doi: 10.48095/cctahd2023prolekare.cz7

Protilátka anti-K blokující vyšetření antigenu

Blocking of antigen caused by anti-K antibody

Tylečková J., Tůmová K., Lejdarová H.
Transfuzní a tkáňové oddělení, FN Brno

SOUHRN: Hemolytické onemocnění plodu a novorozence v důsledku protilátek anti-K je nepříliš časté onemocnění, které ale může být příčinou závažné fetální anémie. Imunohematologické vyšetření a jeho správné vyhodnocení mají zásadní význam pro zajištění léčby. Jednou z komplikací při laboratorním stanovení může být získání falešně negativního výsledku při typizaci erytrocytárního antigenu ve vzorku fetální nebo novorozenecké krve, a to v důsledku protilátky blokující daný antigen. Na to může upozornit výsledek vyšetření silně pozitivního přímého antiglobulinového testu při chybějícím průkazu antigenu odpovídajícího dané protilátce. Tato práce popisuje uvedenou situaci, se kterou jsme se setkali při přípravě intrauterinní transfuze těhotné ženě s Kell pozitivním plodem a protilátkou anti-K.

KLÍČOVÁ SLOVA: blokovaný antigen – mateřská anti-K – hemolytické onemocnění plodu a novorozence – antierytrocytární protilátky

SUMMARY: Haemolytic disease of the foetus and new-born due to anti-K antibodies is rare, but can cause severe foetal anaemia. Correct evaluation of immune-haematological tests is essential for providing proper treatment. One of the complications of laboratory testing can be a false negative result of erythrocyte antigen typing in a sample of foetal or new-born blood, due to an antibody blocking the antigen. This can be suspected in the event of a strongly positive direct antiglobulin test and the absence of the antigen corresponding to the identified antibody. This case report describes the situation we encountered when preparing an intrauterine transfusion for a pregnant woman with a Kell positive foetus and an anti-K antibody.

KEY WORDS: blocked antigen – maternal anti-K – haemolytic disease of the foetus and new-born – red blood cell antibodies

ÚVOD

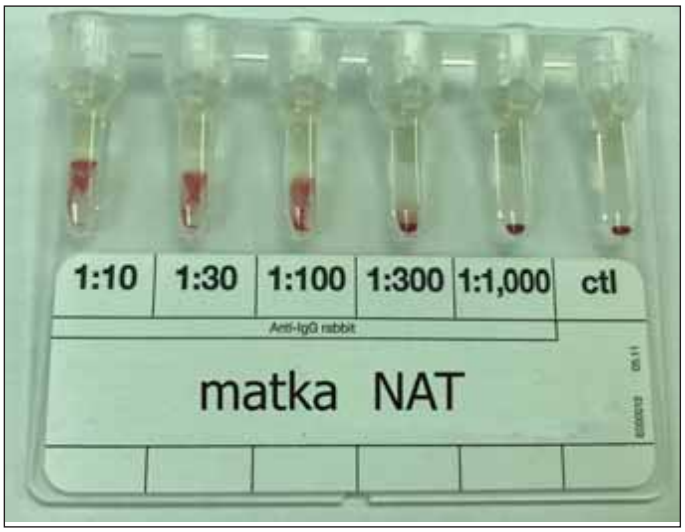
Hemolytické onemocnění plodu a novorozence (*hemolytic disease of the fetus and newborn* – HDFN) je komplikace, která může provázet inkompatibilní těhotenství, pokud se liší krevně skupinové znaky matky a plodu. Příčinou nemoci jsou mateřské imunní protilátky, které jsou aktivně transportovány receptory placenty do krevního oběhu plodu a při jeho antigenní odlišnosti mohou být pro plod nebezpečné, mohou vést k fagocytóze a destrukci fetálních erytrocytů. Onemocnění mívá různý průběh, závažný bývá při imunizaci matky antigeny systému Rh a Kell [1]. Specifická protilátka může při vysokých titrech komplikovat průkaz antigenu na fetálních/novorozeneckých erytrocytech, pokud obsadí příslušná antigenní místa a brání tím účinku diagnostického séra. Antigen může být následně chybně určený jako negativní a v souvislosti s vyšetřením RhD může vést k nesprávnému stanovení krevní skupiny, zvláště při neznalosti těhotenské anamnézy.

Kell protilátky

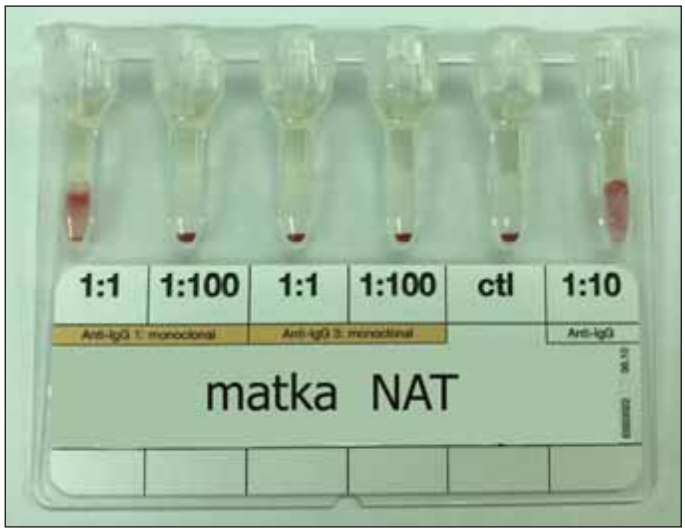
HDFN v důsledku protilátek anti-Kell bývá málo časté, protilátky proti Kell antigenu však bývají v pozadí asi 10 % případů závažné fetální anémie [2]. V etiologii nemoci mají zvláštní pozici podobně, jako je tomu u krevních skupin M nebo Jr^a. Kell glykoprotein (CD238) tvoří nejméně 35 antigenů, k nejznámějším patří méně častý antigen K (KEL1) a v populaci často se vyskytující antigen k (KEL2). Kell glykoprotein se vyskytuje již časně na erytroidních progenitorových buňkách (*burst forming unit erythroid, colony forming unit erythroid*) a může být cílem protilátky, která na tyto prekurzory působí přímou supresí cestou apoptotických procesů nebo inhibicí formování cytoskeletu erytrocytů. Uplatňuje se také klasická cesta hemolýzy časných progenitorů erytrocytů. Tyto procesy mohou vést k rozvoji závažné fetální anémie s nízkým počtem retikulocytů a normoblastů, v séru bývá snížená hodnota bilirubinu. Se závažností HDFN nemusí korelovat množství mateřské protilátky; i při nízkých titrech bývá plod těžce anemický. Proto byl stanovený titr 4 jako kritická hodnota pro monitorování protilátky anti-K [3–6].

Imunohematologické vyšetření

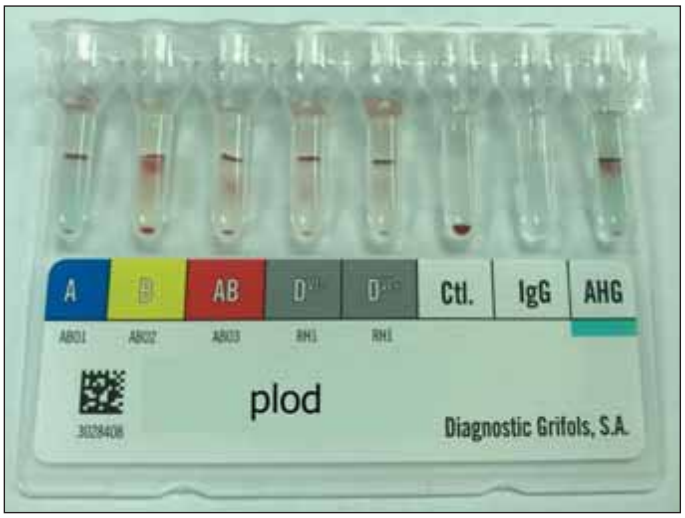
Při vážném průběhu nemoci klinický stav vyžaduje korekci anémie transfuzemi erytrocytů a při tom má imunohematologické vyšetření a jeho správné vyhodnocení velký význam. K rutinnímu vyšetření vzorku fetální nebo novorozenecké krve patří kromě stanovení krevní skupiny AB0, antigenu D a vyšetření přímého antiglobulinového testu (PAT) také typizace antigenu odpovídajícího



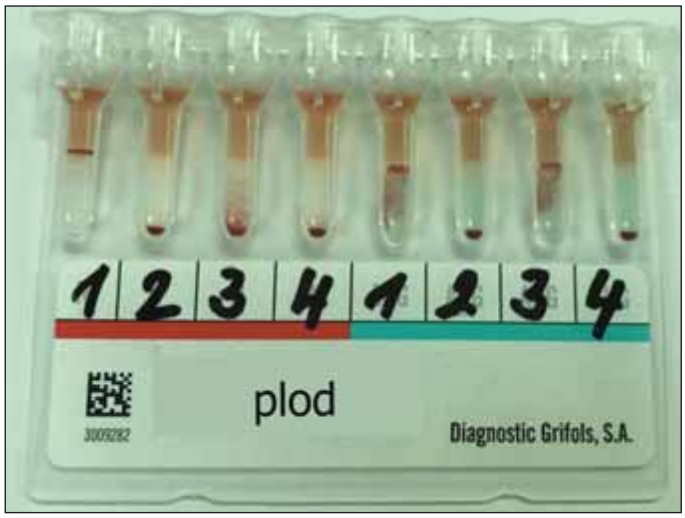
Obr. 1. Kvantifikace IgG protilátky v plazmě matky (DAT IgG-Dilution BioRad, CC^{w-}Kk).



Obr. 2. Stanovení typu imunoglobulinu (DAT IgG1/IgG3 BioRad, C^{w-}Kk).



Obr. 3. Krevní skupina plodu (DG Gel Newborn Grifols).



Obr. 4. Screening protilátek plodu (DG Gel Neutral/Coombs Grifols).

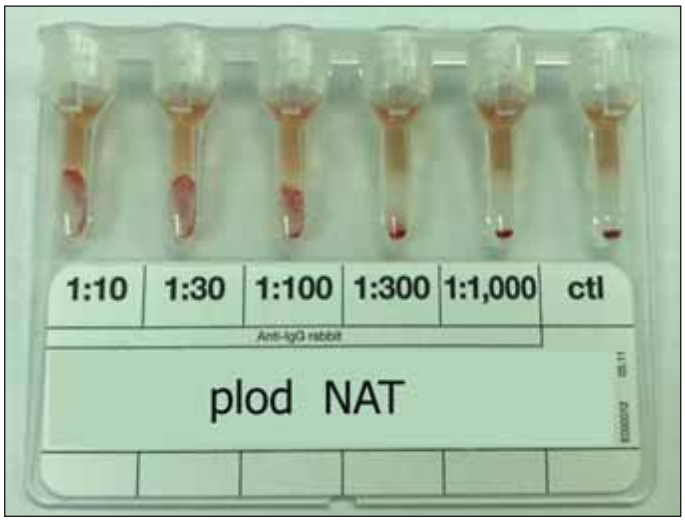
mateřské protilátce, při nejasných nálezech další doplňující testy [1,7].

Jednou z málo častých komplikací bývá získání falešně negativního výsledku při typizaci erytrocytárního antigenu, a to v důsledku protilátky blokující daný antigen. Je to situace známá u RhD HDFN jako tzv. blokující D fenomén, může se však vyskytnout i v souvislosti s jinými protilátkami [8–10]. Příčinou zablokování antigenu je specifická protilátka, která se obvykle jako IgG nachází v mateřské plazmě ve vysokém titru, obsazuje příslušná antigenní místa na erytrocytech a vede k negativnímu výsledku při typování antigenu pomocí IgM diagnostických sér. Není vždy nutné, aby se protilátka vyskytovala ve vysokém titru, jako příčina nemožnosti určení antigenu je uváděna i protilátka anti-D v titru 32 [11]. První zmínka o blokaci antigenu se datuje do roku 1944: anti-D se zcela vázala na D antigen novorozeneckých erytrocytů, který nebylo možné sérologicky prokázat [12]. Podezření na problém vzniká tehdy, když je přítomna mateřská protilátka, zvláště ve vyšším titru, u dítěte je silně pozitivní PAT a vyšetřovaný antigen na jeho erytrocytech nelze prokázat.

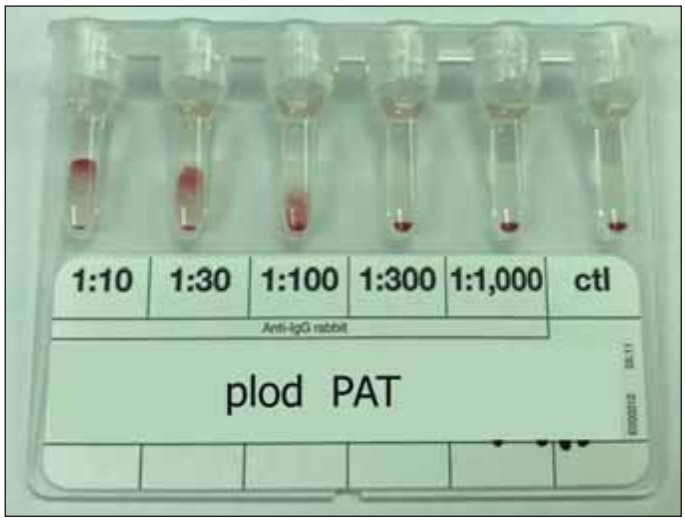
KAZUISTIKA

S uvedenou situací jsme se setkali při přípravě intrauterinní transfuze těhotné ženě s protilátkou anti-K, dispenzarizované pro HDFN.

U ženy (čtvrtá gravidita, jeden porod) krevní skupiny B RhD pozitivní s erytrocytárním fenotypem C^{w-} ccEe K– byla ve 32. gestačním týdnu indikovaná dle výsledku dopplerovského vyšetření plodu intrauterinní transfuze. Pacientka byla sledovaná ve specializovaném centru perinatální péče pro anti-K protilátku (Identisera Diana, DG Gel Coombs Grifols), která reagovala v titru 512 (DG Gel Coombs Grifols, C^{w-}Kk), při IgG kvantifikaci dosahovala hodnoty 1 : 300 (DAT IgG-Dilution BioRad, C^{w-}Kk) (obr. 1), při stanovení typu imunoglobulinu se jednalo o IgG1 reagující v ředění 1 : 1 (DAT



Obr. 5. Kvantifikace IgG protilátky v plazmě plodu (DAT IgG-Dilution BioRad, C^w-Kk).



Obr. 6. Přímý antiglobulinový test plodu v ředění (DAT IgG-Dilution BioRad).

IgG1/IgG3 BioRad, C^w-Kk) (obr. 2). Kromě ní byla v plazmě určena ještě další protilátka anti-C^w v titru 32 (DG Gel Coombs, C^w+K–). Inkompatibilita v systému AB0 byla vyšetřením imunních anti-A protilátek vyloučena.

Již dříve provedená typizace antigenů partnera ženy určila fenotyp jeho erytrocytů CcEe Kk, antigen C^w tehdy nebyl stanovován.

Fetální krev měla krevní skupinu AB RhD pozitivní (DG Gel Newborn Grifols) (obr. 3). Při screeningovém vyšetření antierytrocytárních protilátek ve fetální plazmě odpovídaly reakce s diagnostickými erytrocyty kombinaci protilátek anti-K a anti-C^w, určených u matky. Obě protilátky reagovaly v LISS NAT i v enzymovém testu (DG Gel Neutral/Coombs Grifols) (obr. 4). Anti-K v plazmě fetu bylo možné prokázat při kvantifikaci IgG v ředění 1 : 300 (DAT IgG-Dilution BioRad, C^w-Kk) (obr. 5). Silně pozitivní byl přímý antiglobulinový test pro IgG do ředění 1 : 100 (DAT IgG-Dilution BioRad) (obr. 6), protilátka neaktivovala komplement (DC Screening II BioRad) a podařilo se ji prokázat v eluátu (Identisera Diana, DG Gel Coombs) po jejím uvolnění z PAT pozitivních fetálních erytrocytů (ELU Kit II Immucor).

Fetální Rh fenotyp byl C^w– ccEe (DG Gel Rh Pheno + Kell Grifols) (obr. 7). Problém nastal při sérologickém určení antigenu K, který nebylo možné detekovat ani při opakovaném stanovení pomocí odlišných diagnostik (DG Gel Rh Pheno + Kell, komerční séra immuClone Anti-K IgM Immucor, Anti-Kell BAG, zkumavkový test).

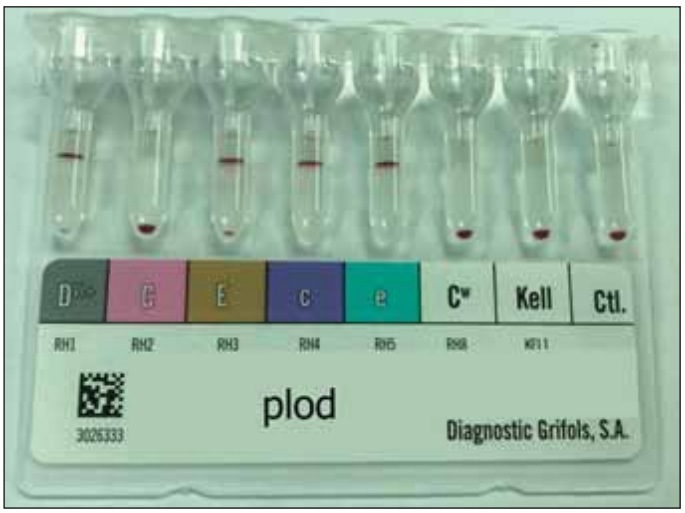
Požadovaná intrauterinní transfuze byla zajištěna erytrocyty 0 RhD negativními ccee C^w– K– kompatibilními s plazmou matky, deleukotizovanými, ozářenými gamma zářením a s hematokritem 0,808. Podání proběhlo bez komplikací. Další antenatální léčba nebyla nutná, ve 35. týdnu byl indukován porod. Parametry krevního obrazu novorozené holčičky již nevyžadovaly žádnou léčebnou korekci anémie: hodnota hemoglobinu byla vstupně 119 g/l (při propuštění 120 g/l), MCV 112,2 fl, celkový bilirubin vstupně 27,7 µmol/l (při propuštění vzrostl na 158,1 µmol/l).

Opakovaná imunohematologická vyšetření ze vzorku novorozenecké krve poskytla stejné výsledky jako vyšetření prenatální. Novorozenec AB RhD pozitivní s Rh fenotypem R_2r a s mateřskou anti-K a anti-C^w protilátkou v plazmě neměl sérologicky vyšetřitelný antigen K. Uvolnění protilátky tepelnou a chlorochinovou elucí a následné vyšetření krvinek také neumožnilo antigen prokázat, proto byl vzorek předán do jiné laboratoře k molekulárně-biologickému určení erytrocytárních antigenů a fenotyp Kk byl potvrzený genotypovou predikcí.

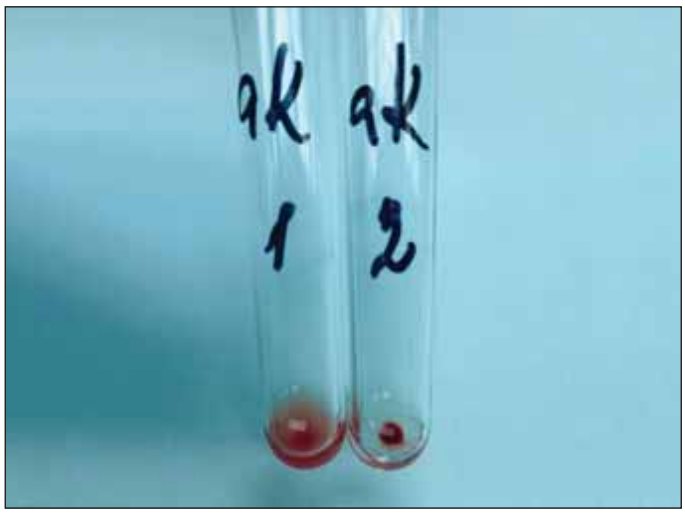
Pokusili jsme se blíže zjistit vlastnosti protilátky a adsorbovat ji na erytrocyty 0 Kk C^w– (erytrocyty dárce krve, opakovaně potvrzené antigeny Kell) a paralelně s tímto vyšetřením provést stejnou adsorpci jiné protilátky anti-K (dostupný krevní vzorek pacienta s protilátkou anti-K) na stejné erytrocyty. Tato další protilátka reagovala v titru 2 (DG Gel Coombs, Kk) a jednalo se o IgG imunoglobulin, který nedetekovala séra anti-IgG1 ani anti-IgG3 (DAT IgG1/IgG3 Bio-Rad). Adsorpce obou těchto anti-K na Kk typ erytrocytů proběhla ve vodní lázni 37 °C s hodinovou inkubací úspěšně, kontrolní PAT byl u obou vzorků erytrocytů po adsorpci pozitivní: u vzorku těhotné PAT 4+, u vzorku pacienta PAT 2+ (vše DG Gel Coombs). Následně jsme u obou PAT pozitivních erytrocytů vyšetřili antigen K, který bylo možné prokázat jako pozitivní reakce na erytrocytech z druhé adsorpce (anti-K u vzorku pacientského) (obr. 8). Protilátka adsorbovaná z plazmy těhotné blokovala správné určení antigenu, když byl výsledek vyšetření antigenu negativní.

ZÁVĚR

Hemolytické onemocnění fetu a novorozence je jednou z vážných příčin perinatální morbidity. U non-RhD aloimunizací bývá jeho nejčastější příčinou protilátka, kterou si matka vytvořila na



Obr. 7. Rh fenotyp plodu (DG Gel Rh Pheno+Kell Grifols).



Obr. 8. Stanovení antigenu K na erytrocytech 0 Kk C^w– po adsorpci odlišných anti-K protilátek

základě předchozí transfuze erytrocytů, která je tak největším nezávislým rizikovým faktorem nemoci [13]. Při Kell-aloimunizaci mívá HDFN jiný charakter než u jiných typů imunizací, a to díky inhibičnímu vlivu protilátky na Kell-pozitivní erytroidní progenitory, na nichž je antigen již časně exprimován [7,10]. V klinickém obraze nemoci tak dominuje anémie, nikoli biochemické parametry charakteristické pro hemolýzu. Při vysokých titrech protilátky tato může být komplikací imunohematologického vyšetření, pokud blokuje účinek diagnostického séra a neumožní správné stanovení antigenu. Tzv. blokující fenomén býval častěji vidět v době používání diagnostických sér s nepřímo aglutinujícími IgG protilátkami; u IgM monoklonálních diagnostických sér je vzácný. Došetření zaměřené tímto směrem je indikované vždy, když je přítomna mateřská protilátka, zvláště ve vysokém titru, a je silně pozitivní PAT u dítěte, u kterého nebyl prokázán erytrocytární antigen korespondující protilátce. K potvrzení nálezu může pomoci uvolnění (eluce) protilátky z krvinek, které opsonizuje, její identifikace a následné určení antigenu na ošetřených krvinkách. Test však nemusí být vždy úspěšný; kyselá eluce, která bývá většinou spolehlivá pro odstranění IgG protilátek, má limitované použití při typování antigenu: antigeny Kell jsou při ní destruované. Přínosem vyšetření je proto genotypizace, která pomocí molekulárně-biologické metody výsledek potvrdí.

Literatura

1. Masopust J, Banzetová H, Dušková D, Pejchalová A, Písačka M, Štolba P. Prenatální a postnatální imunohematologické vyšetření. Transfuze Hematol Dnes. 2008;1:7–18.
2. Vaughan JI, Manning M, Warwick RM, Letsky E, Murray NA, Roberts I. Inhhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. New Engl J Med. 1998;19:798–803.
3. Hitoshi O, Denomme GA, Shoichi I, Atsushi I, Nollet KE, Hiroyasu Y. Three non-classical mechanisms for anemic disease of the fetus and newborn, based on maternal anti-Kell, anti-Ge3, amti-M, and anti-Jra cases. Transf Apher Sci. 2020;59(5):102949. Publikováno elektronicky 2020 Sep 16. PMID: 32994126.
4. Keneth JM. Kell aloimunizace matky může vést k rozvoji anémie plodu. Gynekologie po promoci. 2009;1:24–31.
5. Daniel G, Hadley A. Causes of fetal anemia in hemolytic disease due to anti-K. Transfusion. 2003;43(1):115–116.
6. Slootweg YM, Lindenburg IT, Koelewijn JM, Kamp IL, Oepkes D, Haas M. Predicting anti-Kell mediated hemolytic disease of the fetus and newborn, diagnostic accuracy of laboratory management. Am J Obstet Gynecol. 2018;219(4):393e1-393e8. Publikováno elektronicky 2018 Jul 29. PMID: 30063 902.
7. Delaney M, Matthews DC. Hemolytic disease of the fetus and newborn: managing the mother, fetus and newborn. Am Soc Hematol Educ Program. 2015;2015:146–151.
8. Jain A, Kumawat V, Marwaha N. Blocked D phenomenon and relevance of maternal serologic testing. Immunohematol. 2015;31(3): 116–189.
9. Lee E., Redman M, Owen I. Blocking of fetal K antigens on cord red cells by maternal anti-K. Transfusion Med. 2009;19:139–140.
10. Novoselac J, Raos M, Tomac G, Lukić M, Golubić Čepulić B. K antigens on neonatal red blood cells blocked by anti-K with titer of 32. Immunohematol. 2020;35(2): 54–57.
11. Lee E. Blocked D phenomenon. Blood Transf. 2013; 11(1):10-11.
12. Raos M. Blocked K antigen. Immunohematology Case Studies 2019. Transfusion Medicine Division Clinical Department of Transfusion Medicine and Transplantation Biology University Clinical Hospital Zagreb; dostupné z https://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/3_Raos_ISBT_Immunohematology_WP_Case_Study_2.pdf)
13. Koelewijn JM, Vrijkotte TGM, Haas M, Schoot CE, Bonsel GJ. Risk factors for the presence of non-rhesus D red blood cell antibodies in pregnancy. Int J Obstetr Gynaecol. 2009;116:655–664

PODÍL AUTORŮ NA PŘÍPRAVĚ RUKOPISU

JT – příprava finální verze rukopisu
KT – spoluautor, fotodokumentace
HL – revize rukopisu

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ AUTORŮ

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik a publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

Do redakce doručeno dne: 14. 9. 2022.
Přijato po recenzi dne: 6. 12. 2022.

Mgr. Jana Tylečková
Transfuzní a tkáňové oddělení
FN Brno
Jihlavská 20, 625 00 Brno
e-mail: tyleckova.jana@fnbrno.cz