

Obravnavna nosečnic glede na tip RhD

Treatment of pregnant women by RhD type

Janja Mrak, Klara Železnik, Tadeja Dovč-Drnovšek, Irena Bricl

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana, Slovenija

Korespondenca/ Correspondence:

Janja Mrak, e: janja.jerina@gmail.com

Ključne besede:

varianste D; šibki D; parcialni D; serološke tehnike; molekularnobiološke metode

Key words:

variants D; weak D; partial D; serological techniques; molecular-biological methods

Prispelo: 9. 1. 2018

Sprejeto: 6. 8. 2019

Izvleček

Natančna opredelitev antigena (Ag) RhD (D) je pomembna pri nosečnicah, prejemnikih transfuzij in krvodajalcih. Glede na tip D se pri nosečnicah odločamo o pred- in poporodni zaščiti z imunoglobulinom anti-D (Ig anti-D). Glede na določitev Ag D lahko posameznike razvrstimo med D-pozitivne (D-poz) ali D-negativne (D-neg), obstajajo pa tudi številne druge različice Ag D (varianste D, D-var). Variantni aleli gena *RHD* (*D*) lahko nosijo zapis za različne oblike proteina D, razdelimo jih lahko na šibke, parcialne in D_{el} . Ag D določamo s serološkimi metodami, v primeru nejasnosti si pomagamo z molekularnobiološkimi metodami za določitev gena *D*. Dokončno opredelitev D-var podamo na podlagi molekularnobioloških metod.

Nosečnicam smo iz vzorcev periferne venske krvi določili Ag D na ploščici (reagent Seraclone anti-D) in na gelu (testni sistem z gelskimi karticami DiaClon ABO/D + Reverse Grouping, monoclonal antibodies, Bio-Rad, Nemčija, s katerimi ne zaznamo krvne skupine D kategorija VI). 49 nosečnicam smo opravili razširjeno serološko testiranje KS D (komercialni set ID-Partial RhD Typing Set, Bio-Rad, Nemčija). Nadaljevali smo z molekularnobiološkimi metodami: osamitev DNA (uporaba aparata BioRobot EZ1 in komercialnega set EZ1 DNA Blood 350 µl Kit, Qiagen, Nemčija), določitev genotipa *D* z metodo PCR-SSP (komercialni seti RBC-Ready Gene CDE, RBC-Ready Gene D weak in RBC-Ready Gene D AddOn, Inno-Train; Nemčija), pomnoževanje (aparat Veriti, Applied BioSystems, ZDA), ločevanje produktov (elektroforezni sistem, BioRad, ZDA) na agaroznem gelu (Sigma, Nemčija).

Ugotovili smo, da so šibke oblike D predstavljale 41 primerov (83,7 %), parcialne oblike D pa 8 primerov (16,3 %) vseh D-var. Najpogostejša oblika D-var med nosečnicami je bila šibki D tip 1 s 17 primeri (34,7 %), sledil je šibki D tip 3 s 13 primeri (26,5 %) in šibki D tip 2 z 10 primeri (20,4 %). Najpogostejša parcialna oblika D je bila D kategorija VII s 5 primeri (10,2 %).

Nosečnice in prejemnike transfuzij, ki so nosilci šibkih D tipa 1, 2 ali 3, lahko varno obravnavamo kot D-poz, nosilce vseh ostalih D-var pa kot D-neg. Krvodajalce z D-var obravnavamo kot D-poz. S tem algoritmom lahko preprečimo približno 172 nepotrebnih aplikacij Ig anti-D letno in ohranjamo tudi primerne zaloge D-neg eritrocitnih komponent krvi.

Abstract

An accurate determination of RhD (D) antigen (Ag) is important for pregnant women, transfusion recipients and blood donors. The decision to receive the pre- and postnatal prophylaxis with anti-D immunoglobulin (RhIG) is based on the D-type. Individuals can be classified as D-positive (D-pos) or D-negative (D-neg) based on the determination of Ag D but there are numerous other versions of Ag D as well (variants D, D-var). Allele variants of the *RHD* (*D*) gene can encode different forms of protein D. They are divided into weak, partial and D_{el} . Ag D are determined on the basis of serological techniques. If in doubt, we use the molecular-biological methods for determining the *D* gene. The definitive definition of D-var is given on the basis of the molecular-biological methods.

From the peripheral venous blood samples taken from pregnant women, we roughly determined Ag D on plates (the Seraclone anti-D reagent) and on gel cards (the DiaClon ABO / D + Re-

verse Grouping test system (monoclonal antibodies) (Bio-Rad, Germany), with which we do not detect D category VI blood group). For 49 pregnant women we performed extended serological tests of D blood group (commercial ID-Partial RhD Typing Set (Bio-Rad, Germany)). We proceeded with molecular-biological methods: DNA isolation (utilisation of the BioRobot EZ1 and the commercial set EZ1 DNA Blood 350 µl Kit (Qiagen, Germany)), determination of the genotype *D* with the PCR-SSP method (commercial RBC-Ready Gene CDE, RBC -Ready Gene D weak and RBC-Ready Gene D AddOn (Inno-Train; Germany)), amplification (Veriti apparatus (Applied Bio-Systems, USA)), product separation (electrophoretic system (BioRad, USA) on agarose gel (Sigma, Germany)).

Our results showed that weak D forms represented 41 cases (83.7 %) and partial forms 8 cases (16.3 %) of all D-var. The most common D-var in pregnant women was weak D type 1 with 17 cases (34.7 %), followed by weak D type 3 with 13 cases (26.5 %) and weak D type 2 with 10 cases (20.4 %). The most common partial D form was D category VII with 5 cases (10.2 %).

Pregnant women and transfusion recipients who are carriers of weak D types 1, 2 or 3 can be safely treated as D-pos, while carriers of all other D-var can be treated as D-neg. Blood donors with D-var are treated as D-pos. By means of this algorithm, approximately 172 unnecessary RhIG applications can be prevented annually and adequate supplies of D-neg erythrocyte blood components can be maintained.

Citirajte kot/Cite as: Janja Mrak, Klara Železnik, Tadeja Dovč-Drnovšek, Irena Bričl. [Treatment of pregnant women by RhD type]. *Zdrav Vestn.* 2019;88(11–12):582–92.

DOI: 10.6016/ZdravVestn.2687

1 Uvod

Natančna določitev krvne skupine (KS) RhD (D) je pomembna za nosečnice, prejemnike transfuzij in krvodajalce. Tip KS D nas pri nosečnicah vodi pri odločanju o potrebi po perinatalni preventivni zaščiti z imunoglobulinom (Ig) anti-D, pri prejemnikih transfuzij nam je v pomoč pri odločitvi o prejemu transfuzije D-pozitivne (D-poz) ali D-negativne (D-neg) komponente krvi, pri krvodajalcih pa se pravilno odločimo, ali bodo njihove komponente lahko varno prejeli D-poz ali D-neg prejemniki transfuzij. Večina posameznikov je nosilec antigena (Ag) D, pri manjšini je Ag D odsoten, nekateri pa so nosilci drugih variant oz. različic Ag D (D-var). Danes je znanih več kot 200 oblik D-var, ki jih razdelimo na šibke D, parcialne D in D_{el} (1,2). Znano je, da nosilci šibkega D tipa 1, 2, in 3 ob stiku z D-poz eritrociti

ne tvorijo protiteles anti-D, nosilci ostalih oblik D-var pa jih lahko, čeprav v literaturi za vse zaenkrat še ni podatkov o tvorbi protiteles. Ag D rutinsko določamo s serološkimi metodami, s katerimi pa ne moremo dovolj zanesljivo razlikovati in določiti posameznih oblik D-var. V teh primerih podprimo določanje krvne skupine D z molekularnobiološkimi metodami, s katerimi določamo najpogostejše D-var. Aloprotitelesa anti-D lahko povzročijo hemolitično transfuzijsko reakcijo (HTR) ali hemolitično bolezen ploda in novorojenca (HBPN) (3). Namen članka je prikazati algoritem določanja KS D pri nosečnicah, obravnavo nosečnic glede na določeno KS D, določiti pogostost posameznih D-var med nosečnicami v Sloveniji ter primerjati podatke z ostalimi evropskimi državami.

2 Zgodovina hemolitične bolezni ploda in novorojenca (HBPN)

Protitelesa proti Ag sistema Rh lahko nastanejo ob izpostavitvi za določen Ag-negativnega posameznika Ag-pozitivnim eritrocitom med prejetjem krvne komponente ali med nosečnostjo; v redkih primerih gre za naravno prisotna protitelesa. V HBPN je najpogosteje vpleten le eden od številnih Ag sistema Rh, in sicer Ag D (4,5). Zaradi transfuzij krvnih komponent, skladnih v Ag D, ter preventivne zaščite D-neg nosečnic z Ig anti-D so novo odkrite senzibilizacije na Ag D pri nas redke. V primeru, da odkrijemo anti-D pri serološko D-poz osebi, moramo pomisliti na D-var, avtoprotitelesa anti-D ali pasivno pridobljena protitelesa. Pri D-neg osebah so lahko protitelesa anti-D pridobljena pasivno s preventivno zaščito z Ig anti-D, lahko nastanejo zaradi imunizacije po stiku z eritrociti D-poz ali D-var, zelo redko pa so protitelesa anti-D naravno prisotna (6,7).

Krvnoskupinski sistem Rhesus (Rh) sta leta 1940 odkrila Landsteiner in Wiener, ko sta ugotovila, da so ob mešanju protiteles proti sistemu Rh z vzorci krvi belcev, le-ti v 85 % aglutinirali s serumom, 15 % pa jih ni aglutiniralo. Prve so imenovali Rh-pozitivne, druge Rh-negativne. To je bila podlaga za ugotovitev etiologije HBPN. Mnogo let kasneje je sledilo spoznanje, da lahko senzibilizacije D-neg nosečnic učinkovito preprečujemo z vbrizgavanjem Ig anti-D po rojstvu D-poz otroka. Leta 1968 so tako v ZDA in v več državah v Evropi uvedli poporodno zaščito D-neg otročnic z Ig anti-D (4,8) in postavili smernice za preventivno vbrizganje Ig anti-D ob prekinitvi nosečnosti, invazivnih diagnostičnih postopkih in drugih

potencialnih senzibilizirajočih dogodkih med nosečnostjo (9). S tem se je tveganje za senzibilizacijo D-neg nosečnic, ki nosijo D-poz plod, zmanjšalo s 13,2 % na 1,6 % (4,10). Sredi 90. let je sledila uvedba predporodnega vbrizganja Ig anti-D, s katero preprečujemo senzibilizacije zaradi nezaznanih fetomaternalnih krvavitev (FMK) v zadnjem trimesečju nosečnosti. S tem ukrepom se je število senzibilizacij še dodatno zmanjšalo na 0,1–0,3 % (9). Podlaga za izvajanje preventivnega vbrizgavanja D-neg nosečnic z Ig anti-D v Sloveniji je *Pravilnik o trasfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji* (Pravilnik) (11). Leta 1970 smo v Sloveniji uvedli poporodno zaščito, nato tudi predporodno zaščito, ki je od leta 1994 obvezna. Leta 1997 so v materini krvi odkrili zunajcelično plodovo DNA (zcp-DNA), kar je vodilo k razvoju testov za določitev plodovega genotipa *RHD (D)* iz maternine krvi in uvedbo ciljane zaščite z Ig anti-D. Ig anti-D prejmejo le tiste D-neg nosečnice, ki nosijo D-poz plod. Ciljano zaščito so kot rutinski test l. 2010 uvedli na Danskem, l. 2011 na Nizozemskem, l. 2014 na Finskem, po posameznih regijah pa so sledile tudi Francija, Anglija, Švedka in Belgija (10). Glede na spremembo Pravilnika v maju leta 2018 uvajanje ciljane zaščite poteka tudi v Sloveniji. Izvajamo določitev plodovega *D* v 25. do 26. tednu nosečnosti in se nato odločimo o vbrizganju Ig anti-D. Pravilnik določa tudi popolno uvedbo ciljane zaščite v roku dveh let (11-14).

3 Sistem Rh

Sistem Rh predstavlja kompleksno skupino eritrocitnih Ag, ki jih kodirata dva gena, gen *D in RHCE (CE)*, ki ležita na prvem kromosomu. *D* kodira Ag D, *CE* določa Ag C, c, E in e (5). Gena *D in CE* sta sestavljena iz 10 eksonov in intronov. Produkti genov so polipeptidi,

ki dvanajstkrat prečkajo membrano eritrocita ter so polno razviti že ob rojstvu, zaznamo pa jih lahko že v osmem tednu nosečnosti (5). Glede na gen *D* je lahko posameznikov fenotip D-poz, D-neg ali D-var. V primeru, da je D-neg ali D-var oseba, ki ni šibki D tip 1, 2 in 3, izpostavljena Ag D, lahko pride do tvorbe protiteles anti-D.

V populaciji belcev je D-poz 85 %, v podsaharski Afriki 95 % ter v azijski populaciji več kot 99,5 % populacije (15). Osebe, ki so D-neg, bodisi nimajo gena *D* (delecija gena), bodisi se ta zaradi različnih sprememb v genu ne izrazi. Za populacijo belcev je značilna delecija gena *D*, za populacijo črncev je značilno, da so D-neg oblike posledica delecije gena *D*, mutacij v genu *D* ali hibridnih genov *D-CE-D* (5,15).

4 Variante (različice) gena *D*

Prvo obliko D-var, takrat poimenovali D^u , so odkrili leta 1946. D-var razdelimo na šibke D, parcialne D in D_{el} . Molekularni vzroki oz. spremembe v genu *D*, ki vodijo v nastanek D-var, so lahko polimorfizmi enega nukleotida (*angl.* single nucleotide polymorphism, SNP), ki vodijo v zamenjavo ene ali več aminokislin v citoplazemskem, transmembranskem ali zunajceličnem predelu proteina D, rekombinacije, ki so razlog za nastanek hibridnih genov *D-CE*, delecije in insercije.

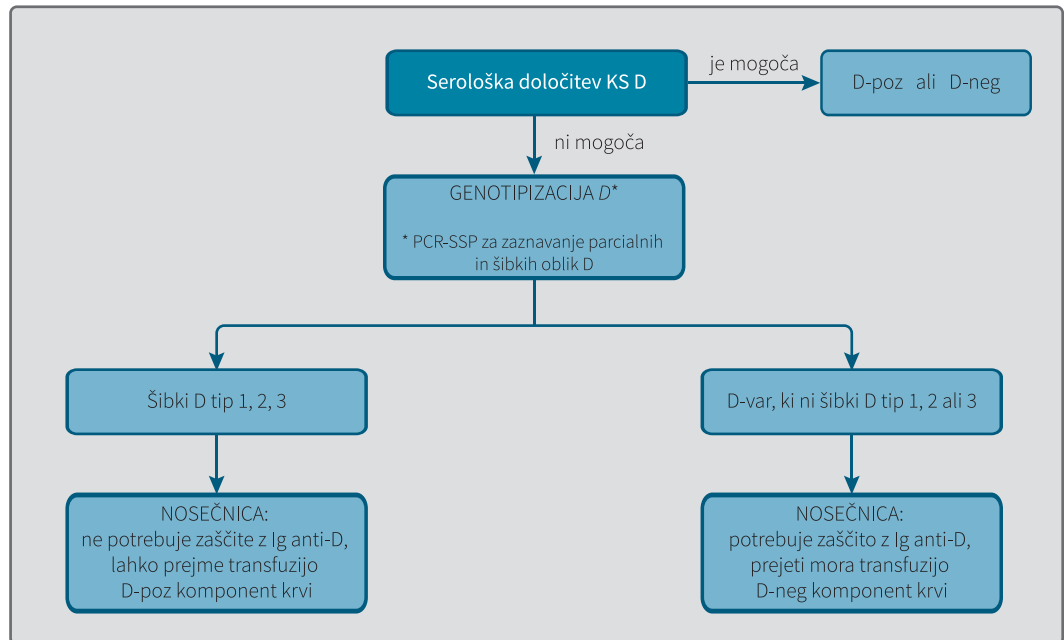
Za šibke oblike D je značilno, da na površini celic izražajo Ag D, ki ima izražene vse epitope, le njihovo število na površini eritrocitov je manjše (15-17). Normalna gostota Ag D na površini eritrocitov je od 13.000 do 24.000 Ag D/eritrocit (15,18), šibki D pa na eritrocitni površini izražajo od 70 do 4.000 Ag D, v 95 % nad 400 Ag D. Za šibke oblike D so značilne zamenjave aminokislin v transmembranskem ali citoplazemskem

delu proteina D. Serološko šibka oblika D lahko nastane tudi kot posledica supresivnega učinka *Cde* v trans-položaju. Ti Ag so lahko včasih tudi kvalitativno spremenjeni, takrat pa govorimo o šibkih parcialnih Ag D (5,7,18).

Za parcialne oblike D so značilne spremembe v aminokislinskem zaporedju, ki spremenijo zunajcelični del proteina D, zato lahko osebe s temi oblikami D-var ob izpostavljenosti normalnemu Ag D tvorijo protitelesa anti-D (5). Parcialni D imajo lahko na površini eritrocitov normalno ali znižano gostoto Ag D. Zanje je značilno, da so ti Ag kvalitativno spremenjeni (15,18).

D_{el} je oblika D-var, ki je značilna za populacijo azijskega porekla (19). D_{el} eritrociti z rutinskimi serološkimi preiskavami reagirajo kot D-neg in jih lahko zaznamo le s tehniko adsorpcije in elucije. Število Ag D na D_{el} eritrocitih je pod 22–36. V literaturi so opisani primeri tvorbe protiteles anti-D po transfuziji D-neg prejemnika z D_{el} eritrociti (15,18,20,21).

Frekvenca D-var je odvisna od etnične pripadnosti, v različnih populacijah se pojavlja pri 0,3–1,7 %. Za belce je značilno, da ima od 0,2 % do 1 % populacije prisotne alele *D*, ki kodirajo serološko šibke oblike Ag D. 95 % serološko šibkih tipov pri belcih predstavljajo šibki D tip 1, 2, 3, ki ob stiku z D-poz eritrociti ne tvorijo protiteles anti-D (17,22,23,25). Frekvenca pojavljanja posameznih oblik šibkih D se razlikuje med posameznimi evropskimi državami. Glede na vse oblike šibkega D je frekvenca šibkega D tipa 1 v Nemčiji 60–65 %, v Španiji 49 %, v Franciji 46 %, na Tirolskem 33 % in na Portugalskem 16 %. Frekvenca šibkega D tipa 2 je na Portugalskem 64 %, v Franciji in Španiji 32–33 %, v Nemčiji 17–27 % ter na Tirolskem 8 %. Šibki D tip 3 pa ima v populaciji Tirolske frekvenco 50 %, v Nemčiji 4–17 %, na Portugalskem 14 %, v



Slika 1: Algoritem določanja KS D pri nosečnicah in njihova nadaljnja obravnava glede na tip KS D.

Španiji 9 % in v Franciji 5 % (24-27). Šibki tipi D predstavljajo v slovenski populaciji 0,4 % in 75–84 % D-var. Od vseh oblik šibkega D je najpogostejši šibki D tip 1 s frekvenco 43–47,2 %, sledita šibki D tipov 2 in 3 s frekvenco 22,5–26,3 % (25,31). Parcialne oblike D se pogosteje pojavljajo med črnsko populacijo, med katerimi so najpogostejše oblike kategorija IIIa, IIIb, IVa in Va. Pri belcih je najpogostejša parcialna oblika D kategorija VI, pojavlja se v 0,02–0,05 % (28-29). V Nemčiji se D kategorija VI tipa II pojavlja s frekvenco 1:6200 (28-30), v Veliki Britaniji s frekvenco 1:4000 (4,20,30-32). Parcialni D se v slovenski populaciji pojavljajo pri 0,05 % celotne populacije, med njimi je najpogostejša D kategorija VI tipa II s frekvenco 1:5058, sledijo ji D kategorija V, VII, DFR (4,25,31). D_{el} oblike so značilne za azijsko populacijo. Pri njih se

pojavljajo pri 10–33 % serološko D-neg posameznikov (24). Pri belcih je frekvenca D_{el} oblik izjemno redka (19), v eni od raziskav le 0,03 % (32). V Sloveniji smo do sedaj našli dva alela D_{el} (4,33).

5 Določanje antigena D

Ag D lahko določamo serološko ali predvidimo njegovo prisotnost na podlagi molekularnobioloških metod. Pri serološkem določanju uporabljamo komercialne reagente z različnimi specifičnostmi protiteles. Poznamo različne monoklonske (specifične za določen epitop) ali poliklonske (specifične za več epitopov) reagente (5,22). Različni monoklonski reagenti kažejo z D-var eritrociti reakcije različnih jakosti, zato opredelitev tipa D-var le na podlagi seroloških testiranj ni mogoča (1,22). V primeru, da

eritrociti z reagentom anti-D ne dajejo močno pozitivnega rezultata, govorimo o serološko šibkih oblikah Ag D oz. o D-var. Ker je najbolj imunogena in najpogostejša parcialna oblika D-var v populaciji belcev D kategorija VI, pri nas in v ostalih evropskih državah določamo nosečnicam in prejemnikom transfuzij Ag D z monoklonskimi reagenti, ki ne zaznavajo D kategorije VI. Zato so taki bolniki opredeljeni kot D-neg. D-var lahko serološko natančneje oz. delno opredelimo z monoklonskimi protitelesi z znano specifičnostjo za posamezne epitope. Iz kombinacij rezultatov lahko sklepamo, ali gre za šibko ali parcialno obliko Ag D. Ker s serološkimi metodami ne moremo določiti, ali gre pri posamezniku za šibki D tip 1, 2, 3, ki jih lahko obravnavamo kot D-poz, ali za katero koli drugo obliko serološko šibkega D, ki jo moramo obravnavati kot D-neg, so potrebna dodatna testiranja z molekularnobiološkimi metodami. Najpogosteje uporabimo metodo PCR s sekvenčno specifičnim prileganjem, tj. s PCR-SSP (*angl.* Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Priming) (34-35).

6 Vzorci in metode dela

Vzorci periferne venske krvi smo nosečnicam odvzeli v standardne epruvete z antikoagulantom etilendiamintetraocetno kislino (EDTA) ter rutinsko določitev KS D v začetku nosečnosti ali pa za preventivno zaščito z Ig anti-D. Vsem nosečnicam smo KS D na ploščici določili po navodilih proizvajalca s komercialnim reagentom Seraclone anti-D in na gelu s testnim sistemom z gelskimi karticami DiaClon ABO/D + Reverse Grouping (monoclonal antibodies) (Bio-Rad, Nemčija), s katerimi ne zaznamo KS D kategorije VI. Pri 49 nosečnicah smo zaradi šibkeje pozitivnih rezultatov opravili razširjeno serološko testiranje KS D s komercialnim setom ID-Partial RhD Typing Set (Bio-Rad, Nemčija). Za dokončno opredelitev KS D smo nadaljevali z molekularnobiološkimi metodami. DNA smo iz polne krvi osamili po navodilih proizvajalca z uporabo aparata BioRobot EZ1 in komercialnega seta EZ1 DNA Blood 350 µl Kit (Qiagen, Nemčija). Določitev genotipa D smo po navodilih proizvajalca opravili z metodo

	Šibki D tip 1	Šibki D tip 2	Šibki D tip 3	Šibki D tip 1 in tip 3	D kategorija VII	D kategorija VI tip 2	Parcialni RHD DNB	Neznana D-var	Skupaj
Število	17	10	13	1	5	1	1	1	49
%	34.7	20.4	26.5	2.0	10.2	2.0	2.0	2.0	100.0
Tveganje za tvorbo anti-D in kandidatka (nosečnica) za prejem Ig anti-D	ne				da				
Transfuzija eritrocitov	lahko D-poz				D-neg				
	41				8				
	83.7 %				16.3 %				

Tabela 1: Rezultati genotipizacije D ter njihova obravnava.

PCR-SSP z uporabo komercialnih setov RBC-Ready Gene CDE, RBC-Ready Gene D weak and RBC-Ready Gene D AddOn (Inno-Train; Nemčija). Po končanem pomnoževanju v aparatu Veriti (Applied BioSystems, ZDA) smo produkt reakcij PCR glede na njihovo dolžino z elektroforeznim sistemom (BioRad, ZDA) ločili na agaroznem gelu (Sigma, Nemčija).

7 Rezultati

Glede na rezultate testiranja 49 vzorcev periferne krvi nosečnic in tveganja za tvorbo aloprotiteles, 41 (83,7 %) testiranih nosečnic, ki so nosilke šibkih D tip 1, 2, 3, ne potrebuje pred- in poporodne zaščite z Ig anti-D. Prav tako lahko, glede na podatke iz literature, varno prejmejo D-poz komponente krvi. Pri nosilkah ostalih D-var, 8 primerov (16,3 %), pa je zaradi tveganja za aloimunizacijo potrebna ustrezna zaščita z Ig anti-D med nosečnostjo in morebitno po porodu (če je novorojenec D-poz ali D-var), v primeru potrebe po transfuziji pa transfuzija D-neg enot krvi. Algoritem določanja KS D pri nosečnicah in njihova nadaljnja obravnava glede na tip KS D je prikazan na Sliki 1 (1,34-36). Rezultati testiranja 49 nosečnic so prikazani v Tabeli 1. Primerov D-var, kategorije VI, nismo odkrili, saj pri serološkem določanju Ag D uporabljamo monoklonska protitelesa, ki ne zaznajo D kategorije VI, zato so take nosečnice opredeljene kot D-neg.

8 Razpravljanje

Ag D je zelo imunogen, zato je natančna določitev KS D pomembna za nadaljnjo obravnavo nosečnic, krvodajalcev in bolnikov, ki potrebujejo transfuzijo krvi. Osnovna metoda za določitev Ag D je serološka. Zaradi izjemne kompleksnosti sistema D kljub uporabi

različnih reagentov anti-D le s serološkimi preiskavami večinoma ne moremo razlikovati med različnimi D-var. Zato v primeru nejasne serološke določitve D nadaljujemo z molekularnobiološkimi metodami.

V raziskavi smo ugotovili, da je med slovenskimi nosečnicami najpogostejša oblika D-var šibki D tip 1, sledita mu šibki D tip 3 in 2. Frekvenca se ujema s predhodnimi podatki o pojavljanju šibkih oblik D v slovenski populaciji (4,25,31). Po primerjavi s sosednjimi evropskimi državami smo najbolj podobni populaciji Tirolske (4). Parcialne oblike D so značilne za črnsko populacijo, vendar so zaradi imunogenosti pomembne tudi pri belcih. Osebe, ki so nosilci parcialnega D kategorije VI, lahko po stiku z D-poz eritrociti tvorijo anti-D, pri D-poz novorojenčkih, katerih matere so nosilke D kategorije VI in tvorijo aloprotitelesa anti-D, pa se lahko razvije huda oblika HBPN. Zato v Sloveniji, kot tudi v ostalih evropskih državah, nosečnicam in prejemnikom transfuzij določimo serološko obliko D z monoklonskimi protitelesi, ki ne zaznajo D kategorije VI. Tako nosečnice, ki so sicer nosilke D kategorije VI, obravnavamo kot D-neg, prejemniki transfuzij pa prejmejo D-neg transfuzije. Na drugi strani pa krvodajalce, ki so nosilci D kategorije VI, obravnavamo kot D-poz. Njihovo kri lahko prejmejo le D-poz osebe (4). S tem si lahko razložimo, zakaj je v naših rezultatih najpogostejša parcialna oblika D med nosečnicami D kategorija VII in ne D kategorija VI, saj jo zaznamo kot D-neg.

Odkritje Ig anti-D sredi 60. let prejšnjega stoletja je pomembno znižalo obolevnost in smrtnost zaradi HBPN. Čeprav je Ig anti-D varno zdravilo, gre vseeno za produkt humanega izvora, ki ga pridobivamo z zlivanjem plazme aktivno imuniziranih darovalcev. Ker gre za zdravilo iz krvi, obstaja, sicer zelo nizko,

tveganje za prenos okužb z do sedaj znanimi ali neznanimi povzročitelji. V nekaterih delih sveta se pojavljajo tudi težave s preskrbo zadovoljive količine plazme z visokim titrom protiteles anti-D (37), Evropska agencija za zdravila (European Medicines Agency, EMA) pa že določa omejeno imuniziranje D-neg prostovoljcev, zato bo zadostnost količin pripravka v prihodnosti vprašljiva (38). Zato je pomembno določiti primeren algoritem, s katerim po eni strani preprečujemo aloimunizacijo nosečnic in nastanek HBPN, na drugi strani pa nepotrebno dajanje Ig anti-D.

V preteklosti se je določanje Ag D in obravnava nosečnic glede na tip D spreminjala. Sprva so bile nosečnice s serološko šibkimi oblikami D obravnavane kot D-poz in niso prejele zaščite z Ig anti-D (priporočila Ameriškega združenja krvnih bank (*angl.* American Association of Blood Banks, AABB) iz leta 1981 ter Ameriškega združenja porodničarjev in ginekologov (*angl.* American College of Obstetricians and Gynecologist, ACOG)) (20). Z vse večjim poznavanjem genetskih informacij o lokusu *D* in *CE* in primerov tvorbe protiteles anti-D pri nekaterih oblikah seroloških šibkih *D* je prišlo do sprememb priporočil za določitev Ag *D* in obravnavo nosečnic. Daniels je leta 2013 priporočil naslednji algoritem: nosečnice, ki jih serološko določimo, da so *D*-neg, potrebujejo zaščito z Ig anti-*D*, če so *D*-poz, je ne potrebujejo. V primeru nejasne serološke določitve *D* pa priporoča genotipizacijo gena *D*. Če je nosečnica nosilka šibkega *D* tipa 1, 2 ali 3, jo lahko obravnavamo kot *D*-poz, v primeru katere koli druge *D*-var pa kot *D*-neg. Enako je leta 2015 priporočil tudi Sandler (15,20).

Sandler je ugotovil, da bi lahko, glede na frekvenco *D*-var v rasno mešani populaciji Združenih držav Amerike, z natančno določitvijo serološko šibkih oblik

D letno preprečili dajanje 24.700 injekcij Ig anti-*D* (20). Za slovensko populacijo, v kateri je bilo v zadnjih petih letih v povprečju 21.020 rojstev na leto (39), je značilno, da imajo šibki tipi *D* frekvenco 0,4 % ter predstavljajo 80 % vseh *D*-var. Tako vsako leto odkrijemo približno 105 (0,5 %) nosečnic, ki so nosilke *D*-var. Izmed teh je približno 84 (80 %) nosečnic nosilk šibkih *D* tipa 1, 2 in 3, ki ne potrebujejo perinatalne zaščite z Ig anti-*D*. Vsaka od teh nosečnic bi po nepotrebem prejela Ig anti-*D* v 28. tednu nosečnosti. Ker je v populaciji belcev od 80–85 % *D*-poz ljudi in torej od 15–20 % *D*-neg ljudi (40,41), med *D*-poz pa 44 % homozigotov (*D/D*) in 56 % heterozigotov (*D/d*) (42), lahko izračunamo, da bi približno 67 nosečnic (80 %) s *KS D*-var (in torej večinoma z genotipom *D/d*) po nepotrebem dobilo perinatalne zaščite z Ig anti-*D* tudi po porodu *D*-poz otroka, približno 21 (25 %) izmed njih tudi zaradi potencialnih senzibilizirajočih dogodkov med nosečnostjo (krvavitev, amniocenteza ...) (20). Po izračunu bi tako pri približno 84 nosečnicah prihranili približno 172 nepotrebnih vbrizganj Ig anti-*D* na leto.

9 Zaključek

Natančna določitev *KS D* je pomembna glede nadaljnje obravnave nosečnic, krvodajalcev in prejemnikov transfuzij. Standardna metoda za določitev Ag *D* je danes še vedno serološka. Sistem *Rh* je zelo polimorfen in vodi v različne fenotipe, *D*-poz, *D*-neg ali *D*-var. Slednje razdelimo na šibke *D*, parcialne *D* ali *D_{el}*. Danes vemo, da ljudje, ki so nosilci alelov za šibke *D* tipa 1, 2 ali 3, ob stiku z *D*-poz eritrociti, glede na dosedanje izkušnje, ne bodo tvorili aloprotiteles anti-*D*. Zato selektivna integracija molekularnobioloških metod za določitev genotipa *D* v laboratorijsko prakso pred-

stavlja podporno metodo pri določitvi KS D in je močno pripevala k napredku porodniških in tudi transfuzijskih protokolov. Tako lahko zmanjšamo nepotrebno vbrizganje Ig anti-D pri določenih D-var nosečnicah in nepotrebne transfuzije D-neg krvi pri tistih bolnikih z D-var, ki lahko varno prejmejo D-poz

kri (nosilci šibkih D tipa 1, 2, 3). Na ta način lahko varčujemo z zalogami Ig anti-D in D-neg enotami krvi. Z uvedbo ciljane zaščite D-neg nosečnic z Ig anti-D pa pričakujemo, da bomo naredili še dodatni korak pri optimalni uporabi zdravila Ig anti-D (43-46).

Literatura

1. Investigation strategy for RhD typing discrepancies using a combination of PCR-SSP and serological techniques [cited 2017 Sept 3]. Available from: www.aabb.org/development/scholarships/Documents/11er.pdf
2. Sandler SG, Queenan JT. A Guide to Terminology for Rh Immunoprophylaxis. *Obstet Gynecol.* 2017 Sep;130(3):633–5. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002190> PMID:28796682
3. Koelewijn JM, Vrijkotte TG, van der Schoot CE, Bonsel GJ, de Haas M. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in Neetherlands. *Trasfusion.* 2008;48(5):941–52. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01625.x>.
4. Dovč T. Določanje plodovega genotipa RHD iz plazme RhD-negativnih nosečnic z metodo PCR v realnem času. [PhD Thesis]. Ljubljana: T. Dovč; 2013.
5. Westhoff CM. The Rh System. In: Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, editors. *AABB Technical Manual.* 16th ed. 2005. pp. 315–32.
6. Flegl WA, Castilho SL, Keller MA, Klapper EB, Moulds JM, Noizat-Pirenne F, et al. Molecular immunohaematology round table discussions at the AABB Annual Meeting, Philadelphia 2014. *Blood Trasfusion* 2015;1–9.
7. Yousuf R, Mustafa AN, Ho SL, Tang YL, Leong CF. Anti-G with concomitant anti-C and anti-D: A case report in a pregnant woman. *Asian J Transfus Sci.* 2017 Jan-Jun;11(1):62–4. <https://doi.org/10.4103/0973-6247.200770> PMID:28316444
8. Bowman J. Thirty-five years of Rh prophylaxis. *Transfusion.* 2003 Dec;43(12):1661–6. <https://doi.org/10.1111/j.0041-1132.2003.00632.x> PMID:14641860
9. Koelewijn JM, de Haas M, Vrijkotte TG, van der Schoot CE, Bonsel GJ. Risk factors for RhD immunisation despite antenatal and postnatal anti-D prophylaxis. *BJOG.* 2009 Sep;116(10):1307–14. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2009.02244.x> PMID:19538414
10. van der Schoot C, deHaas M, Clausen FB. Genotyping to prevent Rh disease: has the time come? *Transfusion medicine and immunohematology* 2017;24:544–50. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000379>.
11. Pravilnik o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji (Ur. l. RS, št. 9/07 in 32/18) [cited 2018 Jun 8]. Available from: <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=PRAV7368>
12. Pravilnik o spremembah Pravilnika o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji. (Ur. l. RS, št. 32/18).
13. Bricl I. Ciljana zaščita z IgG anti-D. Neinvazivna določitev plodovega genotipa RhD iz periferne krvi RhD-negativnih nosečnic. In: Stezinar SL, ur. Zbornik predavanj strokovnih srečanj Združenja za transfuzijsko medicino Slovenije; 2017; Zreče, Slovenija. V Ljubljani: Slovensko zdravniško društvo; 2017. p. 31.
14. Koelewijn JM, de Haas M, Vrijkotte TG, Bonsel GJ, van der Schoot CE. One single dose of 200 microg of antenatal RhIG halves the risk of anti-D immunization and hemolytic disease of the fetus and newborn in the next pregnancy. *Transfusion.* 2008 Aug;48(8):1721–9. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01742.x> PMID:18507749
15. Daniels G. Variants of RhD—current testing and clinical consequences. *Br J Haematol.* 2013 May;161(4):461–70. <https://doi.org/10.1111/bjh.12275> PMID:23432139
16. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood.* 1999 Jan;93(1):385–93. <https://doi.org/10.1182/blood.V93.1.385> PMID:9864185
17. Wagner FF, Flegel WA. The Rhesus site. *Transfus Med Hemother.* 2014 Oct;41(5):357–63. <https://doi.org/10.1159/000366176> PMID:25538538
18. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Müller TH, et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood.* 2000 Apr;95(8):2699–708. <https://doi.org/10.1182/blood.V95.8.2699> PMID:10753853
19. Li Q, Hou L, Guo ZH, Ye LY, Yue DQ, Zhu ZY. Molecular basis of the RHD gene in blood donors with DEL phenotypes in Shanghai. *Vox Sang.* 2009 Aug;97(2):139–46. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01181.x> PMID:19490579
20. Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, Denomme GA, Delaney M, Keller MA, et al.; College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion.* 2015 Mar;55(3):680–9. <https://doi.org/10.1111/trf.12941> PMID:25438646

21. Horn T. Use of RHD Genotyping for Serologic Weak D Phenotypes. American Red cross. [cited 2018 Jun 8]. Available from: <http://www.ascls-nj.org/Documents/Speaker%20Handouts%202016%20SS/Use%20of%20RHD%20Genotyping%20for%20Serologic%20Weak%20D%20Phenotypes%20-%20ASCLS%20NJ%20TH%202016.pdf>
22. Haspel RL, Westhoff CM. How do I manage Rh typing in obstetric patients? *Transfusion*. 2015 Mar;55(3):470–4. <https://doi.org/10.1111/trf.12995> PMID:25647404
23. Sandler SG, Roseff SD, Domen RE, Shaz B, Gottschall JL. Policies and procedures related to testing for weak D phenotypes and administration of Rh immune globulin: results and recommendations related to supplemental questions in the Comprehensive Transfusion Medicine survey of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 May;138(5):620–5. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0141-CP> PMID:24786120
24. Müller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schönitzer D, et al. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion*. 2001 Jan;41(1):45–52. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2001.41010045.x> PMID:11161244
25. Dovc Drnovsek T, Rozman P. The distribution of different RHD variants in Slovenian population [abstract]. *Transfus Clin Biol*. 2006;13:174–5.
26. Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Le Pennec PY, Roussel M, Patereau C, Noizat-Pirenne F. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion*. 2004 Sep;44(9):1282–6. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.04063.x> PMID:15318849
27. Araújo F, Rodrigues MJ, Monteiro F, Chabert T, Tavares G, Sousa G, et al. Weak D type 2 is the most prevalent weak D type in Portugal. *Transfus Med*. 2006 Feb;16(1):63–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2005.00638.x> PMID:16480441
28. Wagner FF, Kasulke D, Kerowgan M, Flegel WA. Frequencies of the blood groups ABO, Rhesus, D category VI, Kell, and of clinically relevant high-frequency antigens in south-western Germany. *Infusionsther Transfusionsmed*. 1995 Oct;22(5):285–90. PMID:8924742
29. Leader KA, Kumpel BM, Poole GD, Kirkwood JT, Merry AH, Bradley BA. Human monoclonal anti-D with reactivity against category DVI cells used in blood grouping and determination of the incidence of the category DVI phenotype in the DU population. *Vox Sang*. 1990;58(2):106–11. PMID:2111059
30. van Rhenen DJ, Thijssen PM, Overbeeke MA. Serological characteristics of partial D antigen category VI in 8 unrelated blood donors. *Vox Sang*. 1994;66(2):133–6. <https://doi.org/10.1159/000462492> PMID:8184595
31. Ruprecht RR, Pretnar Hartman K, Galvani V, Rožman P, Čurin Šerbec V. Weak D and partial D in Slovenian population through serology and genotyping. *Pflugers Arch*. 2000;440 S1:R195–6. <https://doi.org/10.1007/s004240000062>.
32. Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet*. 2001;2:10. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-2-10> PMID:11495631
33. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Three molecular structures cause rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematologic features. *Blood*. 1998 Mar;91(6):2157–68. https://doi.org/10.1182/blood.V91.6.2157.2157_2157_2168 PMID:9490704
34. Avent ND. RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges. *Methods Mol Biol*. 2008;444:185–201. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-066-9_14 PMID:18425481
35. Clarke G, Hannon J, Berardi P, Barr G, Cote J, Fallis R, et al. Resolving variable maternal D typing using serology and genotyping in selected prenatal patients. *Transfusion*. 2016 Dec;56(12):2980–5. <https://doi.org/10.1111/trf.13798> PMID:27611891
36. Garratty G. Do we need to be more concerned about weak D antigens? *Transfusion*. 2005 Oct;45(10):1547–51. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.00625.x> PMID:16181202
37. Kumpel BM. Efficacy of RhD monoclonal antibodies in clinical trials as replacement therapy for prophylactic anti-D immunoglobulin: more questions than answers. *Vox Sang*. 2007 Aug;93(2):99–111. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2007.00945.x> PMID:17683353
38. Overview of comments received on 'Draft Guideline on the core SmPC for human Anti-D immunoglobulin for intravenous use' (EMA/CHMP/BPWP/319619/2005 Rev. 2). [cited 2018 Jun 8]. Available from: www.ema.europa.eu
39. Statistični urad republike Slovenije, SURS. [cited 2018 Jun 8]. Available from: <http://www.stat.si/StatWeb/Field/Index/17>
40. Daniels G. Rh blood group system. In: Daniels G, editor. *Human Blood Groups*. Oxford: Blackwell Science Ltd; 2002. pp. 195–274. <https://doi.org/10.1002/9780470987018.ch5>.
41. Dovc-Drnovšek T, Klemenc P, Toplak N, Blejcek T, Brčić I, Rožman P. Reliable Determination of Fetal RhD Status by RHD Genotyping from Maternal Plasma. *Transfus Med Hemother*. 2013 Feb;40(1):37–43. <https://doi.org/10.1159/000345682> PMID:23637648
42. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000 Jan;95(2):375–87. <https://doi.org/10.1182/blood.V95.2.375> PMID:10627438
43. Kacker S, Vassallo R, Keller MA, Westhoff CM, Frick KD, Sandler SG, et al. Financial implications of RHD genotyping of pregnant women with a serologic weak D phenotype. *Transfusion*. 2015 Sep;55(9):2095–103. <https://doi.org/10.1111/trf.13074> PMID:25808011
44. Flegel WA, Roseff SD, Tholpady A. Phasing-in RHD genotyping. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 May;138(5):585–8. <https://doi.org/10.5858/2013-0509-ED> PMID:24786114

45. Denomme GA, Wagner FF, Fernandes BJ, Li W, Flegel WA. Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion*. 2005 Oct;45(10):1554–60. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.00586.x> PMID:16181204
46. Drnovšek DT. Molekularno-biološke preiskave za določanje krvnih skupin na Zavodu RS za transfuzijsko medicino. In: Stezinar SL, ur. Zbornik predavanj strokovnih srečanj Združenja za transfuzijsko medicino Slovenije; 2017 Apr 7-8; Zreče, Slovenija. V Ljubljani: Slovensko zdravniško društvo; 2017. p. 28–30.