν	ΕΛΛΑΔΑ	1,4,7,10	RHESUS(+)	Ccee
L-186	A2	Ccee	θήλυ	ΓΕΩΡΓΙΑ	1,10	RHD-CE(2-9)-D	Ccee



Πίνακας 19.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στην εργασία του Van Sandt και των συνεργατών του (Transfusion, 2014)⁴⁴ περιλαμβάνεται ο παρακάτω πίνακας ο οποίος συγκρίνει τα ποσοστά των συχνότερων τύπων weak D σε διάφορους πληθυσμούς.

TABLE 3. Overview of comparable studies with more than 30 samples included

Study	Provenience	Type all	Weak D*			Type others	Highest weak D type ID-number observed	Reference
			Type 1	Type 2	Type 3			
1	Germany, Southwest	159	95 (59.7)	43 (27.0)	7 (4.4)	14	16	Wagner et al. ²³
2	Australia	89	38 (42.7)	48 (53.9)	3 (3.4)	n.a.	3	Cowley et al. ²⁴
3	Austria, Tyrol	130	43 (33.1)	10 (7.7)†	65 (50.0)†	12	14	Müller et al. ²⁵
4	Germany, North	260	169 (65.0)†	44 (16.9)	45 (17.3)	2	21	Müller et al. ²⁵
5	France	68	30 (44.1)	21 (30.9)	3 (4.4)	14	39	Ansart-Pirenne et al. ²⁶
6	Canada, Ontario	32	16 (50.0)	8 (25.0)	1 (3.1)	7	5	Denomme et al. ²⁷
7	Czech Republic	169	98 (58.0)	17 (10.1)	33 (19.5)	21	NA	Araujo et al. ²⁸
8	Portugal	99	16 (16.2)†	63 (63.6)†	14 (14.1)	6	4	Araujo et al. ²⁸
9	Spain, Catalonia	43	21 (48.8)	14 (32.6)	4 (9.3)	4	4	Araujo et al. ²⁸
10	France, West	230	93 (40.4)	63 (27.4)	11 (4.8)	63	43	Le Marechal et al. ²⁹
11	Austria, North	128	72 (56.3)	29 (22.7)	19 (14.8)	8	49	Polin et al. ³⁰
12	France, South	141	37 (26.2)	59 (41.8)	4 (2.8)†	41	61	Silvy et al. ³¹
13	Argentina	55	21 (38.2)	9 (16.4)	8 (14.5)	17	59	Brajovich et al. ³²
14	Belgium, Flanders	495	265 (53.5)	146 (29.5)	13 (2.6)	71	17	This study
	Total	2098	1014 (48.3)	574 (27.4)	230 (11.0)	280		

* Data are reported as number (%).
† Highest and lowest percentages of the observed weak D type alleles of the listed studies, respectively.

Στην παρούσα μελέτη σχολιάζοντας τα αποτελέσματα του πίνακα 16, ο οποίος αφορά άτομα ελληνικής καταγωγής, βλέπουμε ότι ο τύπος weak D type 1 είναι ο συχνότερος (38,1%) όπως και στους περισσότερους Ευρωπαίους (εξαιρείται η Πορτογαλία). Ακολουθεί ο weak D type 3 (11,1%) ενώ δεν ανιχνεύτηκε weak D type 2, ο οποίος σε άλλους ευρωπαϊκούς λαούς μπορεί να κυμαίνεται από 7,7 έως και 63,6%. Αντιθέτως στους Έλληνες παρουσιάζεται ένα σημαντικό ποσοστό 9,52% του τύπου weak D type 5, ο οποίος στα 11 από τα 12 τυποποιημένα δείγματα συνοδεύονταν από το RhCE φαινότυπο ccEe. Συνολικά 78 στα 126 δείγματα αφορούσαν weak D πολυμορφισμούς (61,9%) και 15/126 (11,9%) Partial D. Ανιχνεύτηκε ένα μόνο υβριδικό γονίδιο RHD-CE-D (0,8%) ενώ σημαντικό ήταν το ποσοστό του 12,7% των δειγμάτων (16/126) τα οποία τυποποιήθηκαν ως weak D type 11, αλλά κατατάσσονται στις παραλλαγές DEL διότι έχοντας φαινότυπο Ccee στο RhCE εκφράζουν πολύ μικρό αριθμό πρωτεϊνικών μορίων RhD στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη (<30). Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα 15 από τα 126 δείγματα (11,9%), τα οποία δεν μπόρεσαν να καταταχθούν

σε κάποια από τις παραλλαγές οι οποίες προσδιορίζονται από τα χρησιμοποιούμενα kit, παρότι πληρούσαν τα κριτήρια του ορολογικού ελέγχου προκειμένου να εξεταστούν με μοριακές τεχνικές. Για το αν ανήκουν ή όχι σε κάποια σπάνια ή νέα (μη καταγεγραμμένη) παραλλαγή του RHD απαιτείται έλεγχος με sequencing.

Οι διαφορές της συγκεκριμένης μελέτης της συχνότητας των παραλλαγών του RHD σε άτομα αμιγώς ελληνικής καταγωγής σε σχέση με δημοσιευμένες εργασίες οι οποίες αφορούν άλλους λαούς, μπορεί να οφείλεται σε περιφερειακές διαφοροποιήσεις στη χώρα μας, η οποία βρίσκεται σχετικά μακριά από την κεντρική Ευρώπη από όπου και οι περισσότερες καταγραφές, και δεδομένου ότι δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία από τα κοντινά στην Ελλάδα Βαλκάνια. Αποκλίσεις έχουν παρατηρηθεί και σε άλλους λαούς, όπως στους Παρτογάλους⁴⁵ με 63,6% weak D type 2. Χαρακτηριστικό παράδειγμα όπου κάποιοι πολυμορφισμοί επικρατούν σε μια περιοχή, είναι αυτό της περιοχής του Τυρόλου της Αυστρίας⁴⁶. Ο τύπος weak D type 3 απαντάται σε ποσοστό 50% ενώ στα βόρεια της χώρας μόνο σε ποσοστό 14,8%.

Πολλοί από τους τύπους weak D έχουν σχετικά μικρή μείωση του αριθμού των αντιγόνων D σχετικά με το φυσιολογικό RhD φαινότυπο και έτσι πολλές φορές χαρακτηρίζονται ως RhD+ λόγω της αυξημένης ευαισθησίας των μονοκλωνικών anti-D που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση του D αντιγόνου. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε επίσης να ερμηνεύσει την απόκλιση στις συχνότητες των πολυμορφισμών του RHD στις διάφορες μελέτες.

Οι πολυμορφισμοί ενός γονιδίου, η συχνότητά τους στους διάφορους πληθυσμούς και η κατανομή τους στον Ελλαδικό χώρο (ανεξάρτητα από την εθνικότητα των ατόμων που συμπεριλαμβάνονται σε μια τέτοια μελέτη) έχουν μεγάλη σημασία για τον τρόπο εφαρμογής της μοριακής τυποποίησης του RHD. Για παράδειγμα ο τύπος weak 2 εκφράζει πολύ μικρό αριθμό RhD μορίων στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη (~500), και γι' αυτό ο συγκεκριμένος φαινότυπος θεωρείται ο καταλληλότερος για τον ποιοτικό έλεγχο των anti-D αντιορών. Επειδή αυτά τα μόρια είναι ικανά να προκαλέσουν anti-D αλλοανοσοποίηση³¹ η σωστή ταυτοποίηση των

αιμοδοτών ως RhD+ υπογραμμίζει το ρόλο του μοριακού ελέγχου σε αυτές τις σπάνιες περιπτώσεις.

Γνωρίζοντας ότι ασθενείς με συγκεκριμένους πολυμορφισμούς, όπως οι weak D type 1, 2 και 3, μπορούν να μεταγγιστούν με RhD+ παράγωγα αίματος, ο ακριβής προσδιορισμός και καταχώρηση στον ιατρικό φάκελο του ασθενούς θα εξοικονομήσει πολύτιμα RhD αρνητικά προϊόντα αίματος. Αντιθέτως η αναγνώριση ενός ασκού αίματος ως RHD/CE υβριδίου θα μπορούσε να μεταγγιστεί σε RhD- ασθενή με ασφάλεια αν και ορολογικά μπορεί να χαρακτηρίζεται ως Du+.

Όσον αφορά τους 112 D- αιμοδότες με C+ ή/και E+ οι οποίοι ελέγχθηκαν για την ύπαρξη παραλλαγών του RHD, τα αποτελέσματα συμβαδίζουν με μελέτες σε άλλους πληθυσμούς.^{20,41,49} Από τα 8 RHD θετικά δείγματα τα 5 αντιπροσώπευαν RHD/CE υβρίδια, ως αναμενόταν, 1 ανήκε στην κατηγορία των DEL, ενώ τα υπόλοιπα 2 δείγματα ήταν απροσδιόριστα με τα χρησιμοποιούμενα tests. Το πρόβλημα με αυτά τα δείγματα δεν είναι να χαρακτηριστούν ως ψευδώς RhD- αλλά να διερευνηθεί η πιθανότητα να είναι RhD+. Έχοντας ως δεδομένη, αν κι σπάνια, την ευαισθητοποίηση RhD αρνητικών ασθενών από DEL παράγωγα αίματος^{20,34} αλλά και το γεγονός ότι νέες μεταλλάξεις προστίθενται συνεχώς στη γνώση μας για την ποικιλομορφία του RHD γονιδίου, τα 3 από τα 8 αυτά δείγματα θα μπορούσαν να έχουν κλινική σημασία στη μετάγγιση D- ασθενών.

Αν και οι αιμοδότες στο Νοσοκομείο "Ο Ευαγγελισμός" ελέγχονται με πολύ ευαίσθητες ορολογικές μεθόδους, κάποιοι DEL ή weak D πολυμορφισμοί με πολύ μικρό αριθμό RhD πρωτεϊνών στην επιφάνεια των RBC μπορεί να διαφύγουν ακόμη και με τα αποτελεσματικότερα IgM anti-D. Οι προκαλούμενες από τέτοιες μονάδες αίματος αλλοανοσοποιήσεις σχεδόν ποτέ δεν τεκμηριώνονται διότι η ύπαρξη anti-D σε έναν ασθενή, ειδικότερα με προηγούμενο ιστορικό μεταγγίσεων, συνήθως δεν διερευνάται εξονυχιστικά. Μολονότι έχει αποδειχτεί ότι ακόμα και μερικά mL RhD+ ερυθροκυττάρων μπορούν να οδηγήσουν σε αλλοανοσοποίηση, δεν υπάρχει μέχρι και σήμερα κάποιο "θεσμοθετημένο" χαμηλό όριο συγκέντρωσης RhD αντιγόνων στα RBC το οποίο να θεωρείται ασφαλές προς μετάγγιση σε RhD- ασθενείς. Στις

περιπτώσεις όμως των D- αιμοδοτών με C+ ή/και E+ η τεχνική προσρόφησης-έκλουσης δεν είναι εφικτή στη ρουτίνα του εργαστηρίου. Μια ενδεχόμενη λύση να δίνει η multiplex PCR-SSP τεχνική, η οποία παρουσιάστηκε στην παρούσα μελέτη αν αποδειχτεί cost-effective.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ερυθροκύτταρα με ασθενή έκφραση του RHD είναι λιγότερο ανοσογόνα σε σχέση με τα φυσιολογικά RhD(+) RBCs, αλλά έχουν αναφερθεί περιπτώσεις παραγωγής anti-D. Αν και ως επί τω πλείστον τα παράγωγα αίματος αιμοδοτών με ασθενή έκφραση του RhD σημαίνονται ως D(+), δεν ανιχνεύονται όλοι οι D weak ή Partial αιμοδότες με τις χρησιμοποιούμενες ορολογικές μεθόδους. Είναι πολύ σημαντικό να διερευνηθεί αν οι RhD(-) ασθενείς (πολλώ δε μάλλον αν είναι γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία), οι οποίοι μεταγγίζονται με RhD(-) RBCs παράγουν anti-D αλλοαντισώματα.

Η μοριακή γενετική των ομάδων αίματος και ειδικά του συστήματος Rhesus έχει περιληφθεί στην πρακτική της μεταγγισιοθεραπείας από το 2000 περίπου. Η εισαγωγή της γονοτύπησης του Rhesus σε μαζική κλίμακα, όπως έγινε στην Ελβετία και στην Αυστρία, θα αύξανε μεν το κόστος της μετάγγισης αλλά και την ασφάλεια της. Έγκυες γυναίκες οι οποίες κυοφορούν RhD(-) ή D με συγκεκριμένους πολυμορφισμούς έμβρυα, θα απέφευγαν μέσω προσδιορισμού του RHD γονότυπου αχρείαστες ενέσεις RhIg. Η αποφυγή των RhIg θα μπορούσε επίσης να αποφευχθεί σε έγκυες με συγκεκριμένους τύπους RHD weak. Οι μοριακοί αυτοί έλεγχοι αφενός θα απέτρεπαν ενδεχόμενες παρενέργειες για τη γυναίκα και αφετέρου θα μείωναν το κόστος της εγκυμοσύνης.

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να περιπλέξουν την σωστή τυποποίηση του RhD: οι ποικίλες μέθοδοι screening στα εργαστήρια, τα διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα που παράγονται από τους κατασκευαστές των αντιδραστηρίων, τα οποία μπορεί να αντιδρούν διαφορετικά με τους πολυμορφισμούς του RhD, και ο μεγάλος αριθμός των RHD γονιδίων τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τόσο την έκφραση όσο και τη δομή του RhD μορίου και των επιτόπων του.

Ερυθροκύτταρα στη μεμβράνη των οποίων υπάρχουν weak D ή partial D, ανάλογα με το τύπο τους, θα μπορούσαν να προκαλέσουν την παραγωγή anti-D αντισωμάτων σε έναν RhD(-) λήπτη. Για το λόγο αυτό οι Αιμοδοσίες χρησιμοποιώντας τεχνικές ανίχνευσης και τυποποίησης χαρακτηρίζουν το προϊόν αίματος ως RhD(+). Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ένας

άνθρωπος να καταγραφεί στο σύστημα διαχείρισης αιμοδοτών ως RhD(+), αλλά να χαρακτηριστεί ως RhD(-) στο ίδιο λογισμικό αν εισέλθει στη Μονάδα Υγείας ως ασθενής. Με σκοπό την αποφυγή σύγχυσης μεταξύ των εμπλεκόμενων (ιατρών, νοσηλευτών, τεχνολόγων και του ιδίου του ατόμου), και με τη σκέψη ότι στην εποχή της μοριακής γενετικής μπορούμε να αντιμετωπίσουμε αυτό το πρόβλημα, πρέπει οι πολυμορφισμοί του Rhesus, οι οποίοι οδηγούν σε διαφοροποιημένη έκφραση του D, να γίνουν μέρος του ιατρικού ιστορικού των ασθενών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Patnaik SK, Helmsberg W, Blumenfeld OO.
BGMUT Database of Allelic Variants of Genes Encoding Human Blood Group Antigens. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2014 Oct;41(5):346-51.
2. Levine P, Stetson RE, An unusual case of intra-group agglutination. *Journal of American Medical Association* 1939, 113, 126-7.
3. Frohn C, Dümbgen L, Brand JM, Görg S, Luhm J, Kirchner H. Probability of anti-D development in D- patients receiving D+ RBCs. *Transfusion* 2003; 43:893-8.
4. Gonzalez-Porrás JR, Graciani IF, Perez-Simon JA, Martín-Sánchez J, Encinas C, Conde MP, Nieto MJ, Corral M. Prospective evaluation of a transfusion policy of D+ red blood cells into D- patients. *Transfusion* 2008; 48:1318-24.
5. Kozłowski CL, Lee D, Shwe KH, Love EM. (1995), Quantitation of anti-c in haemolytic disease of the newborn. *Transfusion Medicine* 1995, 5:37-42.
6. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. (EDS). *The Rh blood group system, Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 1997, 10th ed., Oxford Blackwell Scientific Publications.
7. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*, 2000, 95:3662-8.
8. Burton NM, Anstee DJ. Nature, function and significance of Rh proteins in red cells. *Curr Opin Hematol* 2008, 15:625–630
9. Flegel WA. The Genetics of the Rhesus Blood Group System. *Dtsch Arztebl.* 104(10): 651–657, 2007
10. Neil D. Avent and Marion E. Reid. The Rh blood group system: a review *Blood*, 2000, 95(2):375-387
11. Matthew J. Conroy, Per A. Bullough, Mike Merrick and Neil D. Avent. Modelling the human rhesus proteins: implications for structure and function. *British Journal of Haematology*, 131:543–551
12. Luciano Marcondes Machado Nardozza, Alexandre Szulman, Jose Augusto Barreto, Edward Araujo Junior, Antonio Fernandes Moron. The molecular basis of RH system and its applications in obstetrics and transfusion medicine. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56(6):724-8
13. Flegel WA, Wagner FF. Molecular Biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clin Lab.* 2002;48:53-9.

14. Daniels, G. Human Blood Groups. ed Second. Blackwell Science; Cambridge, Mass: 2002.
15. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93:385–393.
16. Singleton BK, Green CA, Avent ND, MartinPG, Smart E, Daka A, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a non sense mutation in Africans with the Rh negative blood group phenotype. *Blood*. 2000;95:12-18.
17. Marion E. Reid, Christine Lomas-Francis and Martin L. Olsson, *The Blood Group Antigen FactsBook (3rd Edition)*, p.195, 2012 Elsevier Ltd.
18. Nicholson G, Lawrence A, Ala FA, Bird GwG. Semi-quantitative assay of D antigen site density by flowcytometric analysis. *Transfusion Medicine*, 1991;1:87-90.
19. Beckers EAM, Faas BHW, Ligthart P, Overbeeke MAM, Von dem Borne AEG, Van der Schoot CE, Van Rhenen DJ. Lower antigen site density and weak D immunogenicity cannot be explained by structural genomic abnormalities or regulatory defects of the RHD gene. *Transfusion*, 1997;37:616-23.
20. Gassner C, Doescher a, Dmosek TD et al.: Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicentre study. *Transfusion* 2005; 45:527-538
21. 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*, 1988;92:664-671.
22. Cherif-Zahar B, Matassi G, Raynal V, et al. Rhdeficiency of the regulator type caused by splicing mutations in the human RH50 gene. *Blood*, 1998;92:2535-2540.
23. Huang C-H. The human Rh50 glycoprotein gene—structural organization and associated splicing defect resulting in Rhnull disease. *J Biol Chem.*, 1998;273:2207-2213.
24. Ballas SK, Clark MR, Mohandas N, et al. Red cell membrane and cation deficiency in Rh null syndrome. *Blood*, 1984;63(5):1046–1055.
25. Standards Committee of American Association of Blood Banks. *Standards for Blood Banks and Transfusion Services*. Bethesda, MD: American Associations of Blood Banks; 1999.

26. Petz LD, Garratty G. Acquired Immune Hemolytic Anemias. New York: Churchill Livingstone; 1980.
27. Perry GH, Xue Y, Smith RS, Meyer WK, Galiskan M, Yanez-Cuna O, Lee AS, Gutierrez-Arcelus M, Ober C, Hollox EJ, Tyler-Smith C, Lee C: Evolutionary genetics of the human Rh blood group system. *Hum Genet* 2012; 131:1205-1216
28. Franz F. Wagner: RHD PCR of D-Negative Blood Donors. *Transfus Med Hemother* 2013; 40:172–181
29. Kumpel B: Are weak D red blood cells really immunogenic? *Transfusion* 2006;46:1061-1062.
30. Gorick B, McDougall DCJ, Ouwehand WH, Overbeeke MAM, Tippett P, Hughes-Jones NC, van Rhenen DJ: Quantitation of D sites on selected 'weak D' and 'partial D' red cells. *Vox Sang* 1993;65:136-140.
31. Flegel WA, Khull SR, Wagner FF: Primary anti-D immunization by weak D type 2 RBCs. *Transfusion* 2000;40:428-434.
32. Mota M, Fonseca NL, Rodrigues A, Kutner JM, Castilho L: Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sang* 2005;88:130-135.
33. Gassner C, Doescher A, Drnovsek TD, Rozman P, Eicher NI, Legier TJ, Lukin S, Garritsen H, Kleinrath T, Egger B, Ehling R, Körmöczi GF, Kilga-Nogler S, Schoenitzer D, Petershofen EK: Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion* 2005;45:527-538.
34. Wagner T, Körmöczi GF, Buchta C, Vadon M, Lanzer G, Mayr WR, Legier TJ: Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 2005;45:520-526.
35. Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y: Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. *Transfusion* 2005;45:1581-1584.
36. W.A. Flegel, Molecular genetics of RH and its clinical application, *Transfusion Clinique et Biologique* 2006;13: 4–12
37. Pham BN, Roussel M, Peyrard T, Beolet M, Jan-Lasserre V, Gien D, Ripaux M, Bourgouin S, Kappler-Gratias S, Rouger P, Le Penne PY. Anti-D investigations in individuals expressing weak D Type 1 or weak D Type 2: allo- or autoantibodies? *Transfusion*. 2011 Dec;51(12):2679-85
38. Ouchari M, Chakroun T, Abdelkefi S, Romdhane H, Houissa B, Jemni Yacoub S. Anti-D auto-immunization in a patient with weak D type 4.0 *Transfusion Clinique et Biologique* 2014;21, Issue 1: 4–12

39. Lacey PA, Caskey CR, Werner DJ, Moulds JJ. Fatal hemolytic disease of a newborn due to anti-D in an Rh-positive Du variant mother. *Transfusion* 1983; 23:91–94.
40. Avent ND, Martin PG, Armstrong-Fisher SS, Liu W, Finning KM, Maddocks D, Urbaniak SJ. Evidence of genetic diversity underlying Rh D-, weak D (Du), and partial D phenotypes as determined by multiplex polymerase chain reaction analysis of the RHD gene. *Blood*. 1997;89:2568–2577.
41. Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D-negative Europeans. *BMC Genet* 2001; 2:10–25.
42. Ana Villalba, Marta Santiago, Carmen Freiria, Pau Montesinos, Ines Gomez, Carolina Fuentes, Rebeca Rodriguez-Veiga, José María Fernandez, Guillermo Sanz, Miguel Angel Sanz, Nelly Carpio, Pilar Solves. Anti-D Alloimmunization after RhD-Positive Platelet Transfusion in RhD-Negative Women under 55 Years Diagnosed with Acute Leukemia: Results of a Retrospective Study, *Transfus Med Hemother* 2018; 45:162–166
43. Misso S., Feola B., Paesano L., D’Onofrio M., Fratellanza G., D’Agostino E., Nigro M., Minerva A., Formisano S. Anti-D alloimmunisation following Rh-incompatible platelet transfusions, *Blood Transfus* 2006; 4: 102-105
44. Van Sandt, V. S. T., Gassner, C., Emonds, M.-P., Legler, T. J., Mahieu, S., & Körmöcz, G. F. RHDvariants in Flanders, Belgium. *Transfusion*, 2014, 55(6pt2):1411–1417.
45. F. Araujo, M.-J. Rodrigues, F. Monteiro, T. Chabert, G. Tavares, G. Sousa, J. Storry and J.-E. Guimaraes. Weak D type 2 is the most prevalent weak D type in Portugal. *Transfusion Medicine*, 2006, 16:63–67
46. Muller, T.H., Wagner, F.F., Trockenbacher, A., Eicher, N.I., Flegel, W.A., Schonitzer, D., Schunter, F. & Gassner, C. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three central European populations. *Transfusion*, 2001, 41:45–52.
47. Swati S. Kulkarni, Harita Gogri, Disha Parchure, Garima Mishra, Kanjaksha Ghosh, Sunil Rajadhyaksha, Manisha Madkaikar, Claude Férec, Yann Fichou. *RHD*-Positive Alleles among D- C/E+ Individuals from India. *Transfus Med Hemother* 2018; 45:173–177
48. Agnieszka Orzińska, Katarzyna Guz, Helene Polin, Monika Pelc-Kłopotowska, Justyna Bednarz, Agata Gieleżyńska, Beata Śliwa, Małgorzata Kowalewska, Elżbieta Pawłowska, Bogusława Włodarczyk, Małgorzata Malaga, Alicja

Żmudzin, Magdalena Krzemienowska, Kshitij Srivastava, Bogumiła Michalewska, Christian Gabriel, Willy A Flegel, and Ewa Brojer. RHD variants in Polish blood donors routinely typed as D negative. *Transfusion*, 2013, November; 53(11 Suppl 2): 2945–2953.

49. Guzijan G, Milosavić M, Radojković Sredić D, Lilić M, Jukić B. Molecular typing of RhD-negative blood donors with C and/or E antigen. *Scr Med* 2019; 50(2):98-102.