

## Preventiva in diagnostika hemolitične bolezni ploda in novorojenčka

Prevention and diagnostics of haemolytic disease of the fetus and newborn

Klara Železnik, Tadeja Dovč-Drnovšek, Primož Rožman, Irena Bricl

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

### Korespondenca/ Correspondence:

Klara Železnik, dr. med., Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana, tel.: 01/5438-338, email: klara.zeleznik@ztm.si

### Glavne besede:

prenatalna zaščita, hemoliza, eritrocitna aloprotitelesa, imunoglobulin anti-D, genotipizacija

### Key words:

prenatal prophylaxis, haemolysis, erythrocyte alloantibodies, anti-D immunoglobulin, genotyping

### Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012; 81 supl 2: II-312-18

Prispelo: 23. jan. 2012,  
Sprejeto: 21. maj 2012

### Izvleček

Hemolitično bolezen ploda in novorojenčka (HBPN) povzročijo eritrocitna aloprotitelesa v krvi nosečnice, ki preko posteljice prehajajo v plodov krvni obtok. Za hudo obliko HBPN so najpogosteje odgovorna protitelesa anti-D, povzročijo pa jo lahko še številna druga protitelesa, najpogosteje so to protitelesa vrste anti-Kell (anti-K), anti-c, anti-E in anti-C. Da bi preprečili HBPN, je v Sloveniji v rabi nacionalni program prenatalne zaščite, v okviru katerega vsem nosečnicam določimo krvno skupino (AB0, D, K) in jih testiramo na prisotnost morebitnih eritrocitnih aloprotiteles. Vsem D-negativnim nosečnicam, ki nimajo protiteles anti-D, v 28. tednu nosečnosti vbrizgamo preventivni odmerek imunoglobulina anti-D (Ig anti-D), s čimer preprečimo večino morebitnih senzibilizacij na plodov antigen D. Na tak način dobijo zaščito tudi tiste D-negativne nosečnice, ki nosijo D-negativni plod in je torej ne bi potrebovale. Z novimi metodami genotipizacije plodove DNA, ki je raztopljena tudi v materini periferni krvi, je danes mogoče že dovolj zanesljivo določiti plodov antigen D, kar omogoča ciljano zaščito z Ig anti-D samo tistih D-negativnih nosečnic, ki dejansko nosijo D-pozitivni plod.

### Abstract

Haemolytic disease of the newborn (HDN), also known as haemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN), develops in the fetus when erythrocyte alloantibodies produced by the mother pass through the placenta. Severe form of HDFN is mainly caused by anti-D antibodies, but it can also be caused by many other types of antibodies, most often by anti-Kell (anti-K), anti-c, anti-E in anti-C. In order to prevent sensitisation to erythrocyte antigens, every pregnant woman is tested for blood group AB0, D, K and for irregular antibodies (IAT-indirect antiglobulin test). For D-negative women IAT is repeated in the 28th week of pregnancy, followed by an injection of anti-D immunoglobulin (Ig anti-D) when indicated. At the Blood Transfusion Centre of Slovenia, we have recently started to determine the fetal D status from a maternal blood sample in order to avoid the unnecessary application of Ig anti-D to women bearing D-negative fetuses.

## Definicija in vrste hemolitične bolezni ploda in novorojenčka

Hemolitična bolezen ploda in novorojenčka (HBPN) nastane zaradi skrajšane življenjske dobe plodovih oz. novorojenčkovih eritrocitov. Ta je posledica hemolize, ki jo sprožijo eritrocitna aloprotitelesa razreda IgG, ki preko posteljice prehajajo iz krvi nosečnice v plodov krvni obtok in se vežejo na eritrocitne antigene, ki jih je plod podedoval od očeta.<sup>1</sup> Za hudo obliko HBPN so najpogosteje odgovorna eritrocitna protitelesa anti-D, HBPN pa lahko povzročijo še številna druga protitelesa. Najpogosteje so to protitelesa vrst anti-A in anti-B, sledijo protitelesa anti-Kell (anti-K), anti-c, anti-E in anti-C. Poleg teh opisujejo tudi primere HBPN, ki so posledica protiteles drugih specifičnosti, kot so anti-Cw, -Cx, -ce, -k, -Kp(a), -Kp(b), -Js(a), -Js(b), -Fy(a), -Fy3, -Jk(a), -Jk(b), -M, -N, -S, -s, -LW, -U, -Le(a) in -Le(b) ter še številnih drugih specifičnosti.<sup>2</sup> HBPN lahko razdelimo glede na vrsto aloprotiteles in glede na stopnjo prizadetosti ploda oz. novorojenčka. Glede na prizadetost ploda oz. novorojenčka HBPN razdelimo na blago, zmerno in hudo obliko. V približno polovici primerov gre za blago obliko, pri kateri je prisotna minimalna anemija in zdravljenje ni potrebno. V približno četrtini primerov gre za zmerno obliko, pri kateri je prisotna zmerna anemija; hidrops ploda (*hydrops foetalis*) se sicer ne razvije, vendar se po rojstvu lahko razvije trajna možganska okvara zaradi odlaganja bilirubina v možganskih jedrih (*kernicterus*). Pri hudi obliki HBPN, ki se brez zdravljenja razvije v približno četrtini primerov, se hidrops ploda razvije že v maternici.<sup>2-3</sup>

## Preprečevanje senzibilizacije

Eritrociti imajo na svoji površini več kot 400 različnih antigenov, od katerih so številni lahko vključeni v patogenezo HBPN. Do senzibilizacije na tuje eritrocitne antigene lahko pride po transfuziji, presaditvi ali zaradi fetomaternalnega neskladja v nosečnosti. Senzibilizacijo, to je tvorbo eritrocitnih aloprotiteles, lahko preprečimo tako s transfundiranjem krvnih kompo-

nent, skladnih v najpomembnejših eritrocitnih antigenih, kot tudi z ustrezno zaščito nosečnic in otročnic z imunoglobulinom anti-D (Ig anti-D). Za bolnike, ki potrebujejo transfuzijo koncentriranih eritrocitov ali transfuzijo koncentriranih granulocitov, pripravljamo krvne komponente, skladne v eritrocitnih antigenih AB0, D in K. Če obstaja indikacija za koncentrirane trombocite, pripravljamo trombocitne komponente, skladne v eritrocitnih antigenih AB0 in D. Napačna uporaba AB0-neskladnih komponent ob transfuziji lahko zaradi naravno prisotnih izoaglutininov povzroči takojšnjo akutno hemolizo. Antigena D in K sta zelo imunogena. Najbolj imunogen je antigen D, saj transfuzija 200 mL D-pozitivnih eritrocitov sproži tvorbo protiteles anti-D pri 85 % D-negativnih prejemnikov. Po imunogenosti mu sledi antigen K, ki sproži imunizacijo pri približno 10 % neskladnih transfuzij. 91 % Evropejcev nima antigena K, antitetični antigen k (Cellano) pa je visoko prevalenten v vseh populacijah, saj je prisoten kar pri 98,8 % ljudi. Z današnjim znanjem lahko v nosečnosti preprečujemo le senzibilizacijo D-negativnih nosečnic na antigen D z dosledno predporodno in poporodno zaščito z Ig anti-D.<sup>1</sup>

## Zgodovina uvajanja imunoprofilakse

Kljub začetku uvajanja poporodne zaščite pri D-negativnih ženskah v številnih državah leta 1968 je HBPN povsod po svetu ostajala resen zdravstveni problem.<sup>4</sup> Predporodno zaščito D-negativnih nosečnic z Ig anti-D so najprej leta 1977 uvedli v Kanadi ter kmalu zatem še v ZDA.<sup>5</sup> V Sloveniji smo začeli s poporodno zaščito z Ig anti-D leta 1970. Leta 1993 smo v Sloveniji uvedli tudi predporodno diagnosticiranje in zaščito nosečnic z Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti. Po podatkih avtorjev se je s kombinacijo pred- in poporodnega vbrižgavanja Ig anti-D število senzibilizacij na antigen D zaradi nosečnosti zmanjšalo na 0,18 % nosečnosti v primerjavi z 1,8 % senzibiliziranih žensk, ki so Ig anti-D prejele le po porodu.<sup>5</sup>

## Etiologija in patogeneza hemolitične bolezni ploda in novorojenčka zaradi protiteles anti-D

Nosečnica se lahko senzibilizira na številne plodove antigene zaradi fetomateralnega neskladja, ki je normalen biološki pojav, saj sta starša biološko različna osebka. Senzibilizacija na plodove eritrocitne antigene je posledica fetomaterlnih krvavitev med nosečnostjo in/ali ob porodu. Neskladnost med plodom in materjo v antigenu D je zaradi visoke prevalence neskladnosti in močne imunogenosti antigena D najpogostejši vzrok za senzibilizacijo.<sup>2-3</sup> Od izpostavljenosti D-pozitivnim eritrocitom do zaznave protiteles anti-D navadno minejo štirje tedni. Najvišje ravni protiteles anti-D zasledimo šest do osem tednov po primarnem stiku z D-pozitivnimi eritrociti. IgG je pogosto edini razred imunoglobulinov in je običajno podtipov IgG1 in/ali IgG3.<sup>6-7</sup>

Eritrocitna aloprotitelesa razreda IgG prehajajo preko posteljice in se vežejo na eritrocitne antigene, ki jih je plod podedoval od očeta. Protitelesa se z delom Fc nato vežejo na Fc-receptor makrofagov v vranici, kjer pride do hemolize plodovih eritrocitov (t. i. ekstravaskularna hemoliza). Stopnja hemolize je odvisna od podrazreda protiteles IgG, količine protiteles in števila antigen-skih mest na eritrocitu. Najbolj potentna podrazreda protiteles IgG sta IgG1 in IgG3. Transport IgG preko posteljice se začne v drugem trimesečju ter se nadaljuje do poroda. IgG1 se preko posteljice transportira prej in v večjih količinah kot IgG3, zato povzroči težjo obliko hemolitične bolezni.

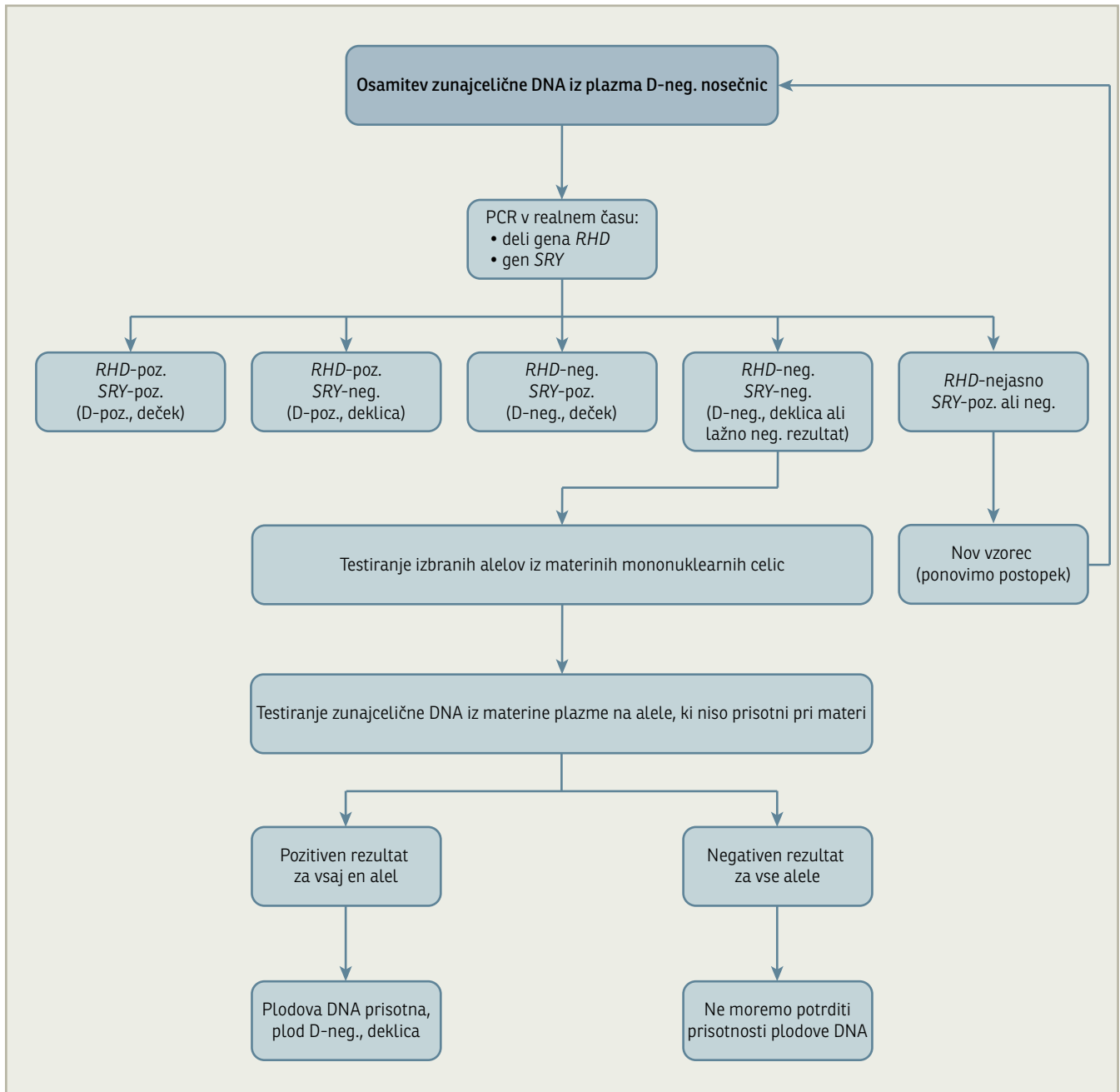
Posledica ekstravaskularne hemolize je anemija, ki ji sledi povečana eritropoeza v kostnem mozgu in tudi v drugih organih, ki imajo v embrionalnem in fetalnem razvoju krvotvorno funkcijo (vranica in jetra). Hematopoeza v jetrih povzroči portalno hipertenzijo in zmanjšano produkcijo albumina, kronična anemija pa povzroči srčno popuščanje. Zaradi generalizirane hipoksije se poveča prepustnost žilnih sten s posledično ekstravazacijo proteinov. V končni fazi zmanjšana produkcija in prerazporeditev

albumina iz intravaskularnega v ekstravaskularni prostor, hipoproteinemija ter srčno popuščanje povzročijo generalizirani edem, ki ga imenujemo hidrops ploda. Huda oblika bolezni se lahko pojavi že v 18.–20. tednu nosečnosti, ker je antigen D prisoten na embrionalnih eritrocitih že v petem do šestem tednu nosečnosti.<sup>1,8</sup> Pri plodu je prisotna hiperbilirubinemija, ki po porodu še naraste. Nekonjugirani bilirubin prehaja preko krvno-možganske pregrade v nevrone bazalnih ganglijev in možganskega debla, ki so bogati z lipidi, kjer moti funkcijo mitohondrijev. Posledična smrt nevronov povzroči trajno možgansko okvaro.<sup>8</sup> V prvih 12. tednih po porodu raven materinih protiteles v otrokovem obtoku upada, njihov razpolovni čas pa je tri do štiri tedne.

Plod in novorojenček sta pri prvi nosečnosti redko prizadeta, saj do fetomaterlnih krvavitev in s tem do primarne imunizacije prihaja predvsem pozno v nosečnosti in med porodom. Za senzibilizacijo na antigen D zadostuje že 0,1 do 1 mL D-pozitivnih plodovih eritrocitov v materinem krvnem obtoku. Brez zaščite z Ig anti-D se senzibilizira 16 % D-negativnih nosečnic, ki rodijo D-pozitivnega otroka. Odstotek senzibilizacij upade na 1,5 do 2 %, če sta mati in plod neskladna tudi v krvnoskupinskem sistemu AB0, verjetno zaradi skrajšanega preživetja neskladnih plodovih eritrocitov v materinem obtoku.<sup>1</sup> Zanimivo je, da je umrljivost plodov moškega spola zaradi HBPN kar trikrat večja od umrljivosti plodov ženskega spola.<sup>9</sup>

## Preprečevanje senzibilizacije na antigen D z vbrizgavanjem imunoglobulina anti-D

Imunoglobulinski pripravek Ig anti-D, ki ga v Sloveniji uporabljamo za preprečevanje senzibilizacije na antigen D, je poliklonsko protitelo, ki ga pridobimo iz plazme D-alo-senzibiliziranih posameznikov. Pri njegovi uporabi je verjetnost prenosa nalezljivih bolezni zelo majhna, vendar so bili v preteklosti v tujini pri uporabi podobnih humanih pripravkov opisani prenosi okužbe s virusom hepatitisa C. Obstaja tudi teoretična



**Slika 1:** Algoritem testiranja za določitev plodovega genotipa *RHD* iz periferne krvi D-negativne nosečnice.

možnost prenosa različice Creutzfeldt-Jacobove bolezni in doslej še neznanih patogenov. V poskusu, da bi nadomestili potrebo po Ig anti-D humanega izvora, so izdelali več humanih monoklonskih ali rekombinantnih pripravkov protiteles anti-D, ki so imeli različen učinek na preprečevanje senzibilizacije na antigen D. Nekateri pripravki so tvorbo protiteles anti-D celo spodbudili, namesto da bi jo zavrli.<sup>10</sup> Za preprečitev senzibilizacije na antigen D je potrebna vezava približno 200 molekul Ig anti-D na eritrocit. V trenutni klinični praksi se ob odmerkkih,

ki jih uporabljamo, na eritrocit veže še več molekul Ig anti-D. Poporodno zaščito moramo vbrizgati v roku 72 ur po porodu. Razi-skave poročajo, da Ig anti-D, vbrizgan 13 dni po vbrizgavanju D-pozitivnih eritrocitov, ni preprečil senzibilizacije pri vseh D-negativnih osebah. Pri ženskah, pri katerih poporodna zaščita ni bila uspešna, so bile ravni imunskih protiteles anti-D v naslednjih nosečnostih nižje kot pri ženskah, ki Ig anti-D niso prejele, prav tako je HBPN potekala v blažji obliki, kar kaže na dolgotrajno imunomodulatorno delovanje pasivnih protiteles

Ig anti-D.<sup>6</sup> Za preprečevanje senzibilizacije na plodov antigen D za vsak mL plodove krvi v materinem krvnem obtoku zadostuje 10 µg Ig anti-D. Mehanizem delovanja Ig anti-D, ki prepreči nastanek protiteles anti-D po vbrizgavanju zaščitnega odmerka, še ni povsem jasn. D-pozitivni eritrociti, ki so obdani s protitelesi Ig anti-D, se odstranjujejo v makrofagih vranice. Makrofagi preko receptorja Fc-gama, ki veže Fc-del protiteles, vezanih na eritrocite, sprožijo fagocitozo celice. Za preprečitev senzibilizacije na antigen D po vbrizgavanju Ig anti-D obstajajo tudi dodatni mehanizmi, ki zavirajo aktiviranje limfocitov B in celic pomagalk Th4 ter zavirajo delovanje nezrelih dendritičnih celic.<sup>6,10</sup>

V študijah, ki so jih opravili pri novorojenčkih, rojenim D-negativnim materam, ki so v nosečnosti prejele en ali dva odmerka Ig anti-D, so opazovali ravni hemoglobina in hematokrita, povprečni volumen eritrocitov (*angl.* mean corpuscular volume, MCV), delež retikulocitov, raven bilirubina in opravili direktni Coombsov test (DCT). Pri novorojenčkih mater, ki so v nosečnosti prejele dva odmerka Ig anti-D, je bil DCT pozitiven v 20 %. Pri novorojenčkih mater, ki so v nosečnosti prejele en odmerek Ig anti-D, pa je bil DCT pozitiven le v 2 %. Kljub pomembnim razlikam pri testiranju DCT pa med obema skupinama ni bilo razlik v vrednostih ostalih hematoloških parametrov, zato so zaključili, da vbrizgavanje enega ali dveh odmerkov Ig anti-D nosečnici kljub pozitivnemu DCT ne povzroča hemolize pri plodu.<sup>11</sup>

## Hemolitična bolezen ploda in novorojenčka povzročena z drugimi eritrocitnimi protitelesi

Z uvedbo pred- in poporodnega injiciranja Ig anti-D D-negativnim ženskam se je število senzibilizacij na antigen D zmanjšalo, zato pa se je relativno povečal delež senzibilizacij na druge eritrocitne antigene. Iz sistema Rh so poleg protiteles anti-D v patogenezo HBPN najpogosteje vključena protitelesa vrst anti-c, anti-E in anti-C. Pri D-pozitivnih nosečnicah, ki ne tvorijo protiteles anti-D, so klinično najpomembnejša

protitelesa anti-c, ki pogosteje povzročijo hudo obliko HBPN kot protitelesa anti-E in anti-K.<sup>12-15</sup>

Klinično izjemno pomembna so protitelesa anti-K, ki povzročijo približno 10 % vseh primerov HBPN.<sup>16</sup> Anemija ploda oz. novorojenčka, ki se pojavi zaradi materinih protiteles anti-K, je posledica tako hemolitičnega delovanja protiteles kot tudi zaviranja plodove eritropoeze.<sup>17-20</sup> Antigen K se na eritroidnih progenitornih celicah namreč izraža zgodaj v poteku eritropoeze, mnogo prej kot antigeni sistema Rh. Daniels s sodelavci je v pogojih testiranja *in vitro* ugotovil, da je anemija ploda ob prisotnosti protiteles anti-K lahko tudi posledica imunsko pogojenega uničenja zgodnjih eritroidnih prekurzorjev z makrofagi v plodovih jetrih.<sup>17</sup> Zgodnje eritroidne progenitorne celice še ne vsebujejo hemoglobina, kar je v skladu z nižjimi vrednostmi bilirubina v amnijski tekočini in blago neonatalno hiperbilirubinemijo pri Kell HBPN v primerjavi z D HBPN.<sup>16-18</sup> Intrauterine transfuzije (IUT) so pogosteje potrebne pri HBPN zaradi protiteles anti-K kot pri HBPN zaradi protiteles anti-D. Novorojenčki mater s protitelesi anti-K pa zaradi nižjega bilirubina potrebujejo manj fototerapij in manj izmenjalnih transfuzij kot novorojenčki mater, ki so senzibilizirane na antigen D. Potreba po nadaljnjih transfuzijah je v obeh skupinah novorojenčkov podobna.<sup>16</sup> Poleg zaviranja plodove eritropoeze protitelesa anti-K zavirajo tudi granulocitno in megakariocitno linijo, zato ima plod poleg anemije lahko tudi nevtropenijo in trombocitopenijo s posledičnimi okužbami in krvavitvami.<sup>21-22</sup> Nekateri avtorji poročajo, da ni povezave med titrom protiteles anti-K in stopnjo inhibicije K-pozitivnih eritroidnih progenitornih celic in s tem povzročene anemije.<sup>18</sup> Znano je, da večina hudih oblik HBPN nastane pri titru protiteles 32 ali več, a kljub temu priporočajo natančno vodenje Kell-senzibiliziranih nosečnic, če je titer 2 ali višji.<sup>16</sup> Kritični titer je raven, pod katero je tveganje za HBPN in hidrops pri plodu tako majhno, da invazivni postopki niso potrebni. Kritični titer za protitelesa vrste anti-K je 8.<sup>1</sup> Tudi številni drugi raziskovalci so v večini primerov opažali pojav hude HBPN pri titru 32 ali več.<sup>19</sup> Titri



protiteles anti-K, ki povzročijo HBPN, so v splošnem deset- do stokrat nižji od titrov pri HBPN zaradi protiteles anti-D.<sup>16</sup>

HBPN, ki jo povzročijo protitelesa vrste anti-Fy<sup>a</sup>, je redka in običajno poteka v blagi obliki, v redkih primerih pa lahko protitelesa anti-Fy<sup>a</sup> povzročijo hudo obliko HBPN, zato moramo nosečnice, senzibilizirane na antigen Fy<sup>a</sup>, natančno spremljati. Titer protiteles anti-Fy<sup>a</sup> se ne ujema vedno s klinično sliko, saj visoki titri protiteles ne povzročijo vedno HBPN.<sup>23</sup> Protitelesa anti-Fy<sup>b</sup> se pojavljajo 20-krat redkeje kot protitelesa anti-Fy<sup>a</sup> in lahko povzročijo HBPN.<sup>1</sup> Protitelesa anti-M so lahko naravno prisotna, običajno so razreda IgM ter so nereaktivna na telesni temperaturi, zato niso klinično pomembna. Redko so tipa IgG, ki v visokih titrih lahko povzročijo hudo obliko HBPN.<sup>12</sup> Protitelesa anti-Jk<sup>a</sup>, anti-Jk<sup>b</sup>, anti-S in anti-s večinoma povzročajo blago obliko HBPN, opisujejo pa tudi primere hudih oblik HBPN, ki so se končale s plodovo oz. novorojenčkovo smrtjo.<sup>1,12,24</sup>

## Predporodne in poporodne preiskave v zvezi s preprečevanjem hemolitične bolezni ploda in novorojenčka – trenutno stanje

V skladu s Pravilnikom o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji moramo nosečnici do 12. tedna nosečnosti določiti krvne skupine (KS) AB0, D ter K. Do 12. tedna nosečnosti moramo opraviti tudi indirektni Coombsov test (ICT), s katerim preverimo prisotnost morebitnih eritrocitnih protiteles. D-pozitivnih nosečnic, ki imajo negativen ICT, kasneje v nosečnosti ne spremljamo več. Pri vseh D-negativnih nosečnicah testiranje ponovimo v 28. tednu nosečnosti. D-negativnim nosečnicam, pri katerih nismo dokazali protiteles vrste anti-D, vbrizgamo zaščitni odmerek Ig anti-D (1250 I.U.), ki zadostuje, da preprečimo senzibilizacijo pri fetomaternalni krvavitvi (FMK), manjši od 25 mL plodove krvi. Preventivno vbrizgavanje v 28. tednu nosečnosti je potrebno tudi, če je pozitiven test ICT posledica preventivnega vbrizgavanja Ig an-

ti-D pred več kot tremi tedni zaradi drugih indikacij.

Po porodu pri D-negativni otročnici ponovno opravimo ICT, pri novorojenčku pa določimo KS AB0, D in K ter DCT. Razpolovni čas Ig anti-D je 3–4 tedne, zato ima mati v krvnem obtoku ob porodu še vedno približno 10 % odmerka Ig anti-D, ki smo ji ga vbrizgali v 28. tednu nosečnosti. To pomeni, da je pozitiven rezultat ICT pogosto posledica preventivnega vbrizgavanja Ig anti-D. Vsem D-negativnim otročnicam, ki niso imunizirane na antigen D in so rodile D-pozitivnega otroka, ponovno vbrizgamo zaščitni odmerek 1250 I.U Ig anti-D ter opravimo Kleihauer-Betkejev test (KBT) za oceno FMK. Če je FMK večja od 25 mL polne krvi, moramo otročnici glede na velikost izmerjene FMK vbrizgati dodatni odmerek Ig anti-D.

Preventivno vbrizgavanje Ig anti-D pri D-negativni nosečnici je potrebno tudi v primeru vaginalne krvavitve, spontane ali umetne prekinitve nosečnosti, znotrajmaterničnega posega (amniocenteza, kordocenteza, biopsija horionskih resic), zunanje obrata, zunajmaternične nosečnosti in poškodbe trebuha.

Odmerek Ig anti-D prilagodimo trajanju nosečnosti v tednih. V 20. tednu nosečnosti je ocenjeni fetoplacentarni volumen krvi 30 ml, ob roku pa naraste na 80–90 ml/kg plodove telesne teže.<sup>25</sup> Ob indikaciji za Ig anti-D pred 12. tednom nosečnosti zaradi majhnega volumna plodovih eritrocitov zadostuje odmerek 625 I.U. Ig anti-D, po 12. tednu nosečnosti pa je potreben odmerek 1250 I.U. Ig anti-D.

FMK se nanaša na vstop plodove krvi v materin krvni obtok pred porodom ali med njim. Do manjših FMK, ki niso škodljive za plod, najverjetneje prihaja v vseh nosečnostih. Pri 75 % primerov je volumen FMK manjši od 0,025 mL, pri 96 % je manjši od 0,5 mL ter pri 99 % manjši od 15 mL plodove krvi. Standardni test za oceno volumna FMK je KBT, ki temelji na dejstvu, da je fetalni hemoglobin F (HbF) bolj odporen na izpiranje s kislino kot hemoglobin eritrocitov odraslega človeka. Za natančnejšo oceno FMK uporabljamo pretočno citometrijo, s katero lahko določimo delež plodovih D-

-pozitivnih eritrocitov med materinimi D-negativnimi eritrociti.<sup>25</sup>

Če kadar koli v nosečnosti ugotovimo pozitiven rezultat ICT, moramo prisotna protitelesa specifikirati, jim določiti koncentracijo (titer) in ovrednotiti njihov klinični pomen. Pri nosečnicah s protitelesi anti-D titer načeloma testiramo v enakih časovnih razmikih kot pri senzibilizaciji na antigen c, tj. vsaj vsake štiri tedne do 28. tedna nosečnosti, nato pa na dva tedna; podobno velja tudi za testiranje protiteles anti-K. Vsekakor je potreben individualni pristop k obravnavi senzibilizirane nosečnice glede na vrsto protiteles, gibanje titrov protiteles ter trajanje nosečnosti.<sup>7</sup> Pri nosečnici poleg spremljanja titra protiteles določamo tudi njihovo agresivnost s funkcionalno preiskavo ADCC (*angl.* Antibody Dependent Cell Cytotoxicity). ADCC nam ponudi pomembno informacijo glede agresivnosti protiteles in ogroženosti ploda, saj visok titer protiteles še ne pomeni nujno prizadetosti ploda in obratno. Test ADCC kot tarčne celice uporablja s <sup>51</sup>Cr označene testne eritrocite, ki so senzibilizirani z materinimi protitelesi, nato pa opazujemo z receptorjem Fc posredovano hemolizo z monociti in limfociti. Rezultat izrazimo kot odstotek pričakovane hemolize plodovih eritrocitov.<sup>3</sup> Za dodatno oceno ogroženosti ploda moramo opraviti tudi testiranje partnerja za določitev antigena, proti kateremu nosečnica tvori protitelesa. Če je partner homozigot v inkriminiranem antigenu, ima ta antigen najverjetneje tudi plod. Če je partner heterozigot, je 50-odstotna verjetnost, da ima plod dotični antigen, zato si pomagamo z metodami določitve antigena neposredno v plodovih tkivih. Analiziramo lahko amnijsko tekočino, horionske resice ali plodovo kri, za kar pa moramo opraviti invazivne postopke. Novejša metoda, ki je neagresivna in varna, je genotipizacija zunajcelične plodove DNA (zcp-DNA) iz materine plazme, s katero je možno določiti genotip za nekatere najbolj pomembne eritrocitne antigene (antigen D, K, C, c, E).<sup>26</sup> Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM RS) z analizo zcp-DNA določamo prisotnost gena *RHD*, iz amniocitov pa določamo genotip za vse ostale eritrocitne antigene.

Nosečnice, ki so senzibilizirane na antigen D, spremljamo po naslednjem algoritmu. Potrebno je serološko testiranje partnerja (biološkega očeta), pri katerem določimo antigen D ter testiramo zigotnost za antigen D. Serološko D-pozitivni partner je lahko homozigot ali heterozigot. Če je partner homozigot, je plod D-pozitiven in genotipizacija plodovega D iz venske krvi nosečnice ni potrebna. Če je partner heterozigot, je 50-odstotna verjetnost, da je plod D-pozitiven, zato iz materine krvi z genotipizacijo zcp-DNA določimo prisotnost oz. odsotnost antigena D pri plodu. Plod je D-negativen, če je tudi biološki oče D-negativen. Pri nosečnici, ki nosi D-pozitivni plod, je potrebno redno spremljanje titra protiteles, spremljanje njihove agresivnosti s testom ADCC in redno ginekološko spremljanje.

## Ciljana zaščita D-negativnih nosečnic, ki nosijo D-pozitivni plod z Ig anti-D

Glavna pomanjkljivost sedanjega sistema prenatalne zaščite pred HBPN je v tem, da dobijo zaščito po nepotrebem tudi vse tiste D-negativne nosečnice, ki nosijo D-negativni plod. Leta 1997 je Lo s sod. odkril prisotnost zcp-DNA v materini krvi. S tem odkritjem se je ponudila možnost za neinvazivno določitev prisotnosti plodovega gena *RHD* iz periferne krvi nosečnice. Pred tem je bilo plodovo DNA mogoče pridobiti le z znotrajmaterničnim posegom, ki pa je prinašal tveganje za izgubo nosečnosti in za povišanje titra protiteles pri senzibiliziranih nosečnicah.<sup>27-28</sup> Koncentracija zunajcelične plodove DNA v materinem obtoku narašča z gestacijsko starostjo ploda, do močnega porasta pa pride v zadnjih osmih tednih nosečnosti. Povprečno je v materinem obtoku v prvem tromesečju delež plodove DNA 3,4 % celotne količine zunajcelične DNA, v zadnjem tromesečju pa ta delež naraste na 6,2 %. Zaradi nizkega deleža kopij zcp-DNA v materini krvi je zelo pomemben način osamitve nukleinskih kislin. Metode za določitev prisotnosti plodovega gena morajo biti prav tako zelo občutljive. Za pravilno na-

poved plodovega fenotipa D je pomemben tudi pravilen izbor regij gena *RHD*, katerega prisotnost določamo. Popolna delecija gena *RHD* je pri belcih najpogostejši vzrok, da je oseba D-negativna.<sup>9,29</sup>

Prednost določitve plodovega genotipa *RHD* iz materine plazme je, da niti nosečnica niti plod nista ogrožena pri pridobivanju plodovega materiala. Na ZTM RS osamitev zunajcelične DNA opravimo s pomočjo robota EZ1 (Qiagen, Nemčija). Prisotnost plodovega gena *RHD* določimo z metodo PCR v realnem času z napravo ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA). Algoritem testiranja prikazujemo na *Sliki 1*.

Za ugotavljanje prisotnosti plodovega gena *RHD* določamo prisotnost več delov gena *RHD*, saj tako znatno povečamo pravilno napovedno vrednost prisotnosti antigena D.<sup>30</sup> V redkih primerih (<1 %) ne moremo potrditi prisotnosti zcp-DNA v testiranem vzorcu. Vzorci venske krvi nosečnice, odvzeti v drugem in zadnjem tromesečju nosečnosti, vsebujejo dovolj zcp-DNA za uspešno genotipizacijo.<sup>31</sup> Z dodatnim postopkom pomnoževanja smo na ZTM RS zaznali zcp-DNA v materini plazmi že od 9. tedna nosečnosti dalje.<sup>32</sup>

V raziskavi, opravljeni na ZTM RS, smo 251 D-negativnim nosečnicam z določitvijo plodovega genotipa napovedali plodovo krvno skupino D in njegov spol. Napovedane rezultate smo primerjali z dejanskim spolom in s fenotipom D novorojenčka, ki smo ga rutinsko serološko določili po rojstvu. Natančnost napovedi spola in fenotipa D z metodo PCR v realnem času je bila 100 %.

S predporodnim določanjem prisotnosti gena *RHD* pri plodu iz materine periferne krvi bi lahko selektivno vbrizgali Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti, kar pomeni, da bi samo D-negativne nosečnice, ki nosijo D-pozitiven plod, prejele Ig anti-D. Müller in sodelavci navajajo, da v Nemčiji Ig anti-D po nepotrebem vbrizgajo približno 46.000 ženskam letno (40 % D-negativnih nosečnic), ki nosijo D-negativni plod. S selektivnim vbrizgavanjem Ig anti-D bi lahko zmanjšali porabo omejenih zalog Ig anti-D.<sup>33-35</sup> V Sloveniji, kjer vsako leto dobi predporodno zaščito okrog 1500 žensk, ki

je ne potrebuje, bi to pomenilo pomemben prihranek. Moramo se zavedati, da gre v tem primeru za nepotrebno zdravljenje, pri katerem se lahko pojavijo neželeni stranski učinki (oteklina in bolečina na mestu vbrižganja, gripi podobni simptomi, alergične in anafilaktične reakcije, slabost, bruhanje, kožne reakcije), zato predlagamo uvedbo rutinskega določanja D statusa pri plodu, pri katerem bi uporabljali naslednji algoritem. Vsem nosečnicam bi do 12. tedna nosečnosti določili krvne skupine AB0, D in K. Do 12. tedna nosečnosti bi opravili tudi ICT. Pri D-negativnih nosečnicah bi v 25.–26. tednu nosečnosti iz vzorca periferne venske krvi določili prisotnost gena *RHD* pri plodu. Če bi rezultat genotipizacije pokazal, da je plod D-negativen, spremljanje v sedanji nosečnosti ne bi bilo več potrebno, prav tako nosečnica v 28. tednu ne bi prejela Ig anti-D. Če je plod določen kot D-pozitiven, bi pri nosečnici opravili še ICT. Če je ICT negativen, bi bilo potrebno preventivno vbrižganje Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti. Preventivno vbrižganje v 28. tednu nosečnosti je potrebno tudi, če je pozitiven rezultat ICT posledica preventivnega vbrižgavanja Ig anti-D pred več kot tremi tedni zaradi drugih indikacij oz. je pozitiven rezultat ICT posledica prisotnosti drugih (ne anti-D) eritrocitnih protiteles. Po porodu bi vsem novorojenčkom, ki so se rodili D-negativnim materam vsaj v začetnem obdobju vpeljave genotipizacije v rutinsko prakso še serološko določili antigen D.

V primeru vaginalne krvavitve, spontane ali umetne prekinitve nosečnosti, znatrajmaterničnega posega, zunajmaternične nosečnosti in poškodbe trebuha, bi obdržali že obstoječi algoritem zaščite z Ig anti-D. Preventivno vbrižgavanje Ig anti-D D-negativni nosečnici je potrebno, če nosečnica ni senzibilizirana na antigen D. Genotipizacije iz periferne krvi nosečnice za določitev plodove krvne skupine D v teh primerih ne bi izvajali rutinsko.

## Zaključek

Število primerov HBPN zaradi protiteles anti-D je v Sloveniji zaradi ustrezne predporodne in poporodne zaščite D-negativnih



nosečnic z Ig anti-D nizko. Prav tako se bo v prihodnje zaradi transfundiranja K-negativnih eritrocitnih komponent bolnikom, ki so K-negativni, zmanjšalo tudi število senzibilizacij na antigen K. Eritrocitna protitelesa proti drugim eritrocitnim antigenom sicer ne povzročajo tako hudih oblik hemolitične bolezni kot anti-D, anti-c in anti-K, je pa kljub temu pomembno, da nosečnice, pri katerih odkrijemo takšna protitelesa, med nosečnostjo ustrezno spremljamo. Izjemno pomemben napredek na področju prenatalne diagnostike in preventive HBPN so molekularno-biološke preiskave, ki omogočajo ciljano vbrizgavanje Ig anti-D D-negativnim nosečnicam v 28. tednu nosečnosti. Z določitvijo plodovega genotipa *RHD* pri D-senzibiliziranih nosečnicah lahko ciljano spremljamo spremembo titrov in agresivnosti protiteles zgolj pri tistih, ki nosijo D-pozitivni plod.

## Literatura

- Kennedy MS. Perinatal issues in transfusion practice. In: Roback JD, Rae Combs M, Grossman BJ, Hillyer CD eds. Technical manual, 16th ed. Bethesda: AABB, 2008. p. 625–37.
- Bricl I, Ogrizek Pelkič K, Vogler A. Hemolitična bolezen ploda in novorojenčka (HBPN)- prikaz primera. Zdrav vestn. 2003; 72: 671–3.
- Bowman JM. Historical overview: Hemolytic disease of the fetus and newborn. In: Kennedy MS, Wilson SM, Kelton JG eds. Perinatal transfusion medicine. Arlington: AABB, 1990: 1–52.
- Dajak S, Stefanović V, Čapkun V. Severe hemolytic disease of fetus and newborn caused by red blood cell antibodies undetected at first-trimester screening (CME). Transfusion 2011; 51: 1380–8.
- Judd WJ. When should tests for unexpected antibodies be done during pregnancy? Transfusion 2011; 51: 1366–8.
- Kumpel BM. On the immunologic basis of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis. Transfusion 2006; 46: 1652–6.
- Gooch A, Parker J, Wray J, Qureshi H. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. Transfus Med 2007; 17: 252–62.
- Neal JL. D Isoimmunization and current management modalities. JOGNN 2001; 30: 589–606.
- Atamaniuk J, Stuhlmeier KM, Karimi A, Mueller MM. Comparison of PCR methods for detecting fetal D in maternal plasma. J Clin Lab Anal 2009; 23: 24–8.
- Brinc D, Denomme GA, Lazarus AH. Mechanisms of anti-D action in the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn: what can we learn from rodent models? Curr Opin Hematol 2009; 16: 488–96.
- Maayan-Metzger A, Schwartz T, Sulkes J, Merlob P. Maternal anti-D prophylaxis during pregnancy does not cause neonatal haemolysis. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2001; 84: 60–2.
- Moise KJ. Non-anti-D antibodies in red cell alloimmunization. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2000; 92: 75–81.
- Moran P, Robson SC, Reid MM. Anti-E in pregnancy. Br J Obstet Gynaecol 2000; 107: 1436–8.
- Kozłowski CL, Lee D, Shwe KH, Love EM. Quantification of anti-c in haemolytic disease of the newborn. Transfus Med 1995; 5: 37–42.
- Gündüz E, Meltem Akay O, Üsküdar Teke H., Gülbaş Z. Incidence of red-cell alloimmunization due to non anti-D antibodies during pregnancy: An experience from Turkey. Transfus Apher Sci 2010; 43: 261–3.
- Rath MEA, Smits-Wintjens VEJ, Lindenburg ITM, Brand A, Van Kamp IL, Oepkes D et al. Exchange transfusions and top-up transfusions in neonates with Kell haemolytic disease compared to D haemolytic disease. Vox Sang 2011; 100: 312–6.
- Daniels G, Hadley A, Green CA. Causes of fetal anemia in hemolytic disease due to anti-K. Transfusion 2003; 43: 115–6.
- Vaughan JL, Manning M, Warwick RM, Letsky EA, Murray NA, Roberts IAG. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies

- in fetal alloimmune anemia. *N Engl J Med* 1998; 338: 798–803.
19. McKenna DS, Nagaraja HN, O'shaughnessy R. Management of pregnancies complicated by anti-Kell isoimmunization. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 667–73.
  20. Tuson M, Hue-Roye K, Koval K, Imlay S, Desai R, Garg G, et al. Possible suppression of fetal erythropoiesis by the Kell blood group antibody anti-Kpa. *Immunohematology* 2011; 27: 58–60.
  21. Wagner T, Berer A, Lanzer G, Geissler K. Kell is not restricted to the erythropoietic lineage but is also expressed on myeloid progenitor cells. *BJH* 2000; 110: 409–11.
  22. Wagner T, Resch B, Reiterer F, Gassner C, Lanzer G. Pancytopenia due to suppressed hematopoiesis in a case of fetal hemolytic disease of the newborn associated with anti-K supported by molecular K1 typing. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26: 13–5.
  23. Goodrick MJ, Hadley AG, Poole G. Haemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Fya and the potential clinical value of Duffy genotyping in pregnancies at risk. *Transfus Med* 1997; 7: 301–4.
  24. Thakral B, Malhotra S, Saluja K, Kumar P, Marwaha N. Hemolytic disease of newborn due to anti-Jkb in a woman with high risk pregnancy. *Transfus Apher Sci* 2010; 43: 41–3.
  25. Wylie BJ, D'Alton ME. Fetomaternal hemorrhage. *Obstet Gynecol* 2010; 115: 1039–51.
  26. Illanes S, Soothill P. Noninvasive approach for the management of hemolytic disease of the fetus. *Expert Rev Hematol* 2009; 2: 577–82.
  27. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Sargent IL, Redman CWG, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–7.
  28. Hyland CA, Gardener GJ, Davies H, Ahvenainen M, Flower RL, Irwin D et al. Evaluation of non-invasive prenatal D genotyping of the fetus. *MJA* 2009; 191: 21–5.
  29. Grootkerk-Tax MGHM, Soussan AA, de Haas M, Maaskant-van Wijk PA, van der Shoot CE. Evaluation of prenatal D typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion* 2006; 46: 2142–8.
  30. Wagner FF, Frohmajer A, Flegl WA. D positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genetics* 2001; 2: 10.
  31. Bricl I, Dovč-Drnovšek T, Blejec T, Rožman P. Določanje plodove krvne skupine med nosečnostjo. *Zdrav Vestn* 2004; 73: 139–42.
  32. Dovč-Drnovšek T, Toplak N, Bricl I, Blejec T, Kovač M, Rožman P. An additional pre-amplification step for the early determination of fetal D from maternal plasma. In: Gahan PB, ed. *Circulating nucleic acids in plasma and serum*. Heidelberg: Springer, 2011: 147–51.
  33. Müller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Köhler M et al. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion* 2008; 48: 2292–301.
  34. Tynan JA, Angkachatchai V, Ehrlich M, Paladino T, van den Boom D, Oeth P. Multiplexed analysis of circulating cell-free fetal nucleic acids for noninvasive prenatal diagnostic D testing. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204: 251 e1–6.
  35. Illanes S, Soothill P. Management of red cell alloimmunisation in pregnancy: the non-invasive monitoring of the disease. *Prenat Diagn* 2010; 30: 668–73.