

## Vodenje nosečnice z multiplimi eritrocitnimi aloprotitelesi – Prikaz primera

Management of a pregnant woman with multiple erythrocyte alloantibodies – Case report

Andreja Hrašovec-Lampret,<sup>1</sup> Vesna Hrašovec,<sup>1</sup> Stanko Pušenjak,<sup>2</sup> Tanja Premru-Sršen,<sup>2</sup> Irena Bricl<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Klinični center Ljubljana, SPS Ginekološka klinika, Klinični oddelek za perinatologijo, Štajmerjeva 3, 1000 Ljubljana

### Korespondenca/ Correspondence:

Andreja Hrašovec-Lampret, dr. med., specializantka transf. med., Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, Ljubljana, email: andreja.hrasovec-lampret@ztm.si tel. 01/ 5438-374

### Ključne besede:

imunizacija, titer aloprotiteles, test ADCC, genotipizacija proste plodove DNA, intrauterina transfuzija

### Key words:

immunisation, titer of erythrocyte alloantibodies, ADCC-test, genotyping of free fetal DNA, intrauterine

### Izvleček

**Izhodišča:** Hemolitična bolezen ploda in novorojenčka (HBPN) nastane zaradi eritrocitnih protiteles, ki so prisotna v plazmi nosečnice in prehajajo preko posteljice v plodov krvni obtok, se vežejo na plodove eritrocitne antigene in povzročijo razpad plodovih eritrocitov. Posledica hemolize pri plodu je anemija, ki nezdravljena lahko povzroči plodovo smrt.

**Prikaz primera:** Prikazujemo primer ženske z eritrocitnimi aloprotitelesi vrst anti-C+G, anti-E, anti-Kp(a) in anti-Kn(a), ki je bila šestkrat noseča. Prisotnost eritrocitnih protiteles anti-C+G in anti-Kp(a) smo prvič dokazali šele v tretji nosečnosti. Titri dokazanih eritrocitnih aloprotiteles so bili v tej nosečnosti nizki, hemoliza pri plodu ni bila pričakovana. V 30. tednu nosečnosti je pri plodu prišlo do nenadnega razvoja anemije s patološkim kardiotokografskim zapisom, zato so porodničarji nosečnost prekinili. Anemija je bila posledica hemolize. Novorojenček je kljub izmenjalni transfuziji nekaj dni po porodu umrl zaradi HBPN. V naslednji nosečnosti so bili titri že znanih protiteles anti-C+G in anti-Kp(a) visoki in pričakovan razpad več kot 80 % plodovih eritrocitov. V 22. tednu nosečnosti so porodničarji ultrazvočno ugotovili hidrops ploda. Plod je prejel intrauterino transfuzijo (IUT), ki ni bila uspešna. Prišlo je do intrauterine smrti ploda. Peta nosečnost se je končala s spontanim splavom v 11. tednu nosečnosti. V zadnji nosečnosti so bili titri protiteles anti-C+G in anti-Kp(a) ponovno visoki in pričakovana je bila ponovno več

kot 80-odstotna hemoliza plodovih eritrocitov. V 17. in 20. tednu nosečnosti je prišlo do porasta vrednosti titrov dokazanih eritrocitnih protiteles. Porodničarji so v 22. tednu nosečnosti z dopplerskim merjenjem največje hitrosti pretoka krvi skozi srednjo možgansko arterijo ugotovili anemijo pri plodu. Plod je prejel sedem IUT. Po drugi IUT smo v plazmi nosečnice posumili še na prisotnost dodatnih eritrocitnih aloprotiteles vrst anti-E in anti-Kn(a). V 34. tednu nosečnosti so se porodničarji odločili, da nosečnost prekinemo. Z elektivnim carskim rezom so porodili deklico brez znakov hemolitične bolezni.

**Zaključek:** HBPN še vedno velja za nepredvidljivo bolezen, vendar smo s sodobnimi postopki spremljanja imuniziranih nosečnic ter s pravočasnim odkrivanjem anemije pri plodu in z ustreznim zdravljenjem anemije pri plodu sposobni uspešno voditi tudi nosečnico z multiplimi klinično pomembnimi eritrocitnimi aloprotitelesi.

### Abstract

**Background:** Hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) is caused by erythrocyte alloantibodies present in the maternal plasma during pregnancy, which cross the placental barrier and enter the fetal bloodstream, bind to fetal erythrocyte antigens and cause destruction of fetal erythrocytes. Hemolysis leads to fetal anemia, which can cause fetal death if not treated.

**Case report:** We report a case of HDFN in a multiparous female with multiple erythrocyte alloantibodies of anti-C+G, anti-E, anti-Kp(a)

transfusion

**Citirajte kot/Cite as:**Zdrav Vestn 2012;  
81 supl 2: II-322–30Prispelo: 17. apr. 2012,  
Sprejeto: 10. jul. 2012

and anti-Kn(a) specificity. In her third pregnancy we found erythrocyte alloantibodies of anti-C+G and anti-Kp(a) specificity for the first time. Erythrocyte alloantibodies titers were low and fetal hemolysis was not expected. However, in the 30<sup>th</sup> week of pregnancy obstetricians observed rapid development of fetal anemia, which was due to hemolysis. The pregnancy was terminated. Despite an exchange transfusion, the newborn died a few days after birth because of HDFN. In the following pregnancy, titers of already known erythrocyte alloantibodies were high and very severe hemolysis was predicted. In the 22nd week obstetricians found fetal hydrops. Despite intrauterine transfusion (IUT), the pregnancy ended with intrauterine fetal death. The fifth pregnancy ended with miscarriage in the 11th week of pregnancy. In the last pregnancy, titers of known erythrocyte alloantibody were high and again very severe hemolysis was pre-

dicted. In the 17<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> week of pregnancy, erythrocyte alloantibody titers increased. In the 22nd week of pregnancy, obstetricians observed fetal anemia and decided to perform an IUT. The fetus received seven IUTs. After the second IUT, additional erythrocyte alloantibodies of anti-E and anti-Kn(a) specificity were found in the maternal plasma. In the 34th week of pregnancy, obstetricians terminated the pregnancy with elective caesarean section. The child was born with no signs of hemolytic anemia.

**Conclusion:** HDFN is still considered an unpredictable disease. By the help of modern procedures for monitoring of immunised pregnant women also those pregnant women with multiple, clinically significant erythrocyte alloantibodies can be successfully managed in the course of pregnancy.

## Uvod

Hemolitična bolezen ploda in novorojenčka (HBPN) je bolezen, ki se kaže s skrajšano življenjsko dobo eritrocitov. Eritrocitna protitelesa razreda IgG, ki so prisotna v plazmi nosečnice, preko posteljice prehajajo v plodov krvni obtok. V plodovem krvnem obtoku se vežejo na plodove eritrocitne antigene, ki jih je plod podedoval od očeta, in povzročijo razpad plodovih eritrocitov ter anemijo pri plodu.<sup>1</sup> Za hudo obliko HBPN so najpogosteje odgovorna protitelesa vrste anti-D. Z uvedbo pred- in poporodne zaščite D-negativnih nosečnic z IgG anti-D se je incidenca RhD izoimunizacij zmanjšala na manj kot 0,1%.<sup>2</sup> HBPN lahko povzročijo tudi številna druga eritrocitna protitelesa. Najpogosteje gre za protitelesa vrst anti-A in anti-B, sledijo anti-K, anti-c, anti-E in anti-C.<sup>3</sup> Približno polovica otrok senzibiliziranih nosečnic se rodi brez znakov hemolitične anemije ali pa je ta zelo blaga, 25–30 % ima hepatosplenomegalijo, zmerno anemijo in zlatenico. Preostalih 20–25 % plodov razvije hudo anemijo s hidropsom ploda, ki običajno umre v maternici ali v neonatalnem obdobju, če ni primerne zdravljenja. Polovica plodov razvije hidrops med 18. in 30. tednom nosečnosti. Če anemije ploda ne zdravimo ustrezno in pravočasno, se lahko

razvije trajna možganska okvara zaradi kernikerusa, ki lahko povzroči smrt ploda ali pa težko prizadetost (gluhost, spastičnost, horeoatetoza).

Pri nosečnici z dokazanimi eritrocitnimi protitelesi v plazmi redno spremljamo vrednosti titrov in agresivnost dokazanih eritrocitnih protiteles, določimo eritrocitne antigene iz vzorca partnerjeve krvi in če je mogoče, določimo tudi plodove eritrocitne antigene, proti katerim ima nosečnica prisotna protitelesa. Če je potrebno, nosečnico oz. stanje ploda redno spremljamo tudi v ambulanti za ultrazvočno diagnosticiranje v nosečnosti.

## Prikaz primera

Predstavljamo primer 37-letne ženske s krvno skupino 0, D-negativno, K-negativno in s prisotnimi eritrocitnimi aloprotitelesi vrst anti-C+G, anti-E, aloprotitelesi krvnospupinskega sistema Kell (anti-Kp(a)) in aloprotitelesi krvnospupinskega sistema Knops (anti-Kn(a)). Bila je šestkrat noseča: dvakrat je spontano splavila, trikrat je rodila, enkrat je prišlo do intrauterine smrti ploda. Leta 2000 je prejela transfuzijo eritrocitov. Iz podatkov informacijskega sistema DATEC

smo ugotovili, da je bila ena od treh prejetih enot eritrocitov C-pozitivna.

Prva nosečnost leta 1995 se je končala s spontanim splavom v 7. tednu nosečnosti; vzrok ni bil znan.

V drugi nosečnosti leta 1996 so porodničarji zaradi abrupcije placente in fetalnega distresa inducirali porod ter s carskim rezom porodili otroka s Holt Oramovim sindromom. Indirektni Coombsov test (ICT), narejen na vzorcu krvi nosečnice, je bil med nosečnostjo in po porodu negativen. Direktni Coombsov test (DCT), opravljen na vzorcu plodove krvi, je bil negativen.

Leta 2005 smo v 7. tednu tretje nosečnosti v plazmi nosečnice prvič dokazali eritrocitna aloprotitelesa vrst anti-C+G in anti-Kp(a). Protitelesa anti-G so eritrocitna protitelesa vrste anti-CD, ki reagirajo s C-pozitivnimi in/ali z D-pozitivnimi eritrociti. Titer eritrocitnih aloprotiteles anti-G smo zato določali posredno s C-pozitivnimi in z D-pozitivnimi celicami. Poleg eritrocitnih protiteles anti-G so bila v plazmi nosečnice prisotna tudi eritrocitna aloprotitelesa vrste anti-C (anti-C+G). Eritrocitnih aloprotiteles vrste anti-D nismo dokazali. Ker je bila nosečnica D-negativna, smo v 28. tednu nosečnosti priporočili zaščito z IgG anti-D.<sup>4</sup> Iz vzorca partnerjeve krvi smo določili fenotip Rh: DCce ter eritrocitne antigene Kp(a-b+) in prišli do zaključka, da protitelesa anti-Kp(a) ploda niso ogrožala, saj sta bila nosečnica in partner Kp(a)-negativna, kar je pomenilo, da je bil tudi plod Kp(a)-negativen. Spremljali smo dinamiko vrednosti titrov protiteles anti-C+G in anti-Kp(a) ter s testom ADCC (*angl.* antibody dependent cell cytotoxicity) ocenili agresivnost protiteles anti-C+G. Za oceno agresivnosti protiteles anti-C+G s testom ADCC smo vzorce krvi nosečnice pošiljali v ustanovo Sanquin Blood Supply Foundation na Oddelek za imunohematologijo in eritrocitno serologijo v Amsterdam. Pričakovan razpad plodovih eritrocitov zaradi protiteles anti-C+G, določen z ADCC testom v 15. in 20. tednu nosečnosti, je bil manjši od 10 %. Izhodiščne vrednosti titrov eritrocitnih protiteles, določene v 7. tednu nosečnosti, so bile nizke. Titer eritrocitnih protiteles anti-G s C-pozitivnimi celicami je bil 4, z D-pozitivnimi celicami pa protiteles

v razredčini nismo mogli dokazati. Do 20. tedna nosečnosti se vrednosti titrov protiteles niso spreminjale. V 20. tednu smo ugotovili blag porast vrednosti titra protiteles C- in D-pozitivnimi celicami za eno razredčino. V 28. tednu nosečnosti dodatnega porasta vrednosti titrov protiteles nismo ugotovili. Nosečnico so porodničarji spremljali tudi v ambulanti za ultrazvočno diagnostiko v nosečnosti. V 30. tednu nosečnosti so z dopplersko meritvijo največje hitrost pretoka krvi skozi srednjo možgansko arterijo (SMA) pri plodu ugotovili anemijo. Največja hitrost pretoka krvi skozi SMA je bila povečana za dva standardna odklona (SD) nad srednjo vrednost za gestacijo. Drugih ultrazvočnih znakov za anemijo pri plodu niso našli. Na Kliničnem oddelku za perinatologijo v Ljubljani so s kordocentezo odvzeli vzorec plodove krvi. Vrednost hematokrita (Ht) plodove krvi je bila več kot 30 %, zato intrauterina transfuzija (IUT) ni bila indicirana. Iz vzorca plodove krvi smo določili še krvno skupino: 0, D-pozitivno, K-pozitivno, fenotip Rh:Cce in DCT, ki je bil pozitiven. Z metodo izpiranja in specifikacije smo na plodovih eritrocitih dokazali protitelesa razreda IgG, vrste anti-C+G. Dokazali smo, da je anemija pri plodu posledica hemolize zaradi protiteles anti-C+G. Zaradi nenadnega, hitrega in nepredvidljivega razvoja anemije pri plodu, ki se je kazala s sinusoidnim vzorcem kardiokografskega (CTG) zapisa, so se porodničarji odločili, da bodo nosečnost prekinili. S carskim rezom so porodili otroka z znaki hemolitične bolezni. Novorojenček je prejel izmenjalno transfuzijo 0, D-negativnih, K-negativnih in Kp(a)-negativnih eritrocitov v AB plazmi. Eritrociti so bili filtrirani, obsevani, oprani in citomegalovirus (CMV)-negativni. Kljub izmenjalni transfuziji je zaradi HBPN nekaj dni po porodu umrl. Ker je bil otrok D-pozitiven, je mamica tudi po porodu prejela zaščito z IgG anti-D.

Leta 2007 smo na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) opravili vse potrebne preiskave za morebitno naslednjo načrtovano nosečnost. Iz vzorca partnerjeve krvi smo določili eritrocitne antigene zunaj krvnoskupinskega sistema ABO in opravili genotipizacijo RHD.

Eritrocitni antigeni, določeni iz vzorca partnerjeve krvi, so bili naslednji: D+, C+c+, E-, Kp(a-b+). Genotipizacija RHD je pokazala, da je partner heterozigot za antigen D. Na podlagi dobljenih rezultatov smo prišli do zaključka, da obstaja 50-odstotna verjetnost, da bo plod v načrtovani naslednji nosečnosti C in/ali D-pozitiven. Vzorec krvi partnerke smo poslali tudi v referenčni laboratorij v ustanovo Sanquin Blood Supply Foundation na Oddelek za imunohematologijo in eritrocitno serologijo v Amsterdam, kjer so potrdili prisotnost že znanih eritrocitnih aloprotiteles anti-C+G in anti-Kp(a).

V četrti nosečnosti je bil ICT ob prvem rednem kontrolnem pregledu v nosečnosti ponovno pozitiven. Dokazali smo že znana eritrocitna aloprotitelesa vrst anti-C+G in anti-Kp(a) z visokimi vrednostmi titrov. Titer eritrocitnih aloprotiteles anti-C+G smo ponovno določali posredno s C-pozitivnimi in z D-pozitivnimi celicami. Titer eritrocitnih protiteles anti-C+G s C-pozitivnimi celicami je bil 1024, z D-pozitivnimi celicami 128, titer eritrocitnih protiteles anti-Kp(a) pa 16. Porasta titrov protiteles med nosečnostjo nismo zabeležili. Za oceno agresivnosti protiteles anti-C+G s testom ADCC smo vzorce krvi nosečnice pošiljali v ustanovo Sanquin Blood Supply Foundation na Oddelek za imunohematologijo in eritrocitno serologijo v Amsterdam. Rezultat testa ADCC za eritrocitna protitelesa anti-C+G, opravljen v 13. in 18. tednu nosečnosti, je pokazal pričakovano zelo hud, več kot 80-odstotni razpad plodovih eritrocitov. Nosečnico so tudi porodničarji redno spremljali v ambulanti za ultrazvočno diagnostiko v nosečnosti. V 22. tednu nosečnosti so ultrazvočno ugotovili hidrops ploda. Odločili so se za zdravljenje z IUT, ki pa žal ni bila uspešna. Prišlo je do intrauterine smrti ploda.

Peta nosečnost leta 2010 se je končala s spontanim splavom v 11. tednu nosečnosti. Vzrok ni bil znan.

Gospa je ponovno zanosila leta 2011. V 12. tednu nosečnosti je bil izvid ICT pozitiven. Ponovno smo dokazali eritrocitna aloprotitelesa vrst anti-C+G in anti-Kp(a). Dodatnih aloprotiteles nismo odkrili. Vrednosti titrov dokazanih eritrocitnih protiteles so bile še vedno visoke. Titer eritrocitnih

protiteles anti-C+G določen s C-pozitivnimi celicami je bil 64, z D-pozitivnimi celicami 16. Titer eritrocitnih protiteles anti-Kp(a) je bil 32. Spremljali smo dinamiko vrednosti titrov dokazanih eritrocitnih protiteles ter pošiljali vzorce krvi nosečnice v Amsterdam za določitev agresivnosti protiteles anti-C+G s testom ADCC. Rezultat testa ADCC je napovedal visoko agresivnost eritrocitnih aloprotiteles anti-C+G z več kot 80-odstotnim pričakovanim razpadom plodovih eritrocitov. V 17. tednu nosečnosti smo odvzeli še vzorec periferne krvi nosečnice za določitev plodovega genotipa RHC in genotipa RHD. Vzorec krvi za določitev plodovega genotipa RHC smo poslali v NHS Blood and Transplant v Bristol. Plodov genotip RHD pa smo določili na ZTM. Dokazali smo prisotnost genov RHC in RHD v plodovi DNA, kar je pomenilo, da je plod C-pozitiven in D-pozitiven. Eritrocitna protitelesa anti-C+G, prisotna v plazmi nosečnice, so tako ogrožala plod za razvoj HBP. V 20. tednu nosečnosti smo zabeležili porast titra protiteles anti-C+G. Vrednost titra, določenega s C-pozitivnimi celicami, je bila 512 titra z D-pozitivnimi celicami prav tako 512. Titer protiteles anti-Kp(a) se pričakovano ni spreminjal. V ambulanti za ultrazvočno diagnostiko v nosečnosti so porodničarji z dopplerskim merjenjem največje hitrosti pretoka krvi skozi SMA spremljali hemodinamske spremembe in iskali morebitne ultrazvočne znake anemije pri plodu. V 22. tednu nosečnosti so ugotovili povišano največjo hitrost pretoka krvi skozi SMA za več kot 2,5 SD nad srednjo vrednostjo za gestacijo, ki je kazala na anemijo pri plodu. Hidropsa niso ugotovili. Opravili so kordocentezo in iz vzorca plodove krvi določili vrednost Ht, ki je bila nižja od 30 %, in koncentracijo hemoglobina (Hb), ki je bila 28 g/L. Odločili so se za zdravljenje anemije z IUT. Volumen eritrocitov, potreben za IUT, so določili na osnovi začetnega plodovega hematokrita, teže ploda, hematokrita transfundiranih eritrocitov in ciljnega hematokrita pri plodu.<sup>5</sup> Hematokrit pripravka eritrocitov za IUT je bil med 75 % in 85 %. Po prvi IUT smo pričakovali padec vrednosti plodovega Ht za približno 1 % na dan in padec koncentracije Hb za 3g/L na dan, zato je plod potreboval



drugo IUT v 23. tednu in tretjo v 24. tednu nosečnosti. Ob naročilu eritrocitov za tretjo IUT smo odkrili dodatna eritrocitna protitelesa nedoločljive vrste. Vzorec krvi nosečnice smo ponovno poslali v ustanovo Sanquin Blood Supply Foundation na Oddelek za imunohematologijo in eritrocitno serologijo v Amsterdam, kjer so poleg že znanih eritrocitnih protiteles postavili sum na eritrocitna aloprotitelesa vrst anti-E in anti-Kn(a). Aloprotitelesa anti-E uvrščamo v skupino protiteles, ki lahko povzročijo zmerno do hudo obliko HBPN. Za aloprotitelesa anti-Kn(a) pa ni znano, da bi povzročala HBPN.<sup>6</sup> Po prejeti tretji IUT je pri plodu najverjetneje že prišlo do supresije eritropoeze in padca ravni eritropoetina (EPO). V plodovem krvnem obtoku so ostali večinoma transfundirani eritrociti, ki so bili antigensko skladni s protitelesi v plazmi nosečnice, zato se je interval za naslednje IUT podaljšal. Tako je plod prejel zadnje štiri IUT v razmiku dveh tednov: v 27., 29., 31. in 33. tednu nosečnosti. Glede na resnost bolezni so se na Kliničnem oddelku za perinatologijo v Ljubljani odločili, da bodo nosečnost v 34. tednu prekinili. Z elektivnim carskim rezom so porodili deklico. Teža deklice ob rojstvu je bila 2350 g, dolžina 45 cm, obseg glave 32 cm, ocena po Apgarjevi po 1. min. 8, po 5. min. 8, po 10. min. 9. Deklica se je rodila brez znakov hemolitične bolezni. Drugi dan po rojstvu je bila koncentracija Hb 171 g/L, vrednost Ht 51 %, retikulociti < 0,1 %, koncentracija bilirubina 125 µmol/L. Fototerapije deklica ni potrebovala. Četrty dan po porodu sta bili z mamo odpuščeni iz porodnišnice. Deklica ni prejela nikakršne oblike zdravljenja. V prvem mesecu starosti je bila zaradi hude anemije sprejeta na Pediatrično kliniko v Ljubljani. Potrebovala je transfuzijo eritrocitov. Krvna skupina ABO pri deklici še ni bila določena. Ob rojstvu je bila v odvzetem vzorcu krvi deklice zaradi številnih IUT prisotna dvojnocelična populacija eritrocitov, zato smo prvič določili krvno skupino šele pred načrtovano transfuzijo eritrocitov. Serološko in z genotipizacijo RHD smo določili krvno skupino 0, D-pozitivno, fenotip Rh: Cce, Cw+, Kp(a-b+) ter Kn(a+b+). Deklica je prejela transfuzijo 0, D-negativnih, C-negativnih, E-negativnih in Kp(a)-ne-

gativnih eritrocitov ter zdravljenje anemije nadaljevala tudi z eritropoetinom (EPO). Po desetih tednih zdravljenja z EPO je bila koncentracija Hb 152g/L.

## Razpravljanje

V Sloveniji vsaki nosečnici ob prvem obisku pri ginekologu določimo krvno skupino ABO, RhD, Kell in naredimo presejalni test za eritrocitna protitelesa, s katerim iščemo nepričakovana protitelesa, prisotna v plazmi nosečnice. Določitev eritrocitnih protiteles v plazmi nosečnice predstavlja temelj za diagnozo in ugotavljanje tveganja za HBPN. Eritrocitna aloprotitelesa lahko nastanejo zaradi fetomaternalne krvavitve (FMK) ali po prejemu transfuzije krvi. FMK pomeni prisotnost fetalnih eritrocitov v materinem krvnem obtoku. Nastane lahko spontano med nosečnostjo, zaradi krvavitve ali invazivnih diagnostičnih postopkov med nosečnostjo (kordocenteza, amniocenteza), po spontani ali umetni prekinitvi nosečnosti ali ob porodu.<sup>7,8</sup> V prvem trimesečju nosečnosti je možnost FMK 5 %, v drugem trimesečju 15 %, v tretjem trimesečju do 30 % in ob porodu celo do 50 %.<sup>9</sup> Ob FMK pride imunski sistem nosečnice v stik s fetalnimi eritrocitnimi antigeni, ki jih je plod podedoval od očeta, in sproži imunski odgovor s tvorbo aloprotiteles. Podoben mehanizem tvorbe eritrocitnih protiteles je tudi pri transfuziji krvi. V našem primeru je do imunizacije najverjetneje prišlo bodisi med nosečnostjo leta 1996 ali po transfuziji C-pozitivnih eritrocitov leta 2000, saj smo prvič dokazali eritrocitna aloprotitelesa anti-C+G in anti-Kp(a) šele v tretji nosečnosti leta 2005.

Eritrocitna protitelesa anti-G v kombinaciji z eritrocitnimi protitelesi anti-C (anti-C+G), kot smo jih dokazali v našem primeru, lahko povzročijo zmerno do hudo obliko HBPN, kot so primer opisali različni avtorji.<sup>10-14</sup> Eritrocitna protitelesa anti-Kp(a), ki smo jih prav tako dokazali v plazmi nosečnice, so protitelesa proti nizko incidenčnim eritrocitnim antigenom iz krvnoskupinskega sistema Kell, ki lahko povzročijo HBPN, vendar v našem primeru ploda niso ogrožala, saj sta bila nosečnica in

partner Kp(a)-negativna, kar pomeni, da je tudi plod Kp(a)-negativen. Multipla eritrocitna protitelesa, ki jih odkrijemo med nosečnostjo, so lahko nevarnejša za plod, saj naj bi imela celo sinergističen učinek.<sup>15</sup>

Če pri nosečnici dokažemo prisotnost eritrocitnih protiteles v plazmi, redno spremljamo vrednosti titrov dokazanih eritrocitnih protiteles in s testom ADCC ocenimo njihovo agresivnost. Iz vzorca partnerjeve krvi določimo eritrocitne antigene in na podlagi rezultatov preiskav ocenimo verjetnost, da bo plod od očeta podedoval eritrocitne antigene, ki lahko reagirajo s protitelesi v krvi nosečnice ter povzročijo hemolizo pri plodu. Ogroženost ploda za razvoj HBPN potrdimo še z določitvijo plodovih eritrocitnih antigenov. Plodove eritrocitne antigene lahko določimo posredno z genotipizacijo proste plodove DNA, ki smo jo osamili iz periferne krvi nosečnice ali z genotipizacijo plodove DNA, izolirane iz vzorca plodovnice. Genotipizacija proste plodove DNA, izolirane iz periferne krvi nosečnice, je novejša molekularno biološka preiskava, ki nam omogoča zelo zgodnjo oceno plodove ogroženosti za razvoj HBPN, saj je plodova DNA prisotna v krvi nosečnice že v prvem trimesečju.<sup>16,17</sup> Odvzem vzorca periferne krvi nosečnice je v primerjavi z odvzemom vzorca plodovnice z amniocentezo neinvaziven poseg brez tveganja za FMK. Kadar pri plodu dokažemo eritrocitne antigene, proti katerim ima nosečnica prisotna protitelesa, je ogrožen za razvoj HBPN. Stopnjo ogroženosti ploda za razvoj hemolitične bolezni lahko napovemo na podlagi anamneze o predhodnih nosečnostih, dinamike vrednosti titrov dokazanih eritrocitnih protiteles v plazmi nosečnice, koncentracije bilirubina v plodovnici, ultrazvočnih znakov anemije pri plodu, spremenjenega zapisa CTG in sprememb hitrosti pretoka krvi v plodovem obtoku, izmerjenega z dopplersko preiskavo.

Anemija pri plodu, ki nastane zaradi imunske hemolize plodovih eritrocitov, se razvije v nekaj tednih s hiperbilirubinemijo in povečanim številom retikulocitov. Poveča se tudi tvorba eritropoetina in v primeru hude anemije pospeši ekstramedularna eritropoeza v plodovih jetrih in vranici. V plodov krvni obtok vstopijo nezreli, nukle-

irani eritrociti, od tod tudi poimenovanje *eritroblastosis fetalis*. Sinteza beljakovin v jetrih je motena in vodi v hipoproteinemijo z edemi, ascitesom, s perikardialnim izlivom, plevralnim izlivom in hidropsom ploda. Hemolitična anemija pri plodu povzroči zmanjšanje števila eritrocitov v krvnem obtoku, kar zmanjša hematokrit in viskoznost plodove krvi. Plod kompenzira anemijo s hiperdinamično cirkulacijo skozi vitalne organe, kot so možgani, srce in nadledvični žlezi.<sup>18</sup> Hiperdinamična cerebralna cirkulacija se kaže s porastom največje hitrosti pretoka krvi skozi SMA.<sup>19</sup> Tako lahko z dopplerskim merjenjem največje hitrosti pretoka krvi skozi SMA s kar 85-odstotno natančnostjo napovemo zmerno do hudo anemijo pri plodu.<sup>19</sup> Kadar je največja hitrost pretoka krvi skozi SMA povečana za 1,5 SD ali več za določeno gestacijsko starost ali je nad 95. percentilo za določeno gestacijsko starost, to pomeni, da je pri plodu prisotna anemija s koncentracijo Hb pod 60–90g/L, ki jo moramo zdraviti z IUT. Omenjene spremembe, ki nastanejo pri plodu zaradi anemije, spremljamo v ambulanti za ultrazvočno diagnostiko v nosečnosti. Torej iščemo morebitne ultrazvočne znake anemije pri plodu, kot so ascites, perikardialni izliv, plevralni izliv, povečana jetra, vranica, hidrops in z dopplerskimi meritvami največje hitrosti pretoka krvi skozi SMA spremljamo hemodinamske spremembe. Vsi postopki, s katerimi vodimo nosečnico v ambulanti za ultrazvočno diagnostiko v nosečnosti, so neinvazivni in brez tveganja za FMK. Za invazivne posege, kot je kordocenteza, se porodničarji odločijo le, če je življenje ploda zaradi hemolitične anemije ogroženo in je potrebno zdravljenje z IUT. Po invazivnem posegu se namreč v 2,3–17 % nosečnosti pojavi FMK in 1 od 200 nosečnic lahko zaradi posega celo splavi.<sup>20</sup>

Za zdravljenje anemije pri plodu se je kot najučinkovitejša izkazala IUT, ki jo v primerjavi v intraperitonealno transfuzijo lahko izvajamo že med 20. in 22. tednom nosečnosti. Preživetje nehidropičnih plodov po IUT je več kot 90 %, hidropičnih plodov pa 75 %.<sup>21</sup> Tudi v našem primeru je bila IUT v 22. tednu četrte nosečnosti pri že razvitem hidropsu ploda neuspešna. Zdravljenje z IUT se prične s postopkom kordocenteze,

ko pod nadzorom ultrazvoka porodničarji punktirajo popkovnično veno in odvzamejo vzorec plodove krvi za določitev vrednosti Ht in koncentracije Hb. Če je vrednost Ht < 30 % ali manjša od dveh SD za gestacijsko starost, nadaljujejo z IUT. Po končani IUT ponovno odvzamejo vzorec plodove krvi za določitev vrednosti Ht in koncentracije Hb. Predtransfuzijske vrednosti Ht in koncentracije Hb nam povedo, kako huda je hemoliza pri plodu, potransfuzijske vrednosti Ht in koncentracije Hb pa, kako učinkovita je bila sama transfuzija. Za IUT vedno pripravimo eritrocite krvne skupine 0, D-negativne in K-negativne, ki so v skladu s serumom matere, kar pomeni, da nimajo eritrocitnih antigenov, ki lahko reagirajo z eritrocitnimi protitelesi, prisotnimi v krvi nosečnice. Pripravek eritrocitov za IUT filtriramo skozi filter (170–200 µm), s čimer odstranimo levkocite in zmanjšamo možnost prenosa CMV. Pripravek tudi operemo, da bi odstranili ohranitveno raztopino (SAGM-fiziološka raztopina (saline), adenin, glukoza, manitol). Pred transfundiranjem eritrocite obsevamo z žarki gama (25–50 Gy), da preprečimo razvoj bolezni presadka proti gostitelju (*angl.* graft versus host disease, GVHD). Eritrociti za IUT morajo biti sveži, hranjeni manj kot pet dni po odvzemu.<sup>22</sup> Zaradi nezrelega imunskega sistema pri plodu morajo biti tudi CMV-negativni. Pripravljena kri mora imeti še ustrezno vrednost hematokrita 75–85 %. Kri z višjim Ht se zaradi visoke viskoznosti slabo meša s plodovo krvjo, kri z nižjim Ht pa zaradi večjega volumna lahko predstavlja nepotrebno obremenitev plodovega obtoka.<sup>23</sup> Ciljni hematokrit, ki ga želimo doseči pri plodu, se navadno giblje med 40 % in 50 %. Tipičen volumen krvi za IUT je med 30 in 100 mL. Kri se transfundira s hitrostjo 3–5 mL/min. Zapleti IUT so lahko povezani s postopkom kordocenteze, ki je invazivni poseg s tveganjem za FMK ter lahko povzroči porast koncentracije in agresivnosti že prisotnih eritrocitnih protiteles v plazmi nosečnice ali nastanek novih eritrocitnih protiteles zaradi transfuzije neskladnih eritrocitov.<sup>24</sup> V našem primeru je v tretji nosečnosti zaradi kordocenteze, opravljene tik pred predvideno IUT, najverjetneje prišlo do FMK ter do porasta kon-

centracije in agresivnosti že znanih eritrocitnih protiteles. Nekaj dni po kordocentezi je namreč kljub predhodnim nizkim vrednostim titrov in nizki agresivnosti dokazanih eritrocitnih protiteles prišlo do hitrega razvoja anemije pri plodu, ki se je kazala tudi s sinusoidno krivuljo CTG. Podobno smo pred tretjo IUT v zadnji nosečnosti posumili na dodatna eritrocitna aloprotitelesa vrst anti-E in anti-Kn(a).

Ena od posledic transfuzijskega zdravljenja z IUT je tudi supresija eritropoeze pri plodu in padec ravni fetalnega eritropoetina. Zaradi supresije eritropoeze se lahko nekaj tednov po porodu pri otroku razvije anemija, ker poteče življenjska doba transfundiranih eritrocitov. Ta anemija ima tudi značilno nizko število retikulocitov.<sup>25</sup> Po prejeti tretji IUT namreč pade raven retikulocitov pod 1 %. Otroku, ki je prejel IUT, moramo zato po rojstvu tedensko spremljati koncentracijo Hb in število retikulocitov, včasih tudi do 16. tedna starosti. V primeru dokazane anemije so potrebne transfuzije krvi oz. zdravljenja z EPO, ki spodbudi eritropoezo.<sup>26</sup> V našem primeru deklica po rojstvu ni prejela zdravljenja z EPO, zato je bila v starosti enega meseca zaradi hude anemije sprejeta na Pediatrično kliniko v Ljubljani. Anemija je bila posledica supresije eritropoeze in padca ravni EPO zaradi številnih IUT, ki jih je prejela.

## Zaključek

HBPN je bila v preteklosti eden pomembnejših vzrokov za perinatalno obolevnost in umrljivost. Največ HBPN je povzročila senzibilizacija D-negativnih nosečnic z nastankom eritrocitnih aloprotiteles anti-D. Z uvedbo predporodne in poporodne zaščite D-negativnih nosečnic z IgG anti-D smo preprečili senzibilizacijo številnih nosečnic in znižali odstotek perinatalne obolevnosti in umrljivosti zaradi HBPN.<sup>2</sup>

Danes pri vseh senzibiliziranih nosečnicah redno spremljamo dinamiko vrednosti titrov eritrocitnih aloprotiteles, agresivnost eritrocitnih aloprotiteles z ADCC testom, določimo partnerjeve in plodove eritrocitne antigene in na podlagi dobljeni rezultatov sklepamo, kolikšna je ogroženost ploda za razvoj HBPN. V primeru porasta vrednosti titrov in ocenjene visoke ogroženosti ploda za razvoj HBPN, nosečnico spremljamo

tudi v ambulanti za ultrazvočno diagnostiko v nosečnosti, kjer z rednim iskanjem ultrazvočnih znakov anemije in z dopplerskim merjenjem največje hitrosti pretoka krvi skozi SMA pravočasno odkrijemo anemijo pri plodu ter jo tudi pravočasno in ustrezno zdravimo z IUT. Za spremljanje in vodenje nosečnice z eritrocitnimi aloprotitelesi v plazmi danes uporabljamo izključno neinvazivne metode brez tveganja za FMK. IUT, ki je vezana na invaziven poseg kordocenteze, je indicirana le v primeru, ko je potrebno zdravljenje anemije pri plodu. HBPN še vedno ostaja nepredvidljiva bolezen, kar smo dokazali tudi z našim primerom. V tretji nosečnosti so eritrocitna protitelesa povzročila HBPN ter smrt otroka nekaj dni po rojstvu, v četrti nosečnosti intrauterino smrt ploda, v zadnji nosečnosti pa smo s sodobnim in z neinvazivnim spremljanjem nosečnice pravočasno odkrili anemijo pri plodu in jo tudi uspešno zdravili z IUT.



## Literatura

1. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Haemolytic disease of the fetus and newborn. In: Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 11th ed. Oxford: Blackwell Science, 2005. p. 496–545.
2. Bowman J. Thirty-five years of Rh prophylaxis. *Transfusion* 2003; 43: 1661–6.
3. Bricl I, Ogrizek Pelkič K, Vogler A. Hemolitična bolezen ploda in novorojenčka (HBPN)–prikaz primera. *Zdrav Vestn* 2003; 72: 671–3.
4. Muller CL, Schucker JL, Boctor FN. When anti-G and anti-C antibodies masquerade as anti-D antibody. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011; 24: 193–4.
5. Intravascular Fetal Transfusion. Protocols. perinatology.com Nov 2002. Dosegljivo na: <http://www.perinatology.com/protocols/rhc.htm/>.
6. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Other red cells antigen. In: Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 11th ed. Oxford: Blackwell Science, 2005. p. 209–53.
7. Wylie BJ, D'Alton ME. Fetomaternal Hemorrhage. *Obstet Gynecol* 2010; 115: 1039–51.
8. S Kennedy M. Perinatal issues in Transfusion Practice. In: D. Roback J, ed. *Technical Manual*. 17th ed. Bethesda: AABB, 2011. p. 631–45.
9. Novak- Antolič Ž. Rh imunizacija. In: Pajntar M, Novak- Antolič Ž, eds. *Nosečnost in vodenje poroda*. Ljubljana: Cankarjeva zaožba, 1994; p. 69–73.
10. Cash K, Brown T, Strupp A, Uehlinger J. Anti-G in a pregnant patient. *Transfusion* 1999; 39: 531–33.
11. Huber AR, Leonard GT, Driggers RW, Learn SB, Gilstad CW. Case report: moderate hemolytic disease of the newborn due to anti-G. *Immunohematology* 2006; 22: 166–70.
12. Hadley AG, Poole GD, Poole J, Anderson NA, Robson M. Haemolytic disease of the newborn due to anti-G. *Vox Sang* 1996; 71: 108–12.
13. Yesus YW, Akther JE. Hemolytic disease of the newborn due to anti-C and anti-G masquerading as anti-D. *Am J Clin Pathol* 1985; 84: 769–72.
14. Jakobowicz R, Simmons RT. Iso-immunization in a mother which demonstrates the »new« Rh blood antigen G (rhG) and anti-G (rhG). *Med J Aust* 1959 Sep; 46: 357–8.
15. Nordvall M, Dziegiel M, Hegaard HK, Bidstrup M, Jonsbo F, Christensen B, Hedegaard M. Red blood cell antibodies in pregnancy and their clinical consequences: synergistic effects of multiple specificities. *Transfusion* 2009; 49: 2070–5.
16. Cardo L, García BP, Alvarez FV. Non-invasive fetal RHD genotyping in the first trimester of pregnancy. *Clin Chem Lab Med*. 2010 Aug; 48: 1121–6.
17. Avent ND, Madgett TE, Maddocks DG, Soothill PW. Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and evolving applications. *Obstet Gynecol* 2009; 21: 175–9.
18. Copel JA, Grannum PA, Green JJ, Belanger K, Hanna N, Jaffe CC et al. Fetal cardiac output in the isoimmunized pregnancy: a pulsed Doppler-echocardiographic study of patients undergoing intravascular intrauterine transfusion. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 361–5.
19. Alshimmiri MM, Hamoud MS, Al-Saleh EA, Mujabbel KY, Al-Harmi JA, Thalib L. Prediction of Fetal Anemia by Middle Cerebral Artery Peak Systolic Velocity in Pregnancies Complicated by Rhesus Isoimmunization. *J Perinatol* 2003; 23, 536–40.
20. Nicolini U, Kochenour NK, Greco P, Letsky EA, Johnson RD, Contreras M, et al. Consequences of fetomaternal haemorrhage after intrauterine transfusion. *BMJ* 1988; 297: 1379–81.
21. Schumacher B, Moise KJ Jr. Fetal transfusion for red blood cell alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol* 1996; 88: 137–50.
22. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). *Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components*, 2011, 16th edition, Red blood cell transfusion in newborn infants: Revised guidelines.
23. Završnik T, Cerar V. Intrauterina transfuzija. Zdravljenje s krvjo. Zdravljenje novorojenčkov in otrok–5. podiplomski seminar; Portorož 2002. 75–81.
24. Viëtor HE, Kanhai HH, Brand A. Induction of additional red cell alloantibodies after intrauterine transfusions. *Transfusion* 1994; 34: 970–4.
25. Millard DD, Gidding SS, Socol ML, MacGregor SN, Dooley SL, NeyJA et al. Effects of intravascular, intrauterine transfusion on prenatal and postnatal hemolysis and erythropoiesis in severe fetal isoimmunization. *J Pediatr* 1990; 317: 728–33.
26. Scaradavou A, Inglis S, Peterson P, Dunne J, Chervenak F, Bussel J. Suppression of erythropoiesis by intrauterine transfusion in hemolytic disease of the newborn: Use of erythropoietin to treat the late anemia. *J Pediatrics* 1993; 123: 279–83.