




Smjernice Hrvatskog društva za transfuzijsku medicinu za određivanje Rh(D) krvne grupe i primjenu *RhD* genotipizacije

Guidelines of the Croatian Society for Transfusion Medicine for determination of Rh (D) blood group and application of *RhD* genotyping

Zrinka Kruhonja Galić¹ , Mirela Raos², Bojana Bošnjak³, Slavica Dajak⁴, Linda Caser⁵, Jasna Bingulac-Popović⁶, Ana Hećimović⁷, Sandra Jagnjić¹, Vesna Đogić⁶, Irena Jukić⁸

¹ Odjel za eritrocitnu dijagnostiku, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

² Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Klinički bolnički centar Zagreb

³ Klinički zavod za transfuzijsku medicinu, Klinički bolnički centar Osijek

⁴ Zavod za transfuzijsku medicinu, Klinički bolnički centar Split

⁵ Klinički zavod za transfuzijsku medicinu, Klinički bolnički centar Rijeka

⁶ Odjel za molekularnu dijagnostiku, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

⁷ Odjel za proizvodnju testnih reagencija, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

⁸ Medicinski odjel, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

Deskriptori

ODREĐIVANJE KRVNE GRUPE – metode;
Rh-Hr SUSTAV KRVNIH GRUPE – genetika, imunologija;
GENOTIP; GENSKJE VARIJACIJE; GENOTIPIZACIJA;
SEROLOŠKI TESTOVI – metode;
NEPODUDARNOST KRVNIH GRUPE – prevencija;
PRENATALNA DIJAGNOSTIKA – metode;
HEMOLITIČKA BOLEST FETUSA – prevencija;
Rh ISOIMUNIZACIJA – prevencija;
Rh IMUNOGLOBULIN – terapijska uporaba;
SMJERNICE; HRVATSKA

Descriptors

BLOOD GROUPING AND CROSSMATCHING – methods;
Rh-Hr BLOOD-GROUP SYSTEM – genetics, immunology;
GENOTYPE; GENETIC VARIATION;
GENOTYPING TECHNIQUES;
SEROLOGIC TESTS – metode; BLOOD GROUP
INCOMPATIBILITY – prevention and control;
PRENATAL DIAGNOSIS – methods;
ERYTHROBLASTOSIS, FETAL – prevention and control;
Rh ISOIMMUNIZATION – prevention and control;
Rho(D) IMMUNE GLOBULIN – therapeutic use;
PRACTICE GUIDELINES AS TOPIC; CROATIA

SAŽETAK. Radna skupina Hrvatskog društva za transfuzijsku medicinu pripremila je smjernice za određivanje Rh(D) krvne grupe i primjenu *RhD* genotipizacije. U smjernicama je opisan klinički značaj antigena D, povijest i ograničenja serološkog testiranja antigena D te mogućnosti *RhD* genotipizacije. Cilj smjernica bio je objava novih postupnika serološkog određivanja Rh(D) krvne grupe bolesnicima, trudnicama i novorođenčadi s uputama za specijaliste transfuzijske medicine u hitnom i redovnom radu te tumačenjima nalaza namijenjenim ginekolozima, pedijatrima, neonatolozima, anesteziolozima, internistima, liječnicima obiteljske medicine te svim liječnicima koji se u svom radu susreću s bolesnicima koji primaju krvne pripravke i donose odluku o primjeni RhIG imunoprolifakse. Kao rezultat provođenja smjernica predviđeno je praćenje i periodično izvještavanje u slučaju sumnje na RhD imunizaciju kod osoba nositelja D-varijante. Tijekom trudnoće postoji i mogućnost neinvazivnog određivanja prijenatalnog fetalnog *RhD* genotipa iz majčine plazme iza 16. tjedna gestacije, kao važnog alata u procjeni rizika razvoja hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta. Radi lakšeg snalaženja navedene su vrste spremnika za uzorkovanje krvi i potrebna količina uzoraka. Navedena pretraga dostupna je u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu na zahtjev ginekologa, a preporučuje se prvenstveno RhD imuniziranim trudnicama te u slučaju donošenja odluke o ranoj prijenatalnoj anti-D imunoprolifaksi i svim Rh(D) negativnim neimuniziranim trudnicama.

SUMMARY. The working group of the Croatian Society for Transfusion Medicine has prepared guidelines for the determination of Rh (D) blood group and the application of RhD genotyping. The guidelines describe clinical significance of D antigen, history and limitations of serological testing for D antigen, and possibility of RhD genotyping. The aim of the guidelines is to publish new procedures for serological determination of Rh (D) blood groups in patients, pregnant women and newborns with instructions for transfusion medicine specialists in emergency and regular work, and interpretations of findings for gynecologists, pediatricians, neonatologists, anesthesiologists, internists, and physicians who in their work meet patients who receive blood products and decide on the use of RhIG immunoprophylaxis. As a result of implementation of the guidelines, monitoring and periodic reporting in case of suspicion of RhD immunization in a person carrying the D variant is envisaged. During pregnancy there is a possibility of non-invasive determination of prenatal fetal RhD genotype from maternal plasma after the 16th week of gestation, as an important tool in assessing the risk of developing hemolytic disease of the fetus and newborn. For ease of reference, the types of blood sampling containers and the required quantity of samples are listed. This test is available at the Croatian Institute of Transfusion Medicine at the request of a gynecologist and is recommended primarily to RhD immunized pregnant women, and in case of decisions on early prenatal anti-D immunoprophylaxis for all Rh (D) negative non-immunized pregnant women.

✉ Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Zrinka Kruhonja Galić, dr. med., <https://orcid.org/0000-0001-8786-5610>
Odjel za eritrocitnu dijagnostiku, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, 10000 Zagreb,
e-pošta: zrinka.kruhonja.galic@hztm.hr

Primljeno 22. listopada 2021., prihvaćeno 25. veljače 2022.

Antigen D smatra se jednim od najvažnijih eritrocitnih antigena jer je vrlo imunogen za osobe koje su D-negativne. Aloimunizacija na antigen D opaža se u 90% D-negativnih primatelja koji prime D-pozitivnu krv te u 1 od 6 D-negativnih trudnoća s D-pozitivnom novorođenčadi, ukoliko nije primijenjen Rh imunoglobulin (RhIG).¹(2–3b) Anti-D protutijelo uzrokuje odgođenu hemolitičku transfuzijsku reakciju, a posebno je istaknuto u hemolitičkoj bolesti fetusa i novorođenčeta (HBFN). Stoga je određivanje antigena D i odabir D-podudarne krvi važan dio transfuzijske medicine.

Iako se određivanjem antigena D najčešće dobije jasno pozitivan, odnosno negativan rezultat, smetnje testiranja postoje u vrlo malog broja ljudi koji izražavaju D-varijante. Budući da su pojedine D-varijante klinički značajne, donošenje odluke o transfuzijskom liječenju ili o primjeni RhIG kod osoba s D-varijantom vrlo je složeno. Prije uvođenja molekularne dijagnostike, smetnje određivanja antigena D zaključivale bi se proglašavajući bolesnike i trudnice D-negativnima. Međutim, takav pristup uzrokovao je povećanu potrošnju dragocjenih zaliha D-negativne krvi i nepotrebno izlaganje žena RhIG. Novije spoznaje o D-varijantama i mogućnosti molekularne dijagnostike omogućuju kategorizaciju D-varijanti i drugačiji pristup u transfuzijskom liječenju i primjeni RhIG kod osoba s D-varijantom.

Antigen D pripada Rh sustavu, koji danas uključuje 55 antigena i jedan je od najpolimorfnijih sustava krvnih grupa. Rh proteini nose Rh antigene, ali su izraženi na eritrocitnoj membrani samo ukoliko je prisutan i RhAG protein. RhD protein izražava antigen D, dok RhCcEe protein nosi antigene C/c i E/e. Polipeptidi D i CE imaju po 12 transmembranskih domena, a sastoje se od 417 aminokiselina koje se razlikuju u svega 36 aminokiselina. Antigen D zastupljen je u 85% ispitanika bijele populacije, u 95% ispitanika iz Afrike i u >99,5% ispitanika iz istočne Azije.² (2a)

Kloniranjem i sekvenciranjem gena definirana je molekularna osnova Rh sustava. Opisani su različiti genetski mehanizmi koji doprinose varijacijama antigena D, kao što su delecije, insercije, konverzije i mutacije gena. Molekularnu osnovu D-varijanti istraživali su Wagner i suradnici.³ (2–3) Geni *RH* (*RHD*, *RHCE*) smješteni na 1. kromosomu koji kodiraju antigene D i CcEe su krajnje homologni jer su nastali duplikacijom, dok je gen koji kodira RhAG smješten na 6. kromosomu 40% homologan *RH* genima. Geni *RH* i gen *RHAG* sadrže po 10 egzona.

Za razliku od parcijalnih D-varijanti koje su većinom rezultat hibridnog gena u kojem je genskom konverzijom dio polipeptida RhD zamijenjen dijelom polipeptida RhCE u regijama izloženim na vanjskoj površini eritrocita, slabe D-varijante uglavnom proiz-

laze iz točkastih mutacija gena s promjenom jedne aminokiseline u transmembranskim i citosolnim regijama RhD polipeptida. Do danas je poznato >200 D varijanti.⁴ (2a,b)

Tijekom vremena, mijenjali su se nazivi za serološki slabo izražen antigen D. Izraz „D^u“, koji danas više nije u uporabi, se koristio za one antigene D koji su bili negativni u direktnoj aglutinaciji i pozitivni u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT). Stariji nazivi „D-kategorija“ i „mozaični D“ također se više ne koriste, a novije izraze „parcijalni D“, „slabi D“ i „DEL“ danas zovemo zajedničkim imenom „D-varijante“.⁵

Učestalost D-varijante u bijeloj rasi je oko 0,2% do 1%.⁶ Slabi D tip 1, 2 i 3 najčešće su D-varijante, s učestalosti oko 93% u bijeloj populaciji.³ Klinički najznačajnija D-varijanta u bijeloj populaciji jest parcijalni antigen DVI koji je zastupljen u 0,02% ispitanika.⁷ Učestalost D-varijanti je znatno veća u osoba afričkog podrijetla u odnosu na bijelu populaciju ili azijate. (2b)

Osobe nositelji D-varijante mogu stvoriti protutijelo anti-D ukoliko su bile izložene riziku imunizacije tijekom transfuzije, trudnoće ili transplantacije organa. Najčešći slabi D-tipovi 1, 2, 3 nisu povezani s RhD imunizacijom, što nije slučaj s drugim tipovima npr. 4,2 i 15.⁶ Svi parcijalni D su rizični za RhD imunizaciju. Parcijalni DVI je najčešća D-varijanta u bijeloj populaciji povezana s RhD imunizacijom.² (2a) Objavljena je teška HBFN kod D-pozitivnog novorođenčeta DVI majke s anti-D.⁸ U osoba afričkog podrijetla najčešće D-varijante koje su povezane s RhD imunizacijom jesu DIIIa i DAR.² Mnoge D-varijante su vrlo rijetke pa ne postoje podatci o RhD imunizaciji kod njihovih nositelja.

Razvoj smjernica

Pokušaji izrade smjernica u Republici Hrvatskoj za određivanje antigena D u bolesnika i trudnica sežu unatrag desetak godina, kada su u *Transfuziološkom vjesniku* objavljeni prvi algoritmi serološkog određivanja antigena D.⁹ I dok su smjernice za određivanje antigena D za dobrovoljne darivatelje krvi jasne i jednoznačne, to nije slučaj sa smjernicama za određivanje antigena D u bolesnika i trudnica. U svijetu je tijekom proteklih dvadesetak godina objavljeno niz radova o određivanju antigena D. Do danas nisu izrađene jedinstvene smjernice, što je i logično zbog velikih populacijskih razlika, iako se stavovi svjetskih stručnjaka u tom području značajno približavaju.^{10,11}

U proljeće 2018. godine pojavila se inicijativa Hrvatskog društva za transfuzijsku medicinu (HDTM) za održavanjem tečaja u cilju ujednačenog određivanja antigena D. Angažirani su stručnjaci u navedenom području iz Republike Hrvatske, koji su činili Radnu skupinu za donošenje smjernica. Do jeseni su proučili najnoviju literaturu te prikupili i analizirali višego-

dišnje rezultate rada u svojim transfuzijskim centrima/odjelima. Izrada smjernica nije financijski potpomognuta.

Na tečaju *RhD – izrada novih smjernica testiranja bolesnika i trudnica* i okruglom stolu održanom u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu (HZTM) 9. studenog 2018. predložene su smjernice. Na telekonferenciji održanoj 24. siječnja 2019. i sastancima Radne skupine održanim 10. svibnja i 5. srpnja 2019. usuglašeni su stavovi stručnjaka za ovo područje i donesene su ove smjernice.

Kliničke smjernice HDTM namijenjene su prvenstveno specijalistima transfuzijske medicine, ginekolozima, pedijatrima, neonatolozima, anesteziolozima, internistima, liječnicima obiteljske medicine te svim liječnicima koji se u svom radu susreću s bolesnicima koji primaju krvne pripravke i donose odluku o primjeni imunoprofilakse RhIG. Pri izradi ovih smjernica Radna skupina se koristila sustavom GRADE (engl. *Grading of Recommendation Assessment, Development and Evaluation*) međunarodne skupine stručnjaka za donošenje smjernica utemeljenih na dokazima, koji uz snagu preporuke prikazuje i razinu dokaza.¹²

Povijest i ograničenja serološkog testiranja antigena D

Otkada su Kohler i Mildstein 1975. patentirali i razvili tehnologiju proizvodnje monoklonskih protutijela i za to zasluženo nagrađeni Nobelovom i Landsteinerovom nagradom, nekoliko skupina znanstvenika pokušalo je proizvesti monoklonska protutijela koja bi se koristila u području serologije krvnih grupa. Prva saznanja o tome prikazana su na Prvom simpoziju o monoklonskim protutijelima specifičnim za krvnu grupu (*1st Symposium of blood group specific monoclonal antibodies*) 1982. u Cambridgeu i kasnije na Prvoj međunarodnoj radionici (*1st International workshop*) 1987. u Parizu. Proizvodnja mišjih monoklonskih protutijela bila je vrlo uspješna, pogotovo za sustav krvnih grupa ABO i MN. Međutim, proizvodnja monoklonskih reagensa za antigen D je kasnila. Razlog tomu je proizvodni proces, koji je, zbog kompleksnosti antigena D, puno složeniji u odnosu na proces proizvodnje monoklonskih protutijela ABO. Dok su se za antigene ABO i MN koristili mišji hibridomi, za antigen D bilo je nužno transformirati humane limfocite B u stabilne stanične linije. Prvi monoklonski reagensi za određivanje antigena D prikazani su na Drugoj međunarodnoj radionici (*2nd International workshop*) u Lundu 1990. godine.¹³

Do pojave monoklonskih protutijela, u dijagnostici antigena D koristila su se poliklonska protutijela. Budući da su poliklonska protutijela imunoglobulini IgG razreda, za potrebe direktne aglutinacijske metode reagensi su se pripremali u visokoproteinskom mediju

(22–30% albumin), a radi boljeg aviditeta dodavali su se potencijatori (metilceluloza, polivinilpirolidon (PVP), polibren, dekstran, fikol). Serum za proizvodnju poliklonskih reagensa s protutijelima anti-D dobivao se od imuniziranih trudnica ili putem imunizacije D-negativnih osoba s D-pozitivnim eritrocitima podudarnim u svim ostalim klinički značajnim antigenima. Nedostaci takvog načina dobivanja reagensa bili su ograničeni izvori, pitanje etičnosti, nekonzistentnost serija te potencijalna infektivnost, a korištenje visokoproteinskog medija rezultiralo je češćim lažno pozitivnim rezultatima, što zbog serumskih čimbenika, odnosno obloženosti eritrocita te zbog *rouleaux* fenomena uslijed duže inkubacije i evaporacije.

U odnosu na njih, prednost monoklonskih reagensa jest dostupnost u velikim količinama, neovisnost o izvoru, humaniji i etičniji pristup, prihvatljiva cijena, konzistentnost i stabilnost serija, reproducibilnost rezultata, jača reaktivnost u odnosu na poliklonske reagentse te preciznost. Preciznost je uvjetovana uskom specifičnošću koja podrazumijeva vezivanje protutijela, koja su nastala iz jedinstvenog staničnog klona, za dio antigena kojeg nazivamo epitop. Svaki pojedini klon veže se isključivo na određeni i uvijek isti epitop. Monoklonska protutijela razreda IgM, kao i kemijski modificirana monoklonska protutijela razreda IgG, pripremaju se u niskoproteinskim medijima, što doprinosi rijetkim pojavama lažno pozitivnih rezultata. Zbog svojih su karakteristika monoklonski reagensi vrlo brzo u praksi zamijenili do tada korištene poliklonske reagentse.¹⁴ (2a,b)

Međutim, uvođenjem monoklonskih reagensa u određivanju antigena D javljaju se problemi u interpretaciji rezultata. Upravo uska specifičnost, karakteristična za monoklonske reagentse, može uzrokovati razliku rezultata kod određivanja antigena D s malim brojem antigenih mjesta i promijenjenim epitopima. Kvantitativne i kvalitativne razlike antigena D sve više dolaze do izražaja. Javljaju se razlike rezultata u odnosu na poliklonske reagentse, ali i unutar monoklonskih reagensa različitih staničnih linija ili istih staničnih linija, ali različitih faktora dilucije i/ili primijenjenih seroloških tehnika.¹⁴

Područje sive zone obuhvaća do 1% nejasnih rezultata. Nejasnoće se javljaju u smislu definiranja pozitivnog ili negativnog rezultata, odnosno procjene imuno-genosti pojedinih D-varijanti i mogućnosti razvoja RhD aloimunizacije.¹⁴

Serološko određivanje Rh(D) krvne grupe (2,A)

Bolesnicima i trudnicama antigen D se određuje monoklonskim reagensima koji ne smiju otkrivati DVI-varijantu (anti-DVI-) direktnom aglutinacijskom metodom na sobnoj temperaturi.^{9,10,11,15,16} Važno je na-

glasiti da se trudnicama i bolesnicima antigen D ne određuje metodom indirektnog antiglobulinskog testa (IAT), jer se na taj način želi izbjeći rizik da se uzorak s DVI+ kao i uzorak koji je DAT (direktni antiglobulinski test) pozitivan, a D-negativan, pogrešno interpretira kao D-pozitivan.^{5,10,15,16}

Za određivanje krvne grupe ABO i Rh(D) poželjno je koristiti potpuno automatizirani sustav radi smanjenja rizika pogrešne interpretacije rezultata ili pogreška u prepisivanju rezultata. Serološko određivanje antigena D na potpuno automatiziranim sustavima dozvoljeno je s jednim monoklonskim IgM anti-DVI-reagensom. Svaki imunohematološki laboratorij, u skladu s uputama proizvođača reagensa i temeljem vlastite procjene rizika, donosi odluku o odabiru anti-DVI-monoklonskog reagensa i donosi odluku o definiranju granične vrijednosti (engl. *cut-off*). To većinom znači da se uzorci koji pokazuju jačinu aglutinacije >2+ u mikroaglutinacijskoj metodi ili >1+ metodom u epruveti proglašavaju Rh(D)-pozitivnim. S uzorcima koji pokazuju aglutinaciju 2+ ili slabiju u mikroaglutinacijskoj metodi, ili aglutinaciju 1+ ili slabiju metodom u epruveti, treba postupiti prema postupnicima. U odsutnosti potpuno automatiziranog sustava svaki uzorak se mora testirati u duplikatu i to s istim reagensom ili s dva različita monoklonska IgM anti-DVI-reagensa, sličnog afiniteta, radi smanjenja dvojbene rezultata u otkrivanju D-varijanti. Ovakav način rada nužan je zbog smanjenja rizika unakrsne kontaminacije reagensa i proceduralne pogreške kada se radi ručno.¹⁰

U slučaju jasno negativnog i jasno pozitivnog rezultata nije potrebno daljnje testiranje. Uzorke s inicijalno dvojbene rezultata poželjno je uputiti na *RhD* genotipizaciju.^{10,11} To su uzorci sa serološki slabim reakcijama, s neidentičnim rezultatima različitih anti-D-reagensa, kao i uzorci čiji se rezultati razlikuju u odnosu na prethodne rezultate.

RHD genotipizacija

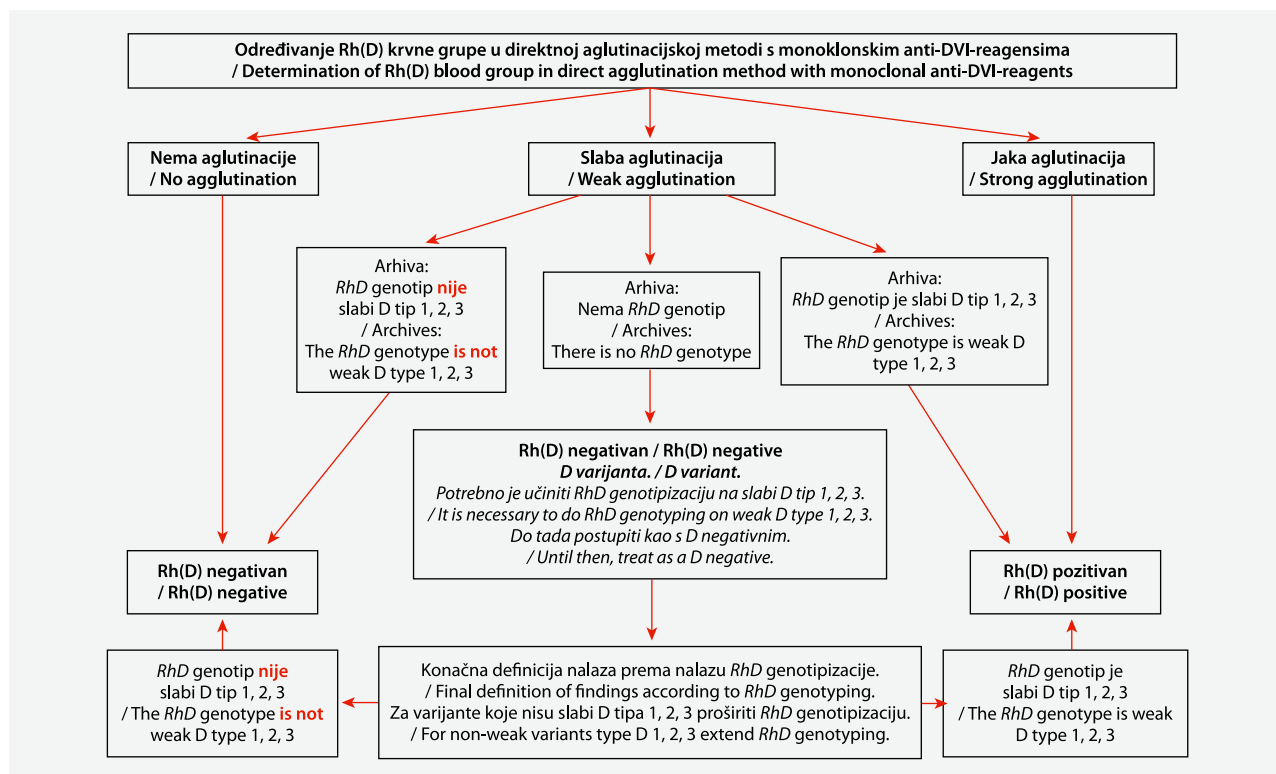
Molekularno određivanje genotipova sustava krvnih grupa postalo je moguće nakon kloniranja i sekvenciranja gena koji kodiraju 38 sustava krvnih grupa za koje su poznati svi klinički važni genetički polimorfizmi. Svaki sustav krvnih grupa određuje jedan gen ili skupina povezanih homolognih gena u genskom lokusu. Većina polimorfizama krvnih grupa rezultat je SNP-ova (engl. *single nucleotide polymorphism*) koji dovode do aminokiselinskih zamjena u enzimu glikozil transferazi ili u domenama membranskih proteina eritrocita.⁴

RhD genotipizacija pomaže rješavanju dvojbene rezultata serološkog određivanja antigena D te se sve više koristi u većini zapadnih zemalja kako bi se odredio RhD status bolesnika za transfuzijsko liječenje.

Najveća dijagnostička vrijednost određivanja D-varijanti postiže se kombinacijom imunohematološkog serološkog i molekularnog testiranja. *RhD* genotipizacija je korisna za 0,5–4% bolesnika koji imaju promjene u genu *RhD*, a prevalencija D-varijanti i aleli se razlikuju ovisno o etničkim skupinama.^{17,18} *RhD* genotipizacija omogućava određivanje najčešćih D-varijanti, koje bitno utječu na transfuzijsko liječenje i prema radu Đogić i sur. iz 2011. obuhvaćaju >85% D-varijanti u našoj populaciji,¹⁹ a to su slabi D-tipovi 1, 2 i 3. Osobe koje su nositelji slabih D-tipova 1,2,3 tretiraju se kao D-pozitivne i kao primatelji krvi transfundiraju se s D-pozitivnim krvnim pripravcima.^{19,25–28} Isto tako, trudnice nositelji slabih D-tipova 1, 2 i 3 ne trebaju dobiti RhIG.^{5,10,11,15,16} (2b,B)

Postupnici određivanja Rh(D) krvne grupe

Temeljni dijagnostički postupak u određivanju Rh(D) krvne grupe jest serološki postupak koji se radi određivanjem antigena D u direktnoj aglutinacijskoj metodi s monoklonskim anti-DVI-reagensima. Ako u testiranom uzorku nema aglutinacije krvna grupa se proglašava Rh(D) negativnom, a ako je prisutna jaka aglutinacija krvna grupa se proglašava Rh(D) pozitivnom. U rješavanju serološki dvojbene rezultata treba koristiti *RhD* genotipizaciju. Ukoliko je potrebno provesti transfuzijsko liječenje ili RhIG imunoprofilaksu prije završetka nalaza *RhD* genotipizacije, treba postupiti na slijedeći način. Za žene generativne dobi i osobe kod kojih očekujemo dugotrajno ili ponavljano transfuzijsko liječenje: „Rh(D) negativan“, a u napomenu: „D-varijanta. *Potrebno* je učiniti *RhD* genotipizaciju na slabi D-tip 1, 2, 3. Do tada postupiti kao s D-negativnim.“ (slika 1). Za ostale: „Rh(D) pozitivan“, a u napomenu: „D-varijanta. *Poželjno* je učiniti *RhD* genotipizaciju na slabi D-tip 1, 2, 3. Može se transfundirati D-pozitivnim krvnim pripravcima.“ (slika 2). Za novorođenčad: a) kada se Rh(D) krvna grupa novorođenčetu određuje zbog transfuzijskog liječenja novorođenčeta, određuje se samo direktnom aglutinacijskom metodom prema postupniku 1 (slika 1). Oprez: Ukoliko se radi o RhD imuniziranoj majci krvni pripravak za novorođenče mora biti podudaran s majčini protutijelima; b) kada se Rh(D) krvna grupa novorođenčetu određuje zbog odluke o davanju RhIG profilakse Rh(D) negativnoj roditelji (slika 3), određuje se metodom direktne aglutinacije, a svakom RhD negativnom novorođenčetu mora se učiniti i pretraživanje na slabe D-varijante indirektnom metodom (u IAT-u) s anti-D-reagensom koji sadrži razred IgG.¹⁰ (2–3,A) U slučaju pozitivnog rezultata indirektno aglutinacije na nalaz pisati: „Rh(D) negativan“, a u napomenu: „Serološki slaba D-varijanta. Majka treba primiti hiperimuni anti-D-gamaglobulin“, a u slučaju



SLIKA 1. POSTUPNIK 1 – ODREĐIVANJE RH(D) KRVNE GRUPE KOD ŽENA GENERATIVNE DOBI I OSOBA KOD KOJIH SE OČEKUJE DUGOTRAJNO ILI PONAVLJANO TRANSFUZIJSKO LIJEČENJE

FIGURE 1. ALGORITHM 1 – DETERMINATION OF RH (D) BLOOD GROUP IN WOMEN OF CHILDBEARING AGE AND PERSONS IN WHOM LONG-TERM OR REPEATED TRANSFUSSION TREATMENT IS EXPECTED

pozitivne Rh kontrole „Moguća serološki slaba D-varijanta. Majka treba primiti hiperimuni anti-D-gamaglobulin.“ Ograničenje testiranja u slučaju hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta: potreban je oprez u određivanju antigena D novorođenčetu RhD imunizirane majke jer može doći do tzv. blokirajućeg fenomena (jako pozitivan DAT) u kojem majčina anti-D-protutijela oblažu eritrocite novorođenčeta i onemogućuju vezanje protutijela iz monoklonskog anti-D-reagensa, što dovodi do krive interpretacije nalaza (kao lažno negativan). Također, potreban je oprez i ukoliko je fetus liječen intrauterinim transfuzijama jer krvna grupa tada odražava krvnu grupu doze krvi.

Po završetku RhD genotipizacije definira se konačan nalaz Rh(D) krvne grupe.^{11,16} U slučaju da se RhD genotipizacijom ne odrede slabi D-tip 1,2,3: prema uputi specijaliste transfuzijske medicine može se napraviti kompletna RhD genotipizacija (ostali klinički važni slabi D-tipovi i parcijalni D). Pri tome treba naglasiti da dostupni molekularni testovi ne obuhvaćaju sve poznate D-varijante i da su populacijski koncipirani te da u slučaju negativnog nalaza D-varijanti to uvijek ne isključuje prisutnost neke D-varijante koju test ne razlučuje ili se radi o posve novoj, koja još nije u bazi podataka. (2,A)

Upis rezultata u računalni program e-Delphyn

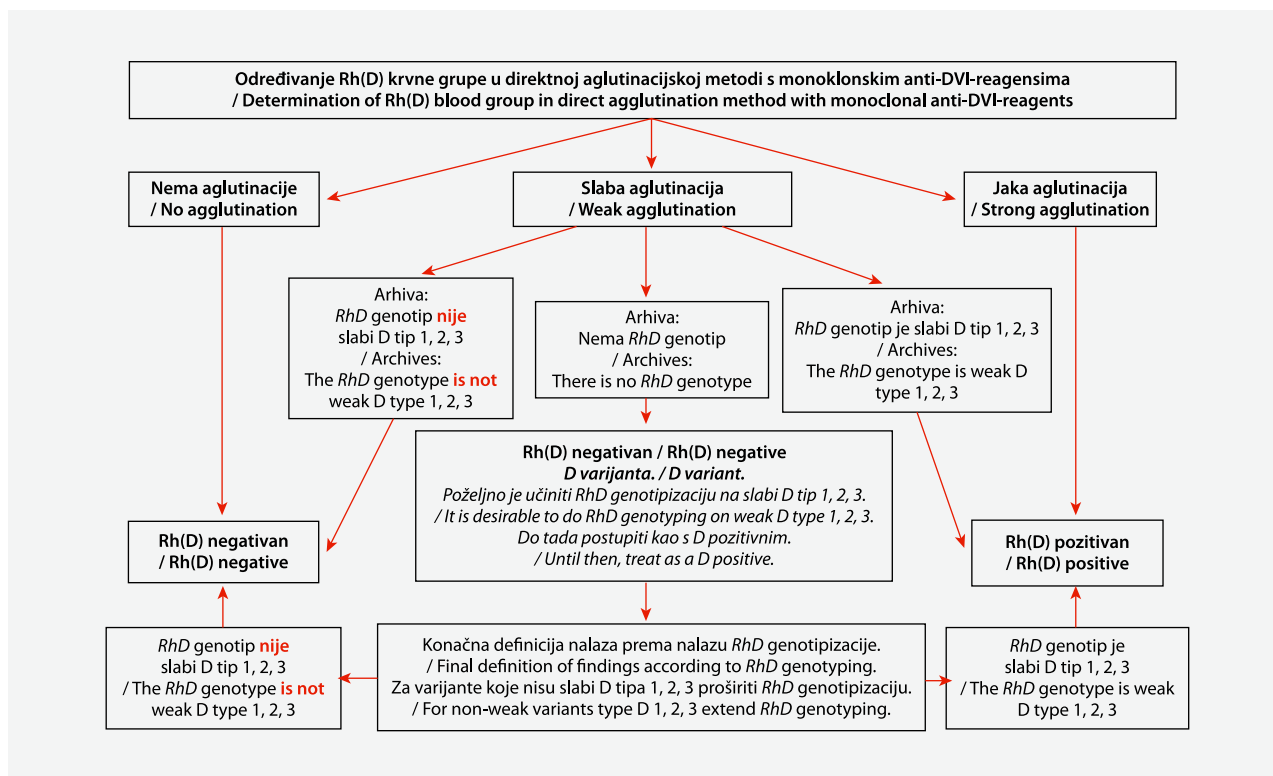
Za bolesnike i trudnice upućene na RhD genotipizaciju:

I. U slučaju hitnosti izdaje se nalaz krvne grupe prema postupniku 1 (slika 1) ili postupniku 2 (slika 2):

- po završetku RhD genotipizacije, ustanova koja provodi RHD genotipizaciju nalaz RhD genotipa upisuje u e-Delphyn, u Medicinsku napomenu i u Upozorenja (kako bi nalaz svima u sustavu bio dostupan), a pisani nalaz šalje transfuzijskoj službi naručitelja;
- temeljem nalaza RhD genotipa, transfuziolog iz laboratorija koji je uzorak uputio na RhD genotipizaciju uklanja validaciju s nalaza krvne grupe i u Napomenu za uzorak upisuje datum izmjene nalaza i jedno od niže navedenih tumačenja; u slučaju razlike rezultata RhD genotipa u odnosu na prethodno izdani nalaz potrebno je učiniti korekciju preko uslužnih alata u računalnoj aplikaciji e-Delphyn.

II. U slučaju da se može pričekati s izdavanjem nalaza krvne grupe, isti se definira tek po završetku RhD genotipizacije:

- nalaz RhD genotipa upisuje u e-Delphyn, u Medicinsku napomenu i u Upozorenja ustanova koja



SLIKA 2. POSTUPNIK 2 – ODREĐIVANJE RH(D) KRVNE GRUPE KOD SVIH OSTALIH BOLESNIKA
FIGURE 2. ALGORITHM 2 – DETERMINATION OF RH (D) BLOOD GROUP IN ALL OTHER PATIENTS

radi *RhD* genotipizaciju, a pisani nalaz šalje transfuzijskoj službi naručitelja;

- temeljem nalaza *RhD* genotipa, transfuziolog iz laboratorija koji je uzorak uputio na *RhD* genotipizaciju upisuje jedno od niže navedenih *tumačenja*.

Tumačenja po završetku RHD genotipizacije

a) za *RhD* genotip slabi D-tip 1, 2 ili 3:

„Rh(D) pozitivan“, a u napomenu npr.: „D-varijanta – slabi D-tip 1. Osobe nositelji ove D-varijante ne razvijaju RhD imunizaciju i proglašavaju se Rh(D) pozitivnim te se transfundiraju Rh(D) pozitivnim krvnim pripravcima, a trudnice ne zahtijevaju primjenu hiperimunog anti-D gamaglobulina.“

b) ako nije dokazan *RhD* genotip slabi D-tip 1, 2 ili 3; dokazan je slabi D-tip za koji se zna da može razviti RhD imunizaciju ili to nije poznato; ili je dokazan parcijalni D.

„Rh(D) negativan“, a u napomenu: „D-varijanta. Osobe nositelji ove D-varijante mogu razviti RhD imunizaciju i proglašavaju se Rh(D) negativnim te se transfundiraju Rh(D) negativnim krvnim pripravcima, a trudnice trebaju primiti hiperimuni anti-D-gamaglobulin.“

RhD imunizacije kod osoba s D-varijantom

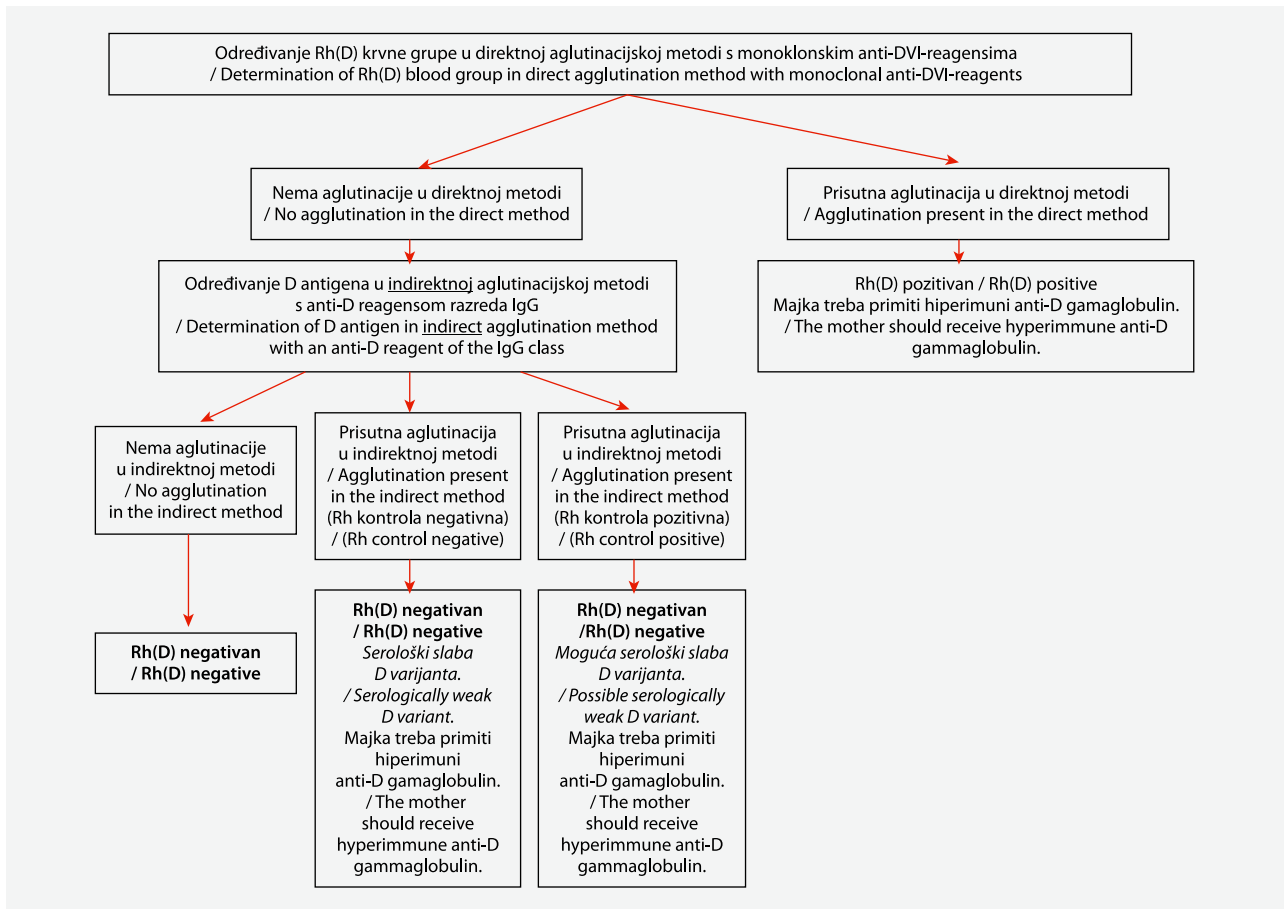
Kod sumnje da se radi o D-varijanti s RhD imunizacijom, potrebno je napraviti *RhD* genotipizaciju. Kako bismo isključili reaktivnost zbog antieritrocitnih auto-protutijela (autoanti-LW, autoanti-D), kod pozitivnog DAT-a, potrebno je i dodatno testiranje koje uključuje autoadsorpciju i eluciju protutijela.

Potvrđenu RhD imunizaciju kod osoba s D-varijantom treba prijaviti u HZTM, Referentni centar za transfuzijsku medicinu Ministarstva zdravstva u RH. Takvo centralno prikupljanje podataka o RhD imunizacijama kod nositelja D-varijanti omogućit će uvid o njihovoj učestalosti i značajnosti.

Podatci o RhD imunizacijama kod D-varijanti bit će prikazani u *Transfuziološkom vjesniku* jednom godišnje.

Fetalna RhD genotipizacija

Kod Rh(D) negativnih trudnica, vodeći uzrok HBFN-a je nepodudarnost Rh(D) krvne grupe između majke i fetusa, pri čemu dolazi do imunizacije majke i prijelaza majčinih anti-D-protutijela kroz posteljicu.²⁰ Dokazano je da se fetalna genomska cfDNA koja potječe iz trofoblasta fetusa već nakon 4 tjedna gestacije nalazi u majčinoj plazmi (3%) i njen udio raste do 6% pred porod, nakon čega se uklanja iz maj-



SLIKA 3. POSTUPNIK 3 – ODREĐIVANJE RH(D) KRVNE GRUPE NOVOROĐENČETU ZBOG ODLUKE O DAVANJU RHIG IMUNOPROFILAKSE RH(D) NEGATIVNOJ RODILJI

FIGURE 3. ALGORITHM 3 – DETERMINATION OF RH (D) BLOOD GROUP IN A NEWBORN DUE TO THE DECISION TO GIVE RHIG IMMUNOPROPHYLAXIS TO AN RH (D) NEGATIVE MOTHER

činog krvotoka pa prethodne trudnoće ne interferiraju.²¹ (2 B) Na taj način omogućeno je prijenatalno određivanje fetalnog *RhD* genotipa neinvazivnom metodom iz uzorka majčine plazme. Vrlo mali udio fetalne cfDNA u odnosu na majčinu DNA i velike intraindividualne varijacije u njenom izlučivanju u majčinu plazmu predstavljaju metodološki izazov koji se rješava posebnom provedbom izolacije cfDNA i vrlo osjetljivom metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (*engl. real-time polymerase chain reaction*) uz ispitivanje bar dviju regija *RhD* gena.^{22–24} Kao i svaka analitička metoda, tako i određivanje prijenatalnog fetalnog *RhD* genotipa ima „sivu zonu“ rezultata kao i lažno negativne i lažno pozitivne rezultate, u malom postotku. U slučaju nemogućnosti razlučivanja radi li se o *RhD* pozitivnom ili negativnom nalazu fetalnog genotipa, trudnica se poziva na vađenje novog uzorka u određenom vremenu kako bi se molekularno testiranje ponovilo („siva zona“). Lažno negativni rezultati koji znače da je fetalni *RhD* genotip utvrđen kao negativan, a dijete po rođenju je *RhD* pozitivno, događaju se uglavnom uslijed bioloških varija-

cija izlučivanja cfDNA u majčinu plazmu. Suprotno tomu, lažno pozitivni rezultati mogući su zbog kontaminacije uzoraka, kontaminacije reagensa ili humane/mehaničke greške u radu, intrauterine smrti blizanca („*vanishing twins*“), placentarnog mozaicizma i naravno zbog prisutnosti D-varijanti ili kod majke ili kod oca. Metode za određivanje prijenatalnog fetalnog *RhD* genotipa prethodno se pomno validiraju/verificiraju te se prati točnost rezultata i nekorektni rezultati prijavljuju kao incidenti te se detaljno istražuje izvor greške. Najnovija britanska metastudija brojnih referencija određivanja fetalnog *RhD* genotipa pokazuje da je stopa lažno negativnih bila 0,34% (95% CI 0,15 – 0,76), a stopa lažno pozitivnih 3,86% (95% CI 2,54 – 5,82).²⁵

Ako se radi o *RhD* imuniziranoj trudnici, prijenatalnu fetalnu *RhD* genotipizaciju neinvazivnom metodom iz majčine plazme moguće je učiniti već nakon 16. gestacijskog tjedna u HZTM-u, te prema nalazu odrediti učestalost i način praćenja trudnice; trudnica s *RhD* negativnim fetusom ne zahtijeva intenzivan nadzor trudnoće, kao niti *RhIG* profilaksu.

Na tečaju *RhD – izrada novih smjernica testiranja bolesnika i trudnica* dogovoreno je da se RhD imuniziranim trudnicama ponudi mogućnost neinvazivnog određivanja prijenatalnoga fetalnog *RhD* genotipa iz majčine plazme nakon 16. tjedna gestacije u HZTM-u, uz napomenu na nalazu serološkog imunohematoškog ispitivanja: „Preporuka: učiniti fetalnu *RHD* genotipizaciju iz majčine plazme nakon 16. tjedna gestacije“.

Fetalna *RhD* genotipizacija kod trudnica s RhD imunizacijom nužna je radi procjene ugroženosti fetusa/novorodenčeta od HBFN-a i određivanja dinamike ginekološkog nadzora te planiranja prijenatalnog transfuzijskog liječenja odnosno poroda i poslijenatalnog liječenja.^{26–29} (2a, A)

Preporuka za provođenje rutinske prijenatalne RhIG profilakse u razvijenim zemljama jest u 28. gestacijskom tjednu davanjem 1250–1500 IU anti-D IgG ili u 28. i 34. gestacijskom tjednu 625 IU anti-D IgG. Osim rutinske prijenatalne RhIG profilakse potrebno je provoditi RhIG profilaksu unutar 72 sata nakon imunizacijskog događaja (pobačaj, amniocenteza, kordocenteza, porod, trauma abdomena, mola hydatidosa, vanmaternična trudnoća).^{26–29} (2a, A)

Metodom neinvazivnog određivanja fetalnog *RhD* genotipa sprječava se nepotrebna imunoprofilaksa za oko 40% D-negativnih majki koje nose D-negativne fetuse, a za one koje nose D-pozitivne fetuse omogućava se ciljana prijenatalna RhIG profilaksa, čime se smanjuje broj RhD imunizacija. Prednost je za trudnice manji broj ginekoloških i ultrazvučnih kontrola te imunohematoških obrada, kao i manje invazivnih amniocenteza, što bitno smanjuje stres kod trudnica i značajno smanjuje rizik od gubitka fetusa.

Fetalna *RhD* genotipizacija kod D-negativnih RhD neimuniziranih trudnica radi se rutinski sveobuhvatno u Danskoj, Nizozemskoj, Finskoj i Švedskoj u okviru nacionalnog programa prijenatalne zaštite trudnica i temeljem rezultata testa odlučuje se o primjeni RhIG. Neke države provode fetalnu *RhD* genotipizaciju regionalno (Belgija, Velika Britanija, Češka, Francuska, Njemačka), a ostale zemlje je provode na zahtjev kliničara, baš kao i u HZTM gdje se metoda primjenjuje kao dijagnostički test od 2012. godine. U Hrvatskoj se ne primjenjuje rutinska prijenatalna RhIG profilaksa, a kada se odluči o njenom uvođenju, fetalna *RhD* genotipizacija trebala bi biti značajan alat u probiru D-negativnih trudnica koje zaista trebaju primiti RhIG.

Uzorci krvi za *RhD* genotipizaciju

Uzorak za testiranje RhD gena kod D-varijanti:

- EDTA puna krv od 2–3 mL (epruveta s ljubičastim čepom).

Na uputnici navesti: „traži se: Genotipizacija slabi D-tip 1,2,3“.

Uzorci za prijenatalnu fetalnu *RhD* genotipizaciju iz majčine plazme:

- 2 *Vacutainer* epruvete s K- EDTA (ljubičasti čep) od 6 mL, ako se dostavljaju u HZTM u roku 8 h;
- kada se uzorci krvi šalju unutar 48 h iz drugih dijelova Hrvatske, moraju biti uzeti u 2 PPT epruvete s gelom od 8,5 mL i centrifugirani prije transporta tijekom 10 minuta na 2500 okretaja/min.

Na uputnici navesti: „traži se: Fetalna *RhD* genotipizacija iz majčine plazme“.

Zahvala

Zahvaljujemo transfuziologinjama u mirovini: prim. dr. sc. Željki Hundrić-Hašpl, dr. med. i Nini Juraković Lončar, dr. med. koje su 2007. izradile prijedlog algoritama za imunohematološko testiranje antigena D dobrovoljnim darivateljima krvi, bolesnicima, trudnicama i novorođenčadi. Slijedom rada naših stručnih učiteljica, desetak godina kasnije taj je prijedlog algoritama bio poticaj za izradu prvih hrvatskih smjernica za određivanje antigena D bolesnicima i trudnicama.

LITERATURA

1. Klein HG, Anstee DJ, ur. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. Oxford: Blackwell Publishing; 2014, str. 163.
2. Daniels G. Rh and RHAG Blood Group Systems. U: Daniels G, ur. *Human Blood Groups*. Oxford: Wiley-Blackwell; 2013, str. 182–258.
3. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*. 1999;93:385–93.
4. International Society of Blood Transfusion. Red Cell Immunogenetic and Blood Group Terminology. Dostupno na <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>. Pristupljeno 2. 8. 2021.
5. Daniels G. Variants of RhD – current testing and clinical consequences. *Br J Haematol*. 2013;161:461–70.
6. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Müller TH i sur. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*. 2000;95:2699–708.
7. 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;22:285–90.
8. Lacey PA, Caskey CR, Werner DJ, Moulds JJ. Fatal haemolytic disease of a newborn due to anti-D in an Rh-positive Du variant mother. *Transfusion*. 1983;23:91–4.
9. Hundrić-Hašpl Ž. Prijedlog novih algoritama za određivanje RhD antigena dobrovoljnim darivateljima krvi, bolesnicima, trudnicama i novorođenčadi. *Transfuziol Vjesn*. 2007;44: 2–7.
10. Milkins C, Berryman J, Cantwell C, Elliott C, Haggas R, Jones J i sur. *British Committee for Standards in Haematology*. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Transfus Med*. 2013;23:3–35.
11. Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, Denomme GA, Delaney M, Keller MA i sur. It's time to phase in RHD genotyping

- for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion*. 2015;55:680–9.
12. Štimac D, Poropat G. Medicina temeljena na dokazima – promjena paradigme u znanosti i kliničkom radu. *Med Flumin*. 2017;53(4):400–3.
 13. Pierce RS, Reid ME. Applications of Serological Test. U: Pierce RS, Reid ME, ur. *Bloody Brilliant! The History of Blood Groups and Blood Groupers*. Bethesda: American Association of Blood Banks Press; 2016, str. 479–95.
 14. Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM. Technical consideration for RH typing. U: *Technical Manual*. Bethesda: American Association of Blood Banks Press; 2014, str. 331–33.
 15. White J, Qureshi H, Massey E, Needs M, Byrne G, Daniels G i sur. Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy. *Transfus Med*. 2016;26:246–63.
 16. Sandler SG, Chen LN, Flegel WA. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *Br J Haematol*. 2017;179:10–9.
 17. 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;138:620–5.
 18. Westhoff CM. Serologic Weak D Phenotype to RHD Genotyping: *How will I know?* [neobjavljeno predavanje]. Predavanje za transfuziologe u organizaciji tvrtke Immucor (New York Blood Center, New York). 19. kolovoza 2015.
 19. Dogic V, Bingulac-Popovic J, Babic I, Hundric-Haspl Z, Jurakovic-Loncar N, Martinovic-Mikulandra J i sur. Distribution of weak D types in Croatian population. *Transfus Med*. 2011;21:278–9.
 20. de Haas M, Thurik FF, Koelewijn JM, van der Schoot CE. Haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang*. 2015; 109:99–113.
 21. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW i sur. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350:485–7.
 22. Daniels G, Finning K, Martin P, Soothill P. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang*. 2004;87:225–32.
 23. Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, Finning K, Hromadnikova I, Galbiati S i sur. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2007;27:824–9.
 24. Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, Kulovany E i sur. Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther*. 2005;20:275–80.
 25. Yang H, Llewellyn A, Walker R, Harden M, Saramago P, Griffin S i sur. High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal rhesus D status in RhD-negative women: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2019;17(1):37.
 26. Clausen FB, Christiansen M, Steffensen R, Jørgensen S, Nielsen C, Jakobsen MA i sur. Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in D- pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion*. 2012;52:752–8.
 27. Kent J, Farrell AM, Soothill P. Routine administration of Anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014; 25:14:87.
 28. Kacker S, Vassallo R, Keller MA, Westhoff CM, Frick KD, Sandler SG i sur. Financial implications of RHD genotyping of pregnant women with a serologic weak D phenotype. *Transfusion*. 2015;55:2095–103.
 29. Manfroi S, Calisesi C, Fagian P, Gabriele A, Lodi G, Nucci S i sur. Prenatal non-invasive foetal RHD genotyping: diagnostic accuracy of a test as a guide for appropriate administration of antenatal anti-D immunoprophylaxis. *Blood Transfus*. 2018; 16:514–24.

