



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

« Παρατηρήσεις επί των αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων (Screening) σε έγκυες και νεογνά, συσχέτιση με την αιμολυτική νόσο του νεογνού.»

Καραγιώργου Αγγελική (Α.Μ: DML 16005)

Επιβλέπων: Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Επ. Καθηγητής Εργαστηριακής Αιματολογίας –Αιμοδοσίας.

Τριμελής Επιτροπή: Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Φούντζουλα Χριστίνα

Γεωργατζάκου Χαρά

Αθήνα 2018

UNIVERSITY OF WESTERN ATTICA
SCHOOL OF HEALTH AND WELFARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
POSTGRADUATE STUDY PROGRAM
“BIOMEDICAL METHODS AND TECHNOLOGIES IN DIAGNOSIS”
POSTGRADUATE STUDY

“OBSERVATIONS ON THE MATERNAL RED BLOOD CELLS
ALLOIMMUNISATION SCREENING FOR PREGNANT AND NEWBORN AND
THE CONNECTION TO THE HAEMOLYTIC DISEASE OF THE NEWBORN
(HDN)”

Karagiorgou Aggeliki (N.S. DML 16005)

Supervisor: Kriebardis Anastasios

Assistant Professor of Laboratory Hematology and Transfusion Medicine

Thesis Committee: Kriebardis Anastasios

Foutzoula Christina

Georgatzakou Hara

Athens 2018

Η τριμελής επιτροπή

Εισηγητής: Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Μέλος: Φούντζουλα Χριστίνα

Μέλος: Γεωργατζάκου Χαρά

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση» του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών. Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και διαδραμάτισαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της. Πρώτο από όλους θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής εργασίας, Επίκουρο Καθηγητή Κριεμπάρδη Αναστάσιο για την πολύτιμη καθοδήγηση του και την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που μου έδειξε. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή των κεντρικών εργαστηρίων της Μαιευτικής Γυναικολογικής Κλινικής Ρέα κ. Αποστολακόπουλο Παναγιώτη, καθώς και τον υπεύθυνο Ιατρό της Αιμοδοσίας κ. Καναβό Γεώργιο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν αλλά, τις γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσαν και συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Τις ευχαριστίες μου εκφράζω και στις καθηγήτριες Φουντζουλα Χριστίνα και Γεωργατζάκου Χαρά που δέχτηκαν να είναι μέλη στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της μεταπτυχιακής εργασίας.

Περιεχόμενα	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
A. Εισαγωγή.....	7
A.1 Ερυθροκύτταρα	7
A.1.1 Λειτουργίες πρωτεϊνών επιφανείας ερυθροκυττάρων	7
A.1.2 Μεταφορείς μεμβράνης και κανάλια	8
A.1.3 Η ουρία μεταφορέα ουρίας UT-B, η γλυκοπρωτεΐνη αίματος Kidd.....	8
A.1.4 Διάλυτοι νερού και γλυκερόλης, AQP1 και AQP3, οι γλυκοπρωτεΐνες ομάδας αίματος Colton και Gill	9
A.1.5 Το μακροσύμπλοκο της πρωτεΐνης της ζώνη-3 /Rh πρωτεΐνης.....	10
A.1.6 Υποδοχείς και μόρια προσκόλλησης.....	12
A.1.7 Η υπεροικογένεια ανοσοσφαιρίνης	14
A.1.8 Οι γλυκοπρωτεΐνες Lu	14
A.1.8 ICAM4, το αντιγόνο LW.....	15
A.1.9 Ένζυμα.....	16
A.2 Σύστημα ABO	18
A.2.1 Βιοχημεία.....	19
A.2.2 ABO στην ανάπτυξη και τη γήρανση.....	19
A.2.3 Γενετική.....	20
A.2.4 Υποομάδες ABO.....	21
A.2.5 B και A Φαινότυπος	23
A.2.6 ABO Αντισώματα Anti-A και Anti-B	24
A.2.6.1 Αντι-A και αντι- B	24
A.2.6.2 Anti-A ₁	25
A.2.7 Δοκιμασία ρουτίνας για το ABO	25
A.3 Σύστημα Rh.....	26
A.3.1 Ορολογία.....	29
A.3.2 Rh Γονίδια και Rh Πρωτεΐνες.....	30
A.3.3 Αντιγόνα Rh.....	31
A.3.3.1 Rh Φαινότυποι	31
A.3.3.2 Rh D αντιγόνο	32
A.3.3.2.1 D θετικό (Rh θετικό)	32
A.3.3.2.2 WEAK D (ΠΡΩΗΝ Du).....	33
A.3.3.2.3 D _{e1}	33

A.3.3.2.4	D Partial (Μερικό D)	33
A.3.3.2.5	D και D-like επίτοποι στο RHCE	34
A.3.3.2.6	D αρνητικό (Rh αρνητικό).....	35
A.3.4	Δοκιμασίες για το D	35
A.3.4.1	Αντιδραστήρια	35
A.3.4.2	Δότες.....	36
A.3.4.3	Δυσλειτουργίες στην αναγνώριση του D αντιγόνου	37
A.3.4.3.1	Κλινικές εκτιμήσεις	37
A.3.5	Αντιγόνο G	38
A.3.6	Αντιγόνα C/c και E/e	38
A.3.7	Κλινικές εκτιμήσεις	39
A.3.8	Γονότυπος του Rh.....	39
A.3.8	Λειτουργία των πρωτεϊνών RhCE και RhD	40
A.3.9	Αντισώματα Rh.....	40
A.3.10	Τεχνικές ελέγχου δοκιμασιών Rh.....	41
A.3.10.1	Αντιδραστήρια και ελέγχους υψηλής πρωτεΐνης	41
A.3.10.2	Αντιδραστήρια και έλεγχοι χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες.....	42
A.3.10.3	Αιτίες ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων ανάγνωσης του Rh.....	43
A.4	Άλλα Συστήματα	44
A.4.1	Σύστημα MNS	45
A.4.1.1	Οι MNS Γλυκοπρωτεΐνες και τα γονίδια που τις κωδικοποιούν.....	45
A.4.2	Σύστημα Kell και Kx	46
A.4.3	Σύστημα Duffy	46
A.4.4	Σύστημα Kidd.....	47
A.4.4.1	Jk ^a (JK1) και Jk ^b (JK2).....	47
A.4.4.2	Jk (a-b-) και Jk3	47
A.4.5	Σύστημα Diego	48
A.5	Ερυθροκυτταρική αλλοανοσοποίηση στην εγκυμοσύνη.....	48
A.5.1	Ιστορικές προοπτικές.....	49
A.5.2	Η συμβολή της ανοσοπροφύλαξης.....	50
A.5.3	Παθοφυσιολογία.....	50
A.5.4	Πρόληψη της αιμολυτικής νόσου RhD του εμβρύου και του νεογέννητου	52
A.5.5	Διαγνωστική μέθοδος προσδιορισμού μητρικού αντισώματος	53
A.5.5.1	Δοκιμασίες In Vitro	54
A.5.5.2	Ταυτοποιώντας το Εμβρυικό αίμα μέσω της γενετικής.....	55

A.5.6	Αιμολυτική Νόσος του εμβρύου και του νεογέννητου που προκαλούνται από μη-RhD αντισώματα.....	58
A.5.6.1	Αντι-Rhc	59
A.5.6.2	Αντι-RhC, -RhE και -Rhe.....	59
A.5.6.3	Αντι-RhG	60
A.5.6.4	Αντι- K (K1).....	60
A.5.6.5	Anti-M	61
A.5.6.6	Anti-S.....	62
A.6	Ανίχνευση αντισωμάτων, ταυτοποίηση αντισωμάτων και ορολογική συμβατότητα. 62	
A.6.1	Ανίχνευση αντισωμάτων στα Ερυθροκύτταρα ΙΑΤ	62
A.6.2	Πίνακες ταυτοποίησης αντισωμάτων	63
A.6.3	Αντιδραστήρια αντισφαιρίνης DAT	64
B.	Ειδικό Μέρος.....	67
B.1.	Σκοπός.....	67
B.2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	67
B.2.1	Υλικά	67
B.2.2	Μεθοδολογία	67
B.2.2.1	Μέθοδος.....	69
B.2.2.2	Ερμηνεία αποτελεσμάτων.....	69
B.3.	Στατιστική Ανάλυση	70
Γ.	Αποτελέσματα	71
Γ.1	Έγκυες Αρνητικές επί Rh D αντιγόνο	71
Γ.2	Έγκυες Θετικές επί Rh D αντιγόνο	72
Γ.3	Rh D αντισώματα και αντί-IgG.....	75
Γ.4	Τίτλος αντισωμάτων.....	76
Γ.5	Νεογνά και Άμεση Coombs	78
Γ.6:	Rh Θετικές μητέρες και θετική Coombs (Έμμεση -Άμεση)	81
Γ.7	Στατιστική επεξεργασία	82
Γ.8	Σύνοψη αποτελεσμάτων.....	82
E.	Συζήτηση.....	85
ΣΤ.	Συμπέρασμα	91
H.	Βιβλιογραφία.....	93

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανίχνευση ανάπτυξης αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων στις έγκυες και η συσχέτισή τους με την αιμολυτική νόσο του εμβρύου νεογνού στην Ελλάδα δεν είναι γνωστή. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της συχνότητας, της ειδικότητας ανίχνευσης των αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων και η συσχέτισή τους με πιθανή αιμολυτική νόσο. Συνολικά μελετήθηκαν 6700 έγκυες γυναίκες που προσήλθαν σε διάστημα 4 ετών στην Μαιευτική Κλινική ΠΕΑ. Έγινε καταγραφή του ιατρικού ιστορικού των εγκύων. Προσδιορίστηκε η ομάδα αίματος κατά ABO, το σύστημα Rhesus D, C, c, E, e και Kell και πραγματοποιήθηκε ανίχνευση αλλοαντισωμάτων και ταυτοποίηση αυτών σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος με την μέθοδο έμμεσης Coombs. Εν συνεχεία στα νεογνά των γυναικών με θετική ανίχνευση αλλοαντισωμάτων πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός ομάδας αίματος κατά ABO και Rhesus D, C, c, E, e και Kell καθώς και ανίχνευση αιμόλυσης με την μέθοδο της άμεσης Coombs. Από τις 6700 γυναίκες που μελετήθηκαν οι 346 (5,16%) παρουσίασαν θετικό στην ύπαρξη αλλοαντισωμάτων, εκ των οποίων οι 255 (73,7%) εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα λόγω χορήγηση αντί-D γ-σφαιρίνης (RhDIgG), έχοντας ως συνέπεια την απόκλιση αυτών από την μελέτη, 91 γυναίκες (1,3%) εκ του συνόλου παρουσίασαν θετικά αποτελέσματα λόγω ευαισθητοποίησης. Το πιο σημαντικό κλινικά και συχνά εμφανιζόμενο αλλοαντίσωμα ήταν το αντί-D (0,22% εκ του συνόλου). Σημαντική όμως είναι και η παρουσία άλλων αλλοαντισωμάτων τα οποία παρουσίασαν και αυτά ένα βαθμό αιμόλυσης στα νεογνά. Φαίνεται πως η σωστή λήψη του μαιευτικού ιστορικού καθώς και ο καθολικός έλεγχος των αντισωμάτων στην αρχή της κύησης, δίνουν την δυνατότητα ώστε να ληφθούν μέτρα για μια πιθανή διάγνωση και αντιμετώπιση της αιμολυτικής νόσου εμβρύου- νεογνού.

ABSTRACT

The incidence and specificity of maternal red blood cell alloimmunisation and the correlation for Hemolytic Disease of the Newborn (HDN) is still unknown in Greece. The main cause of the present study is the assessment of frequency maternal red blood cells alloimmunisation screening and the connection to the haemolytic disease of the Newborn. There was performed a 4 year study in REA Maternity Hospital in Greece. Demographics transfusion and obstetric history were analyzed. Maternal alloimmunisation was detected with indirect anti-globulin test and newborn with direct anti-globulin test. From the 6700 pregnant women tested, 346 of them (5,16%) were alloimmunised positive when 255 (73.7%) of them were given RhDIgG. According to this, it is accepted that 91 pregnant women were found alloimmunised positive. Providing complete and accurate health and medical history of the female patient as well as general antibody testing at the very first beginning of pregnancy can positively affect the procedure by taking the appropriate measures for possible diagnosis and treatment of fetal-hemolytic hemolytic disease.

A. Εισαγωγή

A.1 Ερυθροκύτταρα

Η πρωταρχική λειτουργία των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων του αίματος είναι η μεταφορά του οξυγόνου (O_2) από τους πνεύμονες στους ιστούς. Το ερυθροκύτταρο είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένο κύτταρο. Περιβάλλεται από μια μεμβράνη διπλής στιβάδας φωσφολιπιδίων, ενώ στο εσωτερικό του κυττάρου βρίσκεται η αιμοσφαιρίνη. Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει μια πληθώρα πρωτεϊνών, με τις περισσότερες να είναι γλυκοζυλιωμένες. Πολλές από τις πρωτεΐνες αυτές ενισχύουν την αποτελεσματικότητα των ερυθροκυττάρων ως μεταφορείς του O_2 .

A.1.1 Λειτουργίες πρωτεϊνών επιφανείας ερυθροκυττάρων

Πολλές από τις επιφανειακές πρωτεΐνες των ερυθροκυττάρων είναι πολυμορφικές. Αυτή η δομή καθιστά τα ερυθροκύτταρα ως αλλοαντιγόνα. Τα αντισώματα αυτών των δομών είναι σημαντικά κατά την διαδικασία της μετάγγισης και έχουν οδηγήσει στην ανάγκη για μία λεπτομερή κατανόηση της φύσης της επιφάνειας των ερυθροκυττάρων (1-4)

Οι ομάδες αίματος ABO, H, I, P και P1 είναι δομές υδατανθράκων επί των γλυκοπρωτεϊνών και των γλυκολιπιδίων οι οποίες περιβάλλονται από μεμβράνη ερυθροκυττάρων. Πολύ λίγα είναι γνωστά για τις λειτουργίες αυτών των υδατανθράκων στα ερυθροκύτταρα, όπως η συνεισφορά τους με τον μηχανισμό του καλίου, καθώς και ότι περιβάλλουν το κύτταρο προστατεύοντας το από μηχανικές βλάβες και εισβολή παθογόνων οργανισμών. (5)

Τα περισσότερα συστήματα ομάδων αίματος περιέχουν επιπλέον έναν μηδενικό φαινότυπο στον οποίο λείπουν όλα τα αντιγόνα από το περιβάλλον. Σε πλήρη απουσία της πρωτεΐνης από τη μεμβράνη χαρακτηρίζονται ως Null φαινότυποι, συνήθως προκύπτουν από ομοζυγωτία, με πιθανά αίτια είτε μια μετάλλαξη στο γονίδιο της ομάδα αίματος η οποία απενεργοποιεί τις μεμβράνες πρωτεΐνης, είτε τη διαγραφή μέρους ή του συνόλου του γονιδίου της ομάδας αίματος. Άλλα πιθανά αίτια είναι αδρανοποίηση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί άλλη πρωτεΐνη απαραίτητη για την έκφραση της πρωτεΐνης της ομάδας αίματος. Αυτοί οι μηδενικοί φαινότυποι αντιπροσωπεύουν φυσικούς φαινοτύπους "knockout" και αποδείχθηκαν πολύτιμοι για

την παροχή ενδείξεων προς τις λειτουργίες των πρωτεϊνών, όχι απαραίτητα μόνο στα ερυθροκύτταρα. (1)

Οι δομές των πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφανείας μπορούν να συναχθούν από τις αλληλουχίες αμινοξέων τους, οι οποίες έχουν απομονωθεί με ανοσοχημικές μεθόδους από τις γονιδιακές τους αλληλουχίες. Αυτές οι δομές παρέχουν σημαντικές ενδείξεις στις λειτουργίες τους. Πολλές πρωτεΐνες ανήκουν σε υπεροικογένειες μεγάλων κατηγοριών πρωτεϊνών με δομικά χαρακτηριστικά και συναφείς λειτουργίες. Ορισμένες πρωτεΐνες περιέχουν συναινετικά μοτίβα-αλληλουχίες αρκετών αμινοξέων που είναι χαρακτηριστικά ορισμένων λειτουργιών. Οι πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας μπορεί να έχουν περισσότερες από μία λειτουργίες καθώς και κάποιες έχουν διαφορετικές λειτουργίες σε άλλους ιστούς, σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης ή σε διαφορετικές συνθήκες. Κατά συνέπεια, είναι σημαντικό να μην εξάγονται συμπεράσματα σχετικά με τις λειτουργίες των πρωτεϊνών απλά από τη δομή τους. Επιπλέον, μια πρωτεΐνη μπορεί να είναι ικανή να διεξάγει μια λειτουργία *in vitro*, αλλά να μην εκτελεί την λειτουργία *in vivo*.

A.1.2 Μεταφορείς μεμβράνης και κανάλια

Οι μεταφορείς και οι διάυλοι διευκολύνουν τη μεταφορά βιολογικά σημαντικών μορίων μέσα και έξω από τα ερυθροκύτταρα. Διασχίζουν τη μεμβράνη αρκετές φορές, στα δυο άκρα, στην οποία βρίσκεται η N-γλυκάνη.

A.1.3 Η ουρία μεταφορέα ουρίας UT-B, η γλυκοπρωτεΐνη αίματος Kidd

Η ουρία έχει χαμηλή διαπερατότητα στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Η διαπερατότητα της ουρίας γίνεται υψηλή λόγω της παρουσίας μεταφορέων ουρίας (UT), στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων του αγωγού νεφρικής συλλογής και των ερυθροκυττάρων. Υπάρχουν δύο γονίδια UT στον άνθρωπο: SLC14A1 και SLC14A2, που κωδικοποιούν της πρωτεΐνες UT-B και UT-A, αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη UT-B είναι το αντιγόνο Kidd και, σε αντίθεση με την UT-A, υπάρχει στα ερυθροκύτταρα, καθώς και στην κατιούσα φλέβα και σε άλλα ενδοθηλιακά κύτταρα (6).

Η πρωτεΐνη UT-B παίζει καθοριστικό ρόλο στη συγκέντρωση της ουρίας, στα ερυθροκύτταρα επιταχύνοντας τη μεταφορά της ουρίας στη μεμβράνη αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της ιοανταλλαγής. Βοηθούν με τον τρόπο αυτό τα ερυθροκύτταρα που βρίσκονται μακριά από τους νεφρούς να προσλαμβάνουν την απαραίτητη ουρία (7).

Ο μηδενικός φαινότυπος Kidd-, όπου καμία πρωτεΐνη UT-B δεν είναι παρούσα στο σώμα, προκύπτει από ομοζυγωτία μετάλλαξης η οποία απενεργοποιεί το γονίδιο SLC14A1 (1, 8-10). Γενικά, είναι ένας σπάνιος φαινότυπος, ο οποίος είναι συνηθισμένος στους Πολυνησιακούς, φτάνοντας σε συχνότητες άνω του 1% σε ορισμένα νησιά. Η ουρία διαπερνά τη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων Kidd-null είναι περίπου 1000 φορές βραδύτερη από ότι είναι στα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα (11). Τα άτομα με φαινότυπο Kidd-null δεν έχουν κλινικά συμπτώματα, αλλά, όπως έχει αποδειχθεί σε ποντίκια knockout UT-B, έχουν μειωμένη ικανότητα συμπίκνωσης ούρων κατά περίπου στο ένα τρίτο (12, 13). Η πρωτεΐνη UT-A και οι διάλυλοι ύδατος AQP2 και AQP3 αυξάνονται στο νεφρικό μυελό των ποντικών UT-B, αυξάνοντας τη συγκέντρωση της ουρίας (14). Αυτή η φαινομενική αντιστάθμιση μπορεί να εξηγήσει γιατί τα άτομα Kidd-null έχουν μία ικανότητα μέτριας μείωσης της συγκέντρωσης των ούρων. Η πρωτεΐνη AQP3 παρουσιάζεται στα ερυθροκύτταρα ενώ το AQP2 όχι.

A.1.4 Διάλυτοι νερού και γλυκερόλης, AQP1 και AQP3, οι γλυκοπρωτεΐνες ομάδας αίματος Colton και Gill

Έντεκα μέλη της οικογένειας των υδάτινων αγωγών της υδατοπορίνης βρίσκονται σε θηλαστικά. Δύο από αυτά, τα AQP1 και AQP3, υπάρχουν στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Οι υδατοπορίνες μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες:

- i) Αυτές που μεταφέρουν κυρίως το νερό (AQP1) και
- ii) Αυτές που μεταφέρουν νερό καθώς και άλλες μικρές διαλυμένες ουσίες, όπως οι γλυκερόλες (AQP3).

Οι υδατοπορίνες βρίσκονται στη μεμβράνη ως τετραμερή. Κάθε μονομερές έχει έξι α -ελικοειδείς περιοχές που καλύπτουν τη μεμβράνη, συν έναν εξωκυτταρικό βρόγχο και έναν ενδοκυτταρικό βρόγχο που διπλώνεται στη μεμβράνη για να σχηματίσει ένα πόρο. Κάθε ένας από αυτούς τους βρόγχους περιέχει ένα μοτίβο Asp-Pro-Ala χαρακτηριστικό των υδατοπουρινών.(15, 16)

Ο AQP1 μεταφέρει τους καθοριστικούς παράγοντες του συστήματος των ομάδων αίματος κατά Colton.(17) Εκτός από τα ερυθροκύτταρα, ο διαπερατός από το νερό διάυλος AQP1 υπάρχει στους νεφρούς, στον πνεύμονα, στο αγγειακό ενδοθήλιο, στον εγκέφαλο και στα μάτια. Η ανεπάρκεια AQP1 μπορεί να γίνει σημαντική μόνο υπό συνθήκες στρες. Τα άτομα που είναι ομόζυγα σε μεταλλάξεις που διαταράσσουν τη λειτουργία του AQP1 έχουν τον πολύ σπάνιο φαινότυπο Colton-null και εμφανίζουν περίπου 80% μείωση στις ωσμωτικές διαπερατότητες των ερυθροκυττάρων (18). Σύμφωνα με έρευνα, τα άτομα αυτά είναι απόλυτα υγιή αλλά σε συνθήκες στέρησης νερού δεν είναι σε θέση να συγκεντρώσουν ούρα στο μέγιστο βαθμό. Τα ποντίκια knockout -AQP1 είναι εντελώς υγιή, αλλά αφυδατώνονται σε μεγάλο βαθμό μετά από 36 ώρες στέρησης ύδατος (19).

Ο AQP3, ο οποίος είναι διαπερατός από τη γλυκερίνη και το νερό, και σε μικρότερο βαθμό από την ουρία, βρίσκεται στους νεφρούς, το δέρμα, τους πνεύμονες, τα μάτια και το κόλον (15), υπάρχει επίσης στα ερυθροκύτταρα όπου εκφράζει το αντιγόνο της ομάδας αίματος κατά Gill (20). Ο πολύ σπάνιος φαινότυπος Gill-null, ο οποίος προκύπτει από την ομοζυγωτία, μιας μετάλλαξης θέσης στο AQP3, δεν συσχετίζεται με κανένα προφανές κλινικό σύνδρομο (20). Τα AQP3 knockout ποντίκια έδειξαν προβλήματα στη συμύκνωση των ούρων και ελαττώματα στο δέρματος τους (21).

A.1.5 Το μακροσύμπλοκο της πρωτεΐνης της ζώνης-3 /Rh πρωτεΐνης

Η γλυκοπρωτεΐνη, κοινώς γνωστή ως ζώνη-3, ανιοντοανταλλάκτης των ερυθροκυττάρων (AE1), βρίσκεται σε αφθονία στα ερυθροκύτταρα με περίπου 10^6 αντίγραφα ανά κύτταρο και επίσης βρίσκεται σε τροποποιημένη μορφή στα απαραιτητικά κύτταρα του νεφρού (22, 23). Η πρωτεΐνη ζώνης-3 περιλαμβάνει τρεις περιοχές:

(i) κυτταροπλασματική αμινοτελική περιοχή, 403 αμινοξέων, η οποία αλληλεπιδρά με την αγκυρίνη και την πρωτεΐνη 4,2 του σκελετού της μεμβράνης, καθώς επίσης αλληλεπιδρά με γλυκολυτικά ένζυμα, την δεοξυαιμοσφαιρίνη και τις υπομονάδες.

(ii) μεμβρανική περιοχή, 479 αμινοξέων, η οποία εκτείνεται σε μήκος 14 φορές από την μεμβράνη και

(iii) κυτταροπλασματική καρβοξυτελική περιοχή, 29 αμινοξέων, που δεσμεύει την ανθρακική ανυδράση II (CAII), αν και αυτό αμφισβητήθηκε πρόσφατα. (24)

Τα 21 αντιγόνα του συστήματος Diego αντιπροσωπεύουν αμινοξέα στην εξωτερική επιφάνεια της ζώνης-3 (1). Η ζώνη-3 παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματική μεταφορά των αναπνευστικών αερίων του αίματος. Στα ερυθροκύτταρα υπό την παρουσία νερού (H_2O), το CAII ενυδατώνει το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) τα HCO_3^- ιόντα και H^+ . Η ζώνη-3, μεταφέρει τα HCO_3^- ιόντα έξω από το κύτταρο σε ανταλλαγή ιόντων χλωρίου. Το πρωτόνιο στη συνέχεια αλληλεπιδρά με την αιμοσφαιρίνη και προάγει την απελευθέρωση του O_2 . Το HCO_3^- είναι περισσότερο διαλυτό από το CO_2 και η διαδικασία αυτή υποστηρίζει την μεταφορά του CO_2 και την απελευθέρωση του O_2 στους ιστούς, με την αντίστροφη διαδικασία που συμβαίνει στους πνεύμονες (22, 23).

Τρία μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Rh είναι παρόντα στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα RhD και RhCcEe, τα οποία εκφράζουν τα αντιγόνα του συστήματος ομάδας αίματος κατά Rh (αν και το RhD απουσιάζει από τα D-αρνητικά ερυθροκύτταρα) και τη σχετική γλυκοπρωτεΐνη RhAG. Η RhAG δεν έχει δραστηριότητα ομάδας αίματος Rh, αλλά η απουσία της, που προκύπτει από την ομοζυγία απουσίας ή λόγω μεταλλάξεων, έχει ως αποτέλεσμα τον φαινότυπο Rh-null (1, 25). Οι RhD, RhCcEe και RhAG είναι πολυτοπικές πρωτεΐνες, με κυτταροπλασματικά N- και C- τελικά πεπτιδία και 10 πεδία μεμβράνης. Σε αντίθεση με RhD και RhCcEe, η RhAG γλυκοζυλιώνεται σε μία από τις εξωτερικές περιοχές και επομένως μοιάζει με μεταφορέα μεμβράνης.

Οι λειτουργίες αυτών των Rh πρωτεϊνών σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα δεν είναι γνωστές. Η RhAG έχει ταυτότητα αλληλουχίας περίπου 25% με τους μεταφορείς αμμωνίου Amt και Mep σε βακτήρια και σε άλλους χαμηλότερους οργανισμούς. Διατηρεί συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης που απαιτούνται για την μεταφορά NH_4^+ και υιοθετεί την διαμόρφωση καναλιών παρόμοια με εκείνη των Amt πρωτεϊνών. Υπάρχουν άφθονες ενδείξεις ότι η RhAG έχει την ικανότητα να μεταφέρει NH_4^+ ή να ενεργεί ως μεταφορέας αμμωνίας (NH_3) και έχει προταθεί ότι η RhAG προάγει την

NH_4^+ κατακράτηση στα ερυθροκύτταρα, για τη μεταφορά αυτού μακριά από τον εγκέφαλο, όπου αυτό είναι τοξικό. (26)

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν επίσης ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας Amt/Mep/Rh είναι δυνατό να λειτουργήσουν ως κανάλια για το CO_2 , ένα μόριο παρόμοιο σε μέγεθος με NH_3 (26). Η RhAG, σε τριμερή ή τετραμερή σύνδεση με RhD και RhCcEe, αποτελεί μέρος ενός τετραμερούς μακροσύνμπλοκου της ζώνης-3, με το μόριο διακυτταρικής προσφύσεως 4 (ICAM4, LW γλυκοπρωτεΐνη), CD47 και τις γλυκοφορίνες A και B (27). Ο Bruce και οι συνεργάτες, εικάζουν ότι η ζώνη-3/Rh μακροσύνμπλοκου δρα ως O_2/CO_2 μεταβολικής ανταλλαγής. Η RhAG θα μπορούσε να είναι ένα σχετικά μη εξειδικευμένο κανάλι για ουδέτερα μικρά μόρια και να λειτουργεί ως διάυλος αερίων για το CO_2 και το O_2 . Αλλά ως μέρος του μακροσύνμπλοκου ζώνης-3/Rh η RhAG βρίσκεται σε ιδανική τοποθεσία για τη διοχέτευση CO_2 προς και από την CAII και O_2 προς και από την αιμοσφαιρίνη.

Επιπρόσθετα, τα μόρια προσκόλλησης ICAM4 και CD47 μπορεί να βοηθήσουν στη διευκόλυνση των παροδικών αλληλεπιδράσεων συγκόλλησης μεταξύ του ερυθροκυττάρου και του αγγειακού ενδοθηλίου για μεγιστοποίηση της μεταφοράς αερίων. Το μακροσύνμπλοκο ζώνη-3/Rh μπορεί επίσης να συνδέεται με τον AQP1 στη μεμβράνη, η οποία παρέχει το H_2O που είναι αναγκαίο για την ενυδάτωση του κυττάρου (27). Η ζώνη-3 χρησιμεύει επίσης στην πρόσδεση της μεμβράνης στον κυτταροσκελετό. Τα φυσικά απαντώμενα αντισώματα στη ζώνη 3 τροποποιημένα με οξειδάση μπορεί να είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση των γερασμένων ερυθροκυττάρων (28). Βρέφος που ήταν ομόζυγο για μετάλλαξη στο γονίδιο της ζώνης-3 (SLC4A1) το οποίο κωδικοποιεί το Val488Met εμφάνισε πλήρη ανεπάρκεια στη ζώνη-3 και την πρωτεΐνη. Το βρέφος περιγράφηκε ως ένα έντονα υδρόφοβο και αναιμικό μωρό που γεννήθηκε με έκτακτη καισαρική τομή, ανατάχθηκε και στη συνέχεια διατηρήθηκε ζωντανό με μετάγγιση αίματος. Το επίχρισμα αίματος ομφάλιου λώρου αποκάλυψε δραματική ερυθροβλάστωση και ανισοκυττάρωση. (29)

A.1.6 Υποδοχείς και μόρια προσκόλλησης

Η γλυκοπρωτεΐνη Duffy, γνωστή επίσης ως DARC -αντιγόνο/ υποδοχέας Duffy-, είναι ένας πολυτοπικός υποδοχέας χημειοκίνης, η οποία διασχίζει τη

μεμβράνη επτά φορές με ένα εξωκυτταρικό N-άκρο, ανήκει στην υπερικογένεια των συζευγμένων με πρωτεΐνη G υποδοχέων που δεσμεύουν πολλούς διαφορετικούς συνδέτες κυρίως χημειοκίνες. Η DARC, ωστόσο, στερείται του χαρακτηριστικού μοτίβου Asp-Arg-Tyr (DRY) στη δεύτερη κυτταροπλασματική περιοχή που απαιτείται για την σύζευξη της πρωτεΐνης G και κατά συνέπεια είναι απίθανο να εμπλέκεται στην κυτταρική σηματοδότηση. Εκτός από την ύπαρξη σε ερυθροκύτταρα, η DARC βρίσκεται σε αφθονία στο ενδοθήλιο των φλεβών καθώς και των φλεβών πολλών οργάνων (30, 31).

Οι χημειοκίνες είναι κατά κύριο λόγο εκκρινόμενες χημειοτακτικές κυτταροκίνες οι οποίες λειτουργούν κυρίως για να επάγουν την κίνηση των λευκοκυττάρων. Η DARC είναι ένας μη ανεστραμμένος υποδοχέας χημειοκίνης, ο οποίος δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια κατά 60% με τις φλεγμονώδεις χημειοκίνες αμφότερων των κατηγοριών CXC και CC, αλλά όχι με τις ομοιοστατικές χημειοκινών (32). Η DARC στα ερυθροκύτταρα θεωρείται ότι λειτουργεί ως υποδοχέας, δεσμεύοντας περίσσεια χημειοκινών για να αποτρέψει την ακατάλληλη ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων και να διαταράξει τις κλίσεις των χημειοκινών (33). Δεν είναι γνωστό πόσο καιρό οι χημειοκίνες παραμένουν συνδεδεμένες με την DARC στα ερυθροκύτταρα μέχρι την απομάκρυνση τους από την κυκλοφορία (31, 34).

Η DARC στα ενδοθηλιακά ερυθροκύτταρα μπορεί να διαδραματίσει παρόμοιο ρόλο με αυτόν στα ερυθροκύτταρα (31, 34, 35). Η DARC μπορεί επίσης να μεταφέρει χημειοκίνες διαμέσου του ενδοθηλιακού φραγμού (31, 34) και φαίνεται να είναι ένας καταστολέας της ανάπτυξης του καρκίνου του προστάτη, του μαστού και του μη μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (36-38). Επιπλέον, η DARC στο αγγειακό ενδοθήλιο αλληλεπιδρά άμεσα με μια τετρασπανίνη CD82 στα καρκινικά κύτταρα. Η CD82 είναι ένας καταστολέας της μετάστασης, η αλληλεπίδραση μεταξύ DARC και CD82 αναστέλλει την εξάπλωση του καρκίνου σε απομακρυσμένες περιοχές και επίσης φαίνεται να προκαλεί γήρανση των καρκινικών κυττάρων.(39)

Η DARC ως υποδοχέας βοηθάει το *Plasmodium vivax* στη μόλυνση των ερυθροκυττάρων. Οι περισσότεροι Αφρικανοί από περιοχές όπου η ελονοσία είναι ενδημική, είναι ομόζυγοι για μια μετάλλαξη στην θέση πρόσδεσης της μεταγραφής που είναι ειδική για την ερυθροειδή GATA-1 στο γονίδιο της DARC. Κατά συνέπεια, ενώ η DARC απουσιάζει από τα ερυθροκύτταρα και έτσι είναι ανθεκτικά στην

ελονοσία, παρόλα αυτά η DARC εξακολουθεί να εκφράζεται στο αγγειακό ενδοθήλιο. Το εκλεκτικό πλεονέκτημα αυτής της μετάλλαξης είναι προφανές και δείχνει ότι η λειτουργία της DARC στα ερυθροκύτταρα είναι ζωτικής σημασίας (40).

A.1.7 Η υπεροικογένεια ανοσοσφαιρίνης

Η υπεροικογένεια ανοσοσφαιρίνης (IgSF) είναι μια μεγάλη οικογένεια υποδοχέων και μορίων προσκόλλησης με εξωκυτταρικές περιοχές που περιέχουν διαφορετικούς αριθμούς επαναλαμβανόμενων περιοχών με ομοζυγία αλληλουχίας με περιοχές ανοσοσφαιρίνης. Κάθε περιοχή IgSF αποτελείται από περίπου 100 αμινοξέα και είναι δομημένη σε δύο β-φύλλα σταθεροποιημένα με έναν διατηρημένο δεσμό δισουλφιδίου.

Οι IgSF γλυκοπρωτεΐνες λειτουργούν κυρίως ως υποδοχείς, μόρια προσκόλλησης καθώς μπορεί και να εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος. Τα μόρια IgSF στα ερυθροκύτταρα περιλαμβάνουν τις γλυκοπρωτεΐνες Lutheran (Lu), ICAM4, σχετιζόμενα με την πρωτεϊνική μεμβράνη του ερυθροβλάστη (ERMAP, πρωτεΐνη JMΗ), αντιγόνο Scianna, basigin (Ok αντιγόνο) και CD47. Τα ICAM4 και CD47 είναι μέρος της ζώνης-3/Rh του μακρομορίου. Το Lutheran και το ICAM4 αποτελούν θέματα έντονης ερευνητικής δραστηριότητας τα τελευταία χρόνια.(37)

A.1.8 Οι γλυκοπρωτεΐνες Lu

Τα 19 αντιγόνα του συστήματος ομάδας αίματος κατα Lu βρίσκονται σε δύο ισομορφές της γλυκοπρωτεΐνης Lu. Κάθε ισομορφή έχει πέντε εξωτερικές περιοχές IgSF, αλλά διαφέρουν ως προς τα μήκη των κυτταροπλασματικών περιοχών τους ως αποτέλεσμα της εναλλακτικής έκφρασης της Lu mRNA. Η βραχύτερη γλυκοπρωτεΐνη Lu είναι επίσης γνωστή ως Lu(v13) και για ιστορικούς λόγους, ως μόριο προσκόλλησης (BCAM). Και οι δύο ισομορφές αντιδρούν με μονοκλωνικά αντισώματα που ορίζουν το BCAM. Και οι δύο αλληλεπιδρούν άμεσα με την σπεκτρίνη του σκελετού της μεμβράνης, μέσω του Arg-Lys στις θέσεις 573-574 των κυτταροπλασματικών τους άκρων (41). Αυτή η αλληλεπίδραση θα μπορούσε να είναι σημαντική στις λειτουργίες της σηματοδότησης και των υποδοχέων (42).

Οι γλυκοπρωτεΐνες Lu απαντώνται σε διάφορους ιστούς των ενηλίκων, συμπεριλαμβανομένων της γλώσσας, της τραχείας, του οισοφάγου, του δέρματος, του τραχήλου, του ειλεού, του κόλον, του στομαχιού και της χοληδόχου κύστης. Η έκφραση είναι ιδιαίτερα υψηλή στα ενδοθήλια των αρτηριακών τοιχωμάτων (43, 44). Οι γλυκοπρωτεΐνες Lu δεσμεύουν τη λαμινίνη, ένα συστατικό της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM) που είναι άφθονη στις βασικές μεμβράνες και επίσης υπάρχει στο αγγειακό ενδοθήλιο. Οι 15 γνωστοί τύποι λαμινίνης αποτελούνται από διαφορετικές ισομορφές τριών πρωτεϊνικών αλυσίδων (α, β και γ). Οι γλυκοπρωτεΐνες Lu δεσμεύονται ειδικά και με υψηλή συγγένεια με τις LN-10 και -11, τις δύο μορφές λαμινίνης που περιέχουν α5 αλυσίδες. (45)

Κατά τη διάρκεια της *in vitro* ερυθροποίησης, οι γλυκοπρωτεΐνες Lu εμφανίζονται στα ερυθροκύτταρα περίπου στο στάδιο της ορθοχρωμικής ερυθροβλάστης (46, 47). Αυτή η καθυστερημένη εμφάνιση συσχετίζεται με τη δέσμευση των κυττάρων με τη λαμινίνη (48). Η παρουσία των LN-10/11 επί του μυελού των οστών στο ημιτονοειδές ενδοθήλιο έχει οδηγήσει σε εικασίες ότι οι γλυκοπρωτεΐνες Lu εμπλέκονται στη διευκόλυνση της κυκλοφορίας ωρίμανσης των ερυθροκυττάρων από τον μυελό των οστών, σε όλα τα ημιτονοειδή κύτταρα του ενδοθηλίου, στο περιφερικό αίμα (45-47). Οι γλυκοπρωτεΐνες Lu μπορούν επίσης να διαδραματίσουν ένα ρόλο στη μετανάστευση των ερυθροκυτταρικών προγόνων από το εμβρυϊκό ήπαρ στο μυελό των οστών. (43) Καμία προφανής παθολογία δεν συνδέεται με τους «Lu null» ή «σχεδόν null» φαινοτύπους. (1)

A.1.8 ICAM4, το αντιγόνο LW

Το LW είναι το αρχικό αντιγόνο «Rhesus» και μοιράζεται μια φαινοτυπική σχέση με τον RhD (1). Το εξωτερικό τμήμα του μορίου περιλαμβάνει δύο περιοχές I-set IgSF όπου σχετίζεται δομικά με το ICAM2 και με τις πρώτες δύο περιοχές IgSF του ICAM1 και του ICAM3. Κατά συνέπεια, η γλυκοπρωτεΐνη LW ονομάστηκε ICAM4 (49). Τα ICAMs είναι συνδέτες για τις ιντεγκρίνες, οι οποίες είναι μόρια προσκόλλησης που αποτελούνται από ετεροδιμερή για διάφορες διαμεμβρανικές υπομονάδες α και β. Αν και τα άλλα ICAMs είναι αρκετά συγκεκριμένα για μία μόνο ιντεγκρίνη, το ICAM4 φαίνεται να αλληλεπιδρά με μια ποικιλία ιντεγκρινών: αLβ2,

$\alpha\text{M}\beta 2$, $\alpha\beta 2$, $\alpha\text{IIb}\beta 3$, $\alpha\text{V}\beta 1$, $\alpha\text{V}\beta 3$, $\alpha\text{V}\beta 5$ και $\alpha 4\beta 1$, αν και η σύνδεση $\alpha 4\beta 1$ είναι αμφιλεγόμενη (50).

Τα ICAM 1, 2 και 3 είναι μόρια προσκόλλησης των λεμφοκυττάρων, των κοκκιοκυττάρων και των μονοκυττάρων και μπορεί να εκφράζονται ευρύτερα, αλλά το ICAM4 φαίνεται να περιορίζεται στα ερυθροκύτταρα και πιθανώς στον πλακούντα (51). Κατά τη διάρκεια της ex vivo ερυθροποίησης, η LW ανιχνεύεται γύρω από το στάδιο σχηματισμού μονάδας-ερυθροειδούς (CFU-E) σε προ-ερυθροβλάστη (46, 47). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της ερυθροβλάστης, συσσωματώνεται γύρω από τα μακροφάγα του μυελού των οστών για να σχηματιστούν οι ερυθροβλαστικές νησίδες, όπου οι ερυθροβλάστες εξωθούν τους πυρήνες τους, οι οποίοι απορροφούνται από τα μακροφάγα. (51)

Στα ερυθροκύτταρα, η σύνδεση του ICAM4 με την ιντεγκρίνη μακροφάγου/ μονοκυττάρων στα μακροφάγα στον σπλήνα διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην απομάκρυνση, των γηρασμένων ερυθροκυττάρων (52). Ως τμήμα της ζώνης-3/ Rh της επιφανείας των ερυθροκυττάρων, το ICAM4 χρησιμεύει στη διευκόλυνση παροδικών αλληλεπιδράσεων, για την μεγιστοποίηση της μεταφοράς αερίων, με τον μηχανισμό συγκόλλησης μεταξύ του ερυθροκυττάρου και του αγγειακού ενδοθηλίου (27). Ωστόσο, η λειτουργική σημασία του ICAM4 πρέπει να εξεταστεί υπό το φως της απουσίας οποιασδήποτε προφανούς παθολογίας που σχετίζεται με την απουσία του στον σπάνιο κληρονομικό LW-null φαινότυπο και στο Rh null.(52)

A.1.9 Ένζυμα

Τρεις γλυκοπρωτεΐνες επιφανείας ερυθροκυττάρων έχουν δομές που υποδεικνύουν δραστηριότητα ενζύμου. Δύο είναι ενζυματικά δραστικές:

- i) η ακετυλοχολινεστεράση, το αντιγόνο της ομάδας αίματος Yt, είναι ένας νευροδιαβιβαστής, αλλά με άγνωστη λειτουργία στα ερυθροκύτταρα και
- ii) η γλυκοπρωτεΐνη Kell, η οποία είναι μια ενδοπεπτιδάση.

Η ομολογία της αλληλουχίας υποδηλώνει ότι η γλυκοπρωτεΐνη ART4, που φέρει τα πέντε αντιγόνα του συστήματος Dombrock, ανήκει σε μια οικογένεια διφωσφορικών αδενοσίνης (ADP) -ριβοςουλτρασφαιρών, αν και η ενζυμική δραστηριότητα στα ερυθροκύτταρα δεν έχει καταδειχθεί (53).

Η κανονική έκφραση των αντιγόνων της ομάδας αίματος Kell απαιτεί την παρουσία δύο πρωτεϊνών, που συνδέονται ομοιοπολικά μέσω δισουλφιδικού δεσμού. Το Kell κωδικοποιείται από το KEL στο χρωμόσωμα 7, το οποίο ελέγχει τους πολυμορφισμούς Kell και το Xk, που κωδικοποιείται από το X-συνδεδεμένο γονίδιο XK. Το Kell ανήκει στην οικογένεια των εξαρτώμενων από ψευδάργυρο ενδοπεπτιδασών, ένζυμα που επεξεργάζονται μια ποικιλία βιολογικά δραστικών πεπτιδίων. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Kell και τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα που εκφράζουν την ενδοθηλίνη 3 της ομάδας Kell είναι ένα ισχυρό αγγειοσυσταλτικό, μετά από διάσπαση του βιολογικά ανενεργού προγόνου της (54).

Η λειτουργία της γλυκοπρωτεΐνης Kell, ωστόσο, παραμένει ασαφής και δεν είναι γνωστό αν η γλυκοπρωτεΐνη Kell επεξεργάζεται οποιαδήποτε άλλα βιοπεπτίδια. Δεν υπάρχει προφανής παθολογία συνδεδεμένη με τον φαινότυπο Kell-null, K₀. Αντίθετα, η απουσία των Xk έχει ως αποτέλεσμα το σύνδρομο McLeod, που χαρακτηρίζεται από νευροακανθοκύτωση, μυϊκή δυσλειτουργία και ψυχιατρικά συμπτώματα, συνήθως μετά την τέταρτη δεκαετία της ζωής και επιπλέον εξασθενημένη έκφραση των αντιγόνων Kell. Το Xk είναι μια μη γλυκοζυλιωμένη πολυτοπική πρωτεΐνη που διαπερνά τη μεμβράνη 10 φορές και φέρει κάποια ομοιότητα με έναν μεταφορέα γλουταμινικού που εξαρτάται από Na⁺. Είναι πιθανό ότι η απουσία του Xk από τον εγκέφαλο, όπου εκφράζεται ανεξάρτητα από τον Kell, είναι υπεύθυνη για τα περισσότερα από τα συμπτώματα που σχετίζονται με το σύνδρομο McLeod (55).

Ο σκελετός της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων, που συχνά αναφέρεται ως κυτταροσκελετός, είναι ένα δίκτυο γλυκοπρωτεϊνών υπεύθυνο για τη διατήρηση της ακεραιότητας του ερυθροκυττάρου. Η αποτελεσματική πρόσδεση της μεμβράνης στον σκελετό είναι πολύ σημαντική για τη διατήρηση του σχήματος και της ευκαμψίας του ερυθροκυττάρου καθώς συμπιέζεται μέσω των μικρότερων τριχοειδών του αγγείων. Η ζώνη-3 έχει ένα εκτεταμένο N-τερματικό πεδίο προσαρτημένο στον σκελετό της μεμβράνης μέσω της αγκυρίνης και των πρωτεϊνών 4,2 και 4,1R. Τα άτομα που είναι ετερόζυγα σε μεταλλάξεις στο SLC4A1 έχουν συχνά κληρονομική ελλειψοκυττάρωση ή κωκιοκύτωση. Στην Νοτιοανατολική Ασία εμφανίζονται πιο συχνά άτομα με αυτήν την ετεροζυγωτία (23).

Η γλυκοφορίνη C (GPC), η GPD και οι γλυκοπρωτεΐνες Gerbich (Ge) έχουν C-τερματικές περιοχές συνδεδεμένες στον σκελετό της μεμβράνης μέσω των πρωτεϊνών 4-1R και p55. Ένα ποσοστό των ερυθροκυττάρων Gerbich-null είναι σφαιροκυτταρικά στο σχήμα (1). Η GPC είναι ένας υποδοχέας για το *P. Falciparum* ενώ τα Ge-αρνητικά ερυθροκύτταρα είναι ανθεκτικά στην εισβολή του *P. Falciparum*. Ο αρνητικός φαινότυπος είναι κοινός σε μέρη της Παπούα Νέας Γουινέας, όπου η ελονοσία του *P. Falciparum* είναι ενδημική. (56). Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία ότι η RhAG αλληλεπιδρά με την αγκυρίνη, τις πρωτεΐνες Lu και Xk με σπεκτρίνη και το CD44 με πρωτεΐνη 4,1R. Τα ερυθροκύτταρα που δεν έχουν RhAG ή Xk, ή έχουν μειωμένα επίπεδα γλυκοπρωτεϊνών Lu και CD44 [σε φαινότυπο In (Lu)] έχουν κάποιο βαθμό μη φυσιολογική μορφολογία. (23)

A.2 Σύστημα ABO

Το σύστημα ABO, αρχικά περιγράφηκε από τον Karl Landsteiner το 1900, παραμένει το πιο σημαντικό σύστημα αίματος στη μεταμοσχευτική ιατρική και στις μεταγγίσεις (57, 58). Στο αίμα, τα ABO αντιγόνα βρίσκονται στα ερυθροκύτταρα, στα αιμοπετάλια, καθώς και σε πολλές κυκλοφορούσες πρωτεΐνες. Επίσης παρουσιάζονται και σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του ενδοθηλίου, των νεφρών, της καρδιάς, του εντέρου, του παγκρέατος και του πνεύμονα. (59, 60)

Μετάγγιση, ασύμβατου κατά ABO αίματος, σχετίζεται με οξεία ενδοαγγειακή αιμόλυση, νεφρική ανεπάρκεια και θάνατο. Ομοίως και μεταμόσχευση ABO-μη συμβατών οργάνων σχετίζεται με οξεία χημική απόρριψη (58). Λόγο των σημαντικών κλινικών συνεπειών για την ζωή του ασθενή που προκαλούνται από ασυμβατότητας κατά ABO, οι δοκιμασίες συμβατότητας παραμένουν ο ακρογωνιαίος λίθος των δοκιμασιών πριν από μετάγγιση καθώς και ένα σημαντικό στοιχείο πριν από μεταμόσχευση. (59)

Το σύστημα ABO περιέχει τέσσερις μεγάλες ομάδες φαινοτύπων A, B, O και AB. Οι τέσσερις φαινότυποι καθορίζονται από την παρουσία ή την απουσία των δύο αντιγόνων (A και B) στα ερυθροκύτταρα. Η παρουσία ή η απουσία αυτών των αντιγόνων καθορίζει την ύπαρξη αντισωμάτων στο αίμα που ονομάζονται ισοαιμοσυγκολλητίνες. Για παράδειγμα, τα άτομα της ομάδας O, που παρουσιάζουν έλλειψη αντιγόνων A και B στα ερυθροκύτταρα, έχουν τόσο αντι-A όσο και αντι-B αντισώματα στον ορό τους. Τα αντισώματα στοχεύουν επίσης στα εντερικά και στα

περιβαλλοντικά βακτήρια, όπως τα Enterobacteriaceae, τα οποία έχουν δειχθεί ότι διαθέτουν δομές τύπου ABO στις επιφάνειες των λιποπολυσακχαριτών τους.(57)

A.2.1 Βιοχημεία

Τα αντιγόνα A και B ορίζονται από επιτόπους σε γλυκολιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες. Το αντιγόνο H είναι που χαρακτηρίζεται από τερματικό $\alpha 1 \rightarrow 2$ φουκτόζη που είναι ο άμεσος βιοσυνθετικός πρόδρομος και για τους δύο A και B ενώ απαιτείται για την έκφρασή τους.

Στα άτομα της ομάδας αίματος A, προστίθεται μια N-ακετυλογαλακτοζαμίνη, σε μία $\alpha 1 \rightarrow 3$ σύνδεση, ώστε να σχηματιστεί η υπο-τερματική γαλακτόζη του αντιγόνου H το αντιγόνο A. Στα άτομα της ομάδας αίματος B, σε ένα $\alpha 1 \rightarrow 3$ γαλακτόζη προστίθεται στην ίδια υπο-τερματική γαλακτόζη του αντιγόνου H το αντιγόνο B. Στα άτομα της ομάδας AB, συντίθενται αμφότερα οι δομές A και B.

Στην ομάδα O, ούτε A ούτε B αντιγόνα συντίθενται, ως αποτέλεσμα μετάλλαξης στο γονίδιο ABO (61). Κατά συνέπεια, τα άτομα της ομάδας O εκφράζουν μόνο το αντιγόνο H. Τα αντιγόνα A και B απουσιάζουν επίσης στον πολύ σπάνιο φαινότυπο της Βομβάης εξαιτίας της απουσίας του προδρόμου H-αντιγόνου.

Ως τερματικά μοτίβα, τα αντιγόνα A και B εμφανίζονται σε έναν αριθμό ολιγοσακχαριτών που διαφέρουν ως προς το μέγεθος, τη σύνθεση, τις συνδέσεις και την κατανομή στους ιστούς. Τα αντιγόνα ABO χαρακτηρίζονται από την ακολουθία υδατανθράκων αμέσως πριν από το ABO μοτίβο. Στα θηλαστικά, έξι διαφορετικοί πολυσακχαρικές αλυσίδες έχουν περιγραφεί (60). Στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα, η πλειονότητα των ενδογενών ABH αντιγόνων συντίθεται στις δομές της αλυσίδας τύπου 2. Η ικανότητα σύνθεσης και από διαφορετικές υδατανθρακικές αλυσίδες, μπορεί να συμβάλλει σε διαφορετικές υποομάδες των αντιγόνων ABO (62).

A.2.2 ABO στην ανάπτυξη και τη γήρανση

Τα αντιγόνα ABO μπορούν να ανιχνευθούν στα ερυθροκύτταρα των εμβρύων ήδη από την 5 έως την 6 εβδομάδα κύησης. Η ποσότητα των αντιγόνων ABO στα ερυθροκύτταρα των εμβρύων είναι μικρότερη από αυτή των ενηλίκων, εν μέρει ως

αποτέλεσμα της ανωριμότητας των πρόδρομων τύπου-2 αλυσίδας στα ερυθροκύτταρα του νωτιαίου μυελού. Καθώς αυξάνεται η ηλικία, οι πρόδρομες αλυσίδες γίνονται όλο και πιο διακλαδισμένες, εκφράζοντας έτσι περισσότερα αντιγόνα A και B. Τα επίπεδα έκφρασης των ενήλικων ABO αντιγόνων γενικά παρατηρούνται από ηλικία των 2 έως 4 ετών.(63)

Τα αντι-A και τα αντι-B αντισώματα δεν υπάρχουν κατά την γέννηση του νεογνού και εάν ανιχνεύονται είναι μητρικής προέλευσης. Ενδογενώς ανάπτυξη αντισωμάτων αντι-A και αντι-B στον ορό παρουσιάζεται από 3 έως 6 μηνών, σε όλα τα παιδιά εμφανίζονται οι κατάλληλες ισοαιμοσυγκολλητίνες, αντισώματα στον ορό σε ηλικία 1 έτους (63).

Οι τίτλοι των αντι-A και αντι-B αντισώματα συνεχίζουν να αυξάνονται κατά τη διάρκεια της πρώιμης παιδική ηλικίας μέχρι την ηλικία των 5 έως 10 ετών. Μεταξύ των υγιών ενηλίκων, οι τίτλοι ABO μπορούν φυσιολογικά να κυμαίνονται από 4 έως 2048. Υψηλού τίτλου αντισώματα ABO μπορεί να παρατηρηθούν σε γυναίκες ομάδας αίματος O με πολλές κυήσεις (63, 64).

A.2.3 Γενετική

Το γονίδιο ABO βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9q34. Είναι αρκετά μεγάλο, 18 kb αποτελούμενο από 7 εξόνια (61). Η ζώνη έκφρασης της πρωτεΐνης βρίσκεται κυρίως στα εξόνια 6 και 7. Μία μελέτη της περιοχής δείχνει ότι η γονιδιακή έκφραση ABO είναι μεταγραφικά ρυθμιζόμενη από διάφορους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της μεθυλίωσης, της μεταγραφής συγκεκριμένου ιστού πρωτεΐνης δέσμευσης, το αντιπληροφοριακό μόριο RNA, και ενδεχομένως μια ενισχυμένη περιοχή μινιδορυφόρων 4 kb ανοδικά της έκφρασης 1 (61, 65, 66). Τα αντιγόνα ABO ρυθμίζονται επίσης από το γονίδιο H, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του αντιγόνου H, τον πρόδρομο των αντιγόνων A και B. Το γονίδιο H ρυθμίζεται αυστηρά με ιστοειδικό τρόπο μέσω της ιστικής μεταγραφής παραγόντων.(67)

Σε έλλειψη H αντιγόνου, κανένα αντιγόνο A ή B δεν εκφράζεται ανεξάρτητα από τον γονότυπο ABO (φαινότυπος Bombay ή Oh). Μια σειρά από μελέτες στο παρελθόν έχουν προσδιορίσει τη μοριακή βάση για A, B, O, cis-AB και ασθενών υποομάδων ABO. (61)

Βασικά, υπάρχουν τρία κοινά αλληλόμορφα ABO, που είναι υπεύθυνα για τους φαινότυπους A, B και O. Τα αλληλόμορφα A και B είναι αυτοσωματικά και διαφέρουν μόνο σε επτά νουκλεοτίδια και τέσσερα αμινοξέα (61). Τρία αμινοξέα (A→B, Gly235Ser, Leu266Met και Gly268Ala) είναι καθοριστικής σημασίας για τον προσδιορισμό του εάν η γλυκοζυλοτρανσφεράση θα χρησιμοποιήσει σάκχαρα UDP-N-ακετυλο-O-γαλακτοζαμίνη ή δότη UDP-D-γαλακτόζη για τη σύνθεση αντιγόνων A ή B, αντιστοίχως.(61)

O σπάνιος φαινότυπος cis-AB είναι ένα χμαιρικό ένζυμο με ένα μείγμα A-ειδικών και B-ειδικών αμινοξέων σε αυτά ή σε άλλες θέσεις αμινοξέων. Ένας συνδυασμός μεταλλάξεων με ασθενείς υποομάδες A και B έχει περιγραφεί, με μερικές μεταλλάξεις να συνδέονται με περισσότερες από μία υποομάδες. Για παράδειγμα, η ομάδα A₂ (α αδύναμη υποομάδα) είναι συνήθως αποτέλεσμα διαγραφής νουκλεοτιδίων και μετατόπισης πλαισίου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ενζύμου με επιπλέον 21 αμινοξέα στο O-άκρο του μορίου.

Το αλληλόμορφο O είναι ένα γονίδιο άμορφο, που κωδικοποιεί ένα μη λειτουργικό ένζυμο. Ο φαινότυπος της ομάδας O, ως εκ τούτου, είναι ένα αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτηριστικό, που αντιπροσωπεύει την κληρονόμηση δύο μη λειτουργικών ABO γονιδίων. Συνολικά, περισσότερα από 30 αλληλόμορφα έχουν εντοπιστεί. Οι δύο πιο συνηθισμένοι O τύποι αλληλόμορφων (O01, O02) περιέχουν ένα νουκλεοτίδιο διαγραφής και μετατόπισης πλαισίου, οδηγώντας σε μια συγκόλληση 117-αμινοξέων. Ένα άλλο κοινό αλληλόμορφο είναι O03, μια ομάδα ανεξάρτητων O αλληλόμορφων που περιέχουν μια μετάλλαξη στο αμινοξύ 268 (Gly268Arg), το οποίο είναι κρίσιμο για τη δέσμευση δότη (UDP-γαλακτόζη ή UDP-N-ακετυλ-γαλακτοζαμίνη).(63)

A.2.4 Υποομάδες ABO

Οι υποομάδες ABO είναι φαινότυποι που διαφέρουν στην ποσότητα των αντιγόνων A και B στα ερυθροκύτταρα. Επίσης παρουσιάζονται και στις εκκρίσεις. Σε γενικές γραμμές, οι A υποομάδες είναι πιο κοινές από τις υποομάδες B. Κλινικά, οι δύο πιο συνηθισμένες υποομάδες που αναγνωρίζονται είναι οι A₁ και A₂. Το A₁ αντιπροσωπεύει την πλειοψηφία της ομάδας A (80%) και χαρακτηρίζεται από περίπου 1 εκατομμύριο επιτόπους αντιγόνου ανά ερυθρό κύτταρο.

Η A_2 είναι η δεύτερη συνηθέστερη υποομάδα (20%) και διαθέτει μόνο το ένα πέμπτο ($2,2 \times 10^5$) από τον αριθμό των θέσεων αντιγόνου A. Τόσο η A_1 όσο και η A_2 παρουσιάζουν ισχυρή συγκόλληση με το αντιδραστήριο αντι-A στις άμεσες δοκιμασίες ρουτίνας. Η A_1 μπορεί να διακριθεί από την A_2 με τη χρήση λεκτίνης, στην οποία θα συγκολληθούν τα ερυθροκύτταρα A_1 , αλλά όχι τα ερυθροκύτταρα A_2 .

Επιπλέον, το 1-8% των ατόμων A_2 και το 25% των ατόμων A_2B διαθέτουν ένα άλλο αντι- A_1 αντίσωμα στους ορούς τους. Επειδή ο φαινότυπος A_2 αντανάκλα την αναποτελεσματική μετατροπή του αντιγόνου $H \rightarrow A$, τα A_2 ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη αντιδραστικότητα με την αντι-H λεκτίνη. Μελέτες ενζύμων συγκρίνοντας τη δραστηριότητα της γλυκοσυλοτρανσφεράσης A_1 και A_2 παρουσιάζουν το ένζυμο A_1 να είναι 5 έως 10 φορές πιο ενεργό από το ένζυμο A_2 , με αποτέλεσμα τις ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές στην έκφραση του A αντιγόνου (1). Η τελευταία περιλαμβάνει τη σύνθεση μίας ασυνήθιστης αλυσίδας τύπου A και τύπου 4 αντιγόνων στα ερυθροκύτταρα A_1 , τα οποία δεν υπάρχουν στην A_2 και στις ασθενέστερες υποομάδες A. (68)

Εκτός από την A_2 , αρκετές ασθενέστερες υποομάδες A έχουν περιγραφεί (π.χ. A_3 , A_x , A_m , A_{ei}). Οι υποομάδες A (και B) είναι σπάνιες και συνήθως αναγνωρίζονται από τις εμφανείς αποκλίσεις μεταξύ των ερυθροκυττάρων (ευθεία) και του ορού (ανάστροφη). Οι αρχικές περιγραφές των σπάνιων υποομάδων A και B έγιναν πριν την εμφάνιση μονοκλωνικών αντιδραστηρίων τυποποίησης και βασίστηκαν στην αντιδραστικότητα με τον ανθρώπινο πολυκλωνικό ορό αντι-A, αντι-B και αντι-A, B αντιδραστηρίων. Οι υποομάδες συχνά δεν αντιδρούν με τον ανθρώπινο πολυκλωνικό αντι-A και μπορεί να παρουσιάσουν μεταβλητή αντιδραστικότητα με τον ανθρώπινο πολυκλωνικό αντι- A_1 και αντι-A, B. (1, 69)

Η μοριακή εξέταση έδειξε αρκετές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τις υποομάδες ABO. Στην κλινική πρακτική, σπανίως είναι απαραίτητο να εντοπιστεί η συγκεκριμένη υποομάδα A ή B όταν εκτελείται η ταξινόμηση των ασθενών.

Μια υποομάδα βασίζεται συνήθως στα εξής:

1. Βαθμό συσσωμάτωσης των ερυθροκυττάρων από αντι-A και αντι- A_1 .
2. Βαθμό συσσωμάτωσης των ερυθροκυττάρων από τον άνθρωπο και μερικά μονοκλωνικά αντι-A, αντι-B.

3. Βαθμό έκφρασης αντιγόνου H (αντι-H λεκτίνη).
4. Παρουσία ή απουσία αντι-A1.
5. Παρουσία των A και H στο σάλιο.
6. Μελέτες προσρόφησης και έκλουσης.
7. Οικογενειακές (γενεαλογικές) μελέτες

A.2.5 B και A Φαινότυπος

Ο φαινότυπος B είναι ο κυρίαρχος αυτοσωμικός φαινότυπος που χαρακτηρίζεται από ασθενή έκφραση A αντιγόνων, στα ερυθροκύτταρα της ομάδας B. Ορολογικά, τα ερυθροκύτταρα των ατόμων B - φαινότυπου αντιδρούν έντονα με μονοκλωνικά αντιδραστήρια αντι-B και ασθενώς με μονοκλωνικό αντι-A (<2+). Τα B ερυθροκύτταρα μπορούν να παρουσιάζουν ποικίλλη αντιδραστικότητα με μονοκλωνικά αντι-A αντιδραστήρια. Ωστόσο, οι περισσότερες περιπτώσεις είναι ανιχνεύσιμες με μονοκλωνικά αντιδραστήρια τυποποίησης που περιέχουν τον κλώνο MHO4. Γενικά, η συγκόλληση είναι ασθενής και εύθραυστη. Η δοκιμασία του δείγματος με πολυκλωνικό ορό αντι-A ή διαφορετικό το μονοκλωνικό αντι-A πρέπει να επιλύσει την απόκλιση.

Έχουν υπάρξει πολυμορφισμοί αμινοξέων που έχουν εντοπιστεί σε ορισμένα άτομα της ομάδας B κοντά στο (Pro234Ala) ή στα κρίσιμα αμινοξέα (Ser235Gly) (1, 61). Η γλυκοσυλοτρανφεράση B στα άτομα αυτά, παρουσιάζει αυξημένη ικανότητα, χρησιμοποιώντας UDP-N-ακετυλογαλακτοζαμίνη, επιπλέον σε UDP-γαλακτόζη, για την σύνθεση του αντιγόνου A. Έχει επίσης περιγραφεί ένας φαινότυπος A με μονοκλωνικό ορό αντι-B. Ο φαινότυπος A συσχετίστηκε με την παρουσία αυξημένου αντιγόνου H και την δραστηριότητα της H-τρανφεράσης στο πλάσμα. Υποτίθεται ότι η αυξημένη παρουσία του πρόδρομου H σε αυτά τα ερυθροκύτταρα, μπορούν να επιτρέψει τη σύνθεση ενός B αντιγόνου, από την γλυκοζυλοτρανφεράση A. (63)

A.2.6 ABO Αντισώματα Anti-A και Anti-B

Το αντίσωμα IgM είναι το κυρίαρχο αντίσωμα που βρέθηκε στα άτομα της ομάδας A και της ομάδας B, αν και μπορούν να ανιχνευθούν μικρές ποσότητες αντισώματος IgG. Στον ορό της Ομάδας O, το IgG είναι το κύριο αντίσωμα για τα αντι-A και αντι-B αντισώματα. Ως συνέπεια, η αιμολυτική ασθένεια του εμβρύου και του νεογέννητου (HDFN) είναι πιο συχνή μεταξύ των μητέρων της ομάδας O επειδή το IgG αντίσωμα μπορεί να διασχίσει τον πλακούντα, ενώ το IgM δεν μπορεί.

Τόσο τα IgM όσο και τα IgG αντι-A και αντι-B αντισώματα συγκολλούν τα ερυθροκύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 24 C) ή σε λίγο πιο χαμηλές θερμοκρασίες. Και τα δύο μπορούν να ενεργοποιήσουν αποτελεσματικά το συμπλήρωμα στους 37°C καθώς αυτά τα αντισώματα γίνονται ενεργά εάν ο ορός της δοκιμής περιλαμβάνει μια φάση επώασης στους 37°C.

Υπάρχει υποψία αιμόλυσης που προκαλείται από τα αντισώματα ABO σε περίπτωση που ο υπερκείμενος φυγοκεντρίμενο ορός είναι χρώματος ροζ έως κόκκινο. Για να ερμηνευθεί ως θετικό το αποτέλεσμα της αιμόλυσης, το πλάσμα προς έλεγχο θα πρέπει να απομονώνεται από αίμα που βρίσκεται σε διάλυμα με αντιπηκτικό EDTA, γιατί αποτρέπει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την αιμόλυση των κυττάρων.(69)

A.2.6.1 Αντι-A και αντι- B

Οι οροί από τα άτομα της ομάδας O περιέχουν αντισώματα που χαρακτηρίζονται ως αντι-A και αντι-B επειδή αντιδρούν με τα ερυθροκύτταρα A και B. Η αντι-A και η αντι-B αντιδραστικότητα δεν μπορεί να διαχωριστεί με διαφορετική προσρόφηση, υποδηλώνοντας ότι το αντίσωμα αναγνωρίζει ένα κοινό επίτοπο που μοιράζονται τα αντιγόνα A και B.

A.2.6.2 Anti-A₁

Το αντι-A₁ εμφανίζεται ως αλλοαντίσωμα στον ορό στο 1% έως 8% των ατόμων A₂ και στο 22% έως 35% των ατόμων A₂B. Μερικές φορές τα αντι-A₁, υπάρχει περίπτωση να βρεθούν στους ορούς και άλλων ασθενών, με υποομάδες A.

Ο ορός της Ομάδας O, περιέχει ένα μείγμα αντι-A και αντι-A₁ αντισωμάτων. Το Anti-A₁ μπορεί να προκαλέσει αποκλίσεις από το ABO κατά τη διάρκεια της συνήθους δοκιμασίας και μπορεί να οδηγήσει σε ασύμβατες διασταυρώσεις με A₁ και A₁B ερυθροκύτταρα. Το αντι-A₁ είναι συνήθως ισότυπο IgM, αντιδρώντας καλύτερα σε θερμοκρασία δωματίου και θεωρείται συνήθως κλινικά ασήμαντο. Το αντι-A₁ θεωρείται κλινικά σημαντικό αν παρατηρηθεί αντιδραστικότητα στους 37°C. Ασθενείς με ένα αντι-A₁ αντίσωμα σε δοκιμασίες στους 37°C θα πρέπει να μεταγγίζονται με ερυθρά O ή A₂. Οι ασθενείς της ομάδας A₂B θα πρέπει να λαμβάνουν ομάδα αίματος O, A₂, A₂B ή B ερυθροκυττάρων. (63)

A.2.7 Δοκιμασία ρουτίνας για το ABO

Τα δείγματα αίματος των δοτών, ελέγχονται για την ομάδα αίματος κατά του συστήματος ABO τη στιγμή της δωρεάς, επιπλέον γίνεται έλεγχος και κατά την παραλαβή των μονάδων ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) από την αρμόδια αιμοδοσία του νοσοκομείου όπου θα πραγματοποιηθεί η μετάγγιση (επιβεβαιωτικός έλεγχος).

Τα δείγματα των ασθενών- δεκτών εξετάζονται πριν από τη μετάγγιση. Η τυποποίηση κατά ABO απαιτεί και την εξέταση αντίχενωσης αντιγόνου των ερυθροκυττάρων για τα αντιγόνα A και B αλλά και διαλογή ορού ή πλάσματος για την παρουσία αντι-A και αντι-B αντισώματα. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ισοσυγκολλητίνες δεν υπάρχουν κατά τη γέννηση, αλλά αναπτύσσονται μόνο μετά το διάστημα των 3 έως 6 μηνών.

Τα εμπορικά διαθέσιμα αντι-A και αντι-B αντισώματα για την τυποποίηση των ερυθροκυττάρων είναι εξαιρετικά ισχυρά, και συγκολλούν τα περισσότερα θετικά αντιγόνα στα ερυθροκύτταρα, ακόμη και χωρίς φυγοκέντρηση. Πλέον, τα

μονοκλωνικά αντιδραστήρια τυποποίησης έχουν διαμορφωθεί για την ανίχνευση πολλών ασθενών υποομάδων ABO.

Πρόσθετα αντιδραστήρια (αντι-A₁ και αντι-A, B) και ειδικές τεχνικές ανίχνευσης για τις αδύναμες υποομάδες ABO δεν είναι απαραίτητες στις δοκιμασίες ρουτίνας, αλλά είναι χρήσιμες για την επίλυση διαφορών κατά την τυποποίηση του συστήματος ABO.

Σε αντίθεση με τα εμπορικά αντιδραστήρια του συστήματος ABO, το ανθρώπινο αντι-A και αντι-B αντισώματα στους ορούς ασθενών και δοτών μπορεί να είναι σχετικά αδύναμο, απαιτώντας επώαση και φυγοκέντρηση. Οι δοκιμασίες για την τυποποίηση του ορού, επομένως, πρέπει να γίνονται με μεθόδους που ανιχνεύουν επαρκώς το ανθρώπινο αντι-A και αντι-B αντίσωμα. Αρκετές μέθοδοι είναι διαθέσιμες για τον προσδιορισμό της ομάδας ABO, συμπεριλαμβανομένων των διαφανειών, του σωλήνα, της μικροπλάκας και της στήλης με τεχνικές συγκόλλησης.

(60)

A.3 Σύστημα Rh

Το σύστημα Rh είναι το πιο σημαντικό σύστημα του αίματος μετά το ABO στην μετάγγιση. Το σύστημα Rh είναι εξαιρετικά ανοσογόνο και πολύπλοκο, με πολυάριθμους πολυμορφισμούς και κλινικά σημαντικά αλληλόμορφα. Η ιστορία του συστήματος Rh άρχισε με την ανακάλυψή του ως αιτία σοβαρού ίκτερου και εμβρυϊκού θανάτου, που αναφερόταν ως «εμβρυϊκή ερυθροβλάστωση». Το σύνδρομο παρατηρήθηκε σε πολύπλοκες εγκυμοσύνες για πολλές δεκαετίες, με τις πρώτες καταγραφικές περιγραφές να χρονολογούνται τη δεκαετία του 1600 από μια Γαλλίδα Μαία η οποία παρακολούθησε τις γεννήσεις ενός συνόλου δίδυμων. Το ένα από αυτά παρουσίασε υδροκεφαλία ενώ το δεύτερο είχε πεθάνει στην μήτρα.

Το ευρύ φάσμα των εμβρυϊκών συμπτωμάτων - που κυμαίνονται από τον ήπιο ίκτερο, τον πυρετό και την αναιμία έως τα σοβαρά και θανατηφόρα- δεν αποδίδονται εύκολα σε έναν μόνο παράγοντα. Όταν διαπιστώθηκε ότι μια ανοσολογική διαδικασία μπορεί να είναι υπεύθυνη, το αντιγόνο-στόχος αρχικά προτάθηκε να είναι η αιμοσφαιρίνη εμβρύου. Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν στη διαπίστωση ότι μια

ανοσολογική αντίδραση σε ένα πατρικό αντιγόνο ήταν υπεύθυνη για το σύνδρομο, που τώρα αναφέρεται ως αιμολυτική νόσου του εμβρύου και του νεογνού (HDFN).

Η ονομασία του συστήματος "Rh" για τον Rhesus ήταν το αποτέλεσμα σύγχυσης με το αντιγόνο LW, που ονομάστηκε από τους Landsteiner και Wiener, οι οποίοι μελετούσαν έναν αντι-ορό που παράγεται από την έγχυση ορού ινδικών χοιριδίων και κουνελιών σε ερυθροκύτταρα του μακάκου Rhesus. Όταν ο αντιορός αραιώθηκε (για να εξαιρεθεί η αντιδραστικότητα των ειδών), συγκολλήθηκε περίπου το 85% των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων που ελέγχθηκαν. Η αντιδραστικότητα αυτού του «αντι-Ρέζους» φάνηκε να σχετίζεται με την αντιδραστικότητα των ορών από γυναίκες που γέννησαν ένα μωρό που πάσχει από αιμολυτική νόσο. Έτσι, η ομάδα αίματος συσχετίστηκε με αντι-Ρέζους, δηλαδή το Rh. Η σύγχυση οφείλεται στο γεγονός ότι το αντιγόνο LW υπάρχει στα Rh θετικά ερυθροκύτταρα σε μεγαλύτερες ποσότητες απ'ότι στα ερυθρά Rh αρνητικά αιμοσφαίρια, εξηγώντας έτσι το πρότυπο αντιδραστικότητας που παρατηρήθηκε με τον αραιωμένο αντιορό.

Για πολλά χρόνια υπήρξε διαμάχη για το ποιος ανακάλυψε στην πραγματικότητα την ομάδα αίματος που είναι υπεύθυνη για την HDFN (70). Αναδρομικά, η ανάθεση για την ανακάλυψη του συστήματος Rh ανατέθηκε σε πολλές διαφορετικές ομάδες των οποίων οι συλλογικές παρατηρήσεις ξεκλείδωσαν το μυστήριο της παθογένεσης της νόσου.

Τα "Rh θετικά" και "Rh αρνητικά" ερυθροκύτταρα αναφέρονται στην παρουσία ή στην απουσία του αντιγόνου D. Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1940 αναγνωρίστηκαν τέσσερα επιπλέον αντιγόνα Rh, το αντιθετικό C και c και τα E και e. Ονομάστηκαν από τον Fisher με τα επόμενα γράμματα της αλφαβήτου, σύμφωνα με τα προηγούμενα που ορίστηκαν με την ονομασία των ομάδων αίματος A και B. Τα πέντε βασικά αντιγόνα Rh - D, C, c, E και e είναι υπεύθυνα για την πλειονότητα των κλινικά σημαντικών αντισωμάτων. Έχουν χαρακτηριστεί όμως περισσότερα από 50 Rh αντιγόνα.(71)

Η παρατήρηση ότι η ασυμβατότητα ABO μεταξύ μιας μητέρας και του εμβρύου είχε μερική προστατευτική επίδραση έναντι της ανοσοποίησης στο Rh, και οδήγησε στο σκεπτικό για την ανάπτυξη της Rh Immune Globulin (RhIG) (72). Αν και η υπόθεση ότι τα μητρικά αντισώματα IgM ήταν υπεύθυνα για την προστασία ήταν τελικά εσφαλμένη (η χρήση των IgM αντι-D δεν ήταν επιτυχής), η IgG αντι-D

βρέθηκε να είναι πολύ αποτελεσματική. Από τη δεκαετία του 1960, μόνο 20 χρόνια μετά την ανακάλυψη της ασυμβατότητας Rh, η HDFN που προκλήθηκε από το αντι-D θα μπορούσε να είχε αποφευχθεί.

Η εξαιρετικά υδρόφοβη φύση των πρωτεϊνών Rh κατέστησε δύσκολες τις βιοχημικές μελέτες, όπως φαίνεται σε αναφορές από τη δεκαετία του 1970. Το μοριακό βάρος των Rh πρωτεϊνών κυμαίνεται από 7000 kDa έως 120.000 kDa. Σε μελέτη του Green υπήρξαν ευρήματα (73), που έδειξαν ότι η δραστηριότητα αντιγόνου Rh εξαρτάται από την παρουσία φωσφολιπιδίου και στις μελέτες του Gahmberg (74) αποδείχθηκε ότι οι πρωτεΐνες Rh, αντίθετα από τις περισσότερες μεμβρανικές πρωτεΐνες, δεν γλυκοζυλιώνονται και δεν φωσφορυλιώνονται. Η ανακάλυψη ότι τα ανοσοσυμπλέγματα του D με αντι-D αντισώματα παρέμειναν ανέπαφα, η παρουσία καθαριστικών αντιδραστηρίων οδήγησε στην επιτυχή ανοσοποίηση της πρωτεΐνης 30.000 έως 32.000 kDa, με αρκετές ομάδες που χρησιμοποιούν αντι-D, -c ή -E αντισωμάτων (75-77). Η απομόνωση των Rh πρωτεϊνών με χρωματογραφία, ακολουθούμενη από την αλληλουχία του N-τερματικού, ολοκληρώθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1980 (78). Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν στην κλωνοποίηση του γονιδίου *RHCE* από τον Cartron και τους συνεργάτες του το 1990 (71), και η κλωνοποίηση του *RHD* ήταν επιτυχής το 1992 (79, 80). Οι διάφορες των *RHCE* αλληλουχιών υπεύθυνες για τους φαινότυπους των αντιγόνων C ή c, και E ή e, διευκρινίστηκαν το 1994 (81).

Την τελευταία δεκαετία, υπήρξε αφθονία πληροφοριών που περιγράφουν λεπτομερώς τη γενετική ποικιλομορφία της θέσης *RH*, η οποία έχει ξεπεράσει όλες τις εκτιμήσεις που προβλέπονται από την ορολογία. Έχουν τεκμηριωθεί καλά πάνω από 100 *RHD* αλληλόμορφα και πάνω από 50 διαφορετικά αλληλόμορφα *RHCE* καθώς και εξακολουθούν να ανακαλύπτονται ακόμα νέα αλληλόμορφα. Οι μελέτες πληθυσμού επιδεικνύουν περαιτέρω τις εθνοτικές και γεωγραφικές μεταβολές στα αλληλόμορφα *RH*, οι οποίες έχουν επιπτώσεις στις μεταγίσεις και στις μαιευτικές πρακτικές. Παρουσιάζεται ένας κατάλογος αλληλόμορφων *RHD* στον ιστότοπο Rhesus-Base, ενώ τα αλληλόμορφα *RHCE* βρίσκονται στο Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικής Πληροφορίας του ισότοπου μετάλλαξης ανθρώπινων ομάδων αίματος (82). Η ομάδα εργασίας της Διεθνούς Εταιρείας για τη μετάγγιση αίματος (ISBT) σχετικά με την ανοσογενετική των ερυθροκυττάρων και την ορολογία της ομάδας αίματος διατηρεί και καταγράφει συνεχώς νέα αλληλόμορφα (79)

A.3.1 Ορολογία

Η ονοματολογία Rh αντικατοπτρίζει τις διαφορές των απόψεων, σχετικά με τον αριθμό των γονιδίων που κωδικοποιούν τα αντιγόνα DCE. Η ορολογία που θέσπισε ο Fisher-Race στην Αγγλία, βασίστηκε στην υπόθεση ότι ήταν υπεύθυνα τρία στενά συνδεδεμένα γονίδια, C/c, E/e, και D, ενώ η ονοματολογία Wiener (Rh-Hr) βασίστηκε στην πεποίθηση ότι ένα μεμονωμένο γονίδιο κωδικοποιεί αρκετούς παράγοντες ομάδας αίματος. Ούτε η θεωρία αυτή ήταν σωστή όμως. Στην πραγματικότητα υπάρχουν δύο γονίδια, *RHD* και *RHCE*, όπως σωστά πρότεινε η Tippett (83). Η ονοματολογία του Fisher-Race CDE προτιμάται συχνά στη γραπτή επικοινωνία. Ένα κεφαλαίο γράμμα "R" χρησιμοποιείται για να υποδείξει ότι το D είναι παρόν. Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται για να αντιπροσωπεύουν τα αντιγόνα το C/c και αντιγόνα που βρέθηκαν με D E/e: 1 για Ce (R₁), 2 για τη σήμανση cE (R₂), 0 για ce (R₀), και το «Z» για τη σήμανση CE (R_Z). Ένα μικρό γράμμα "r" ("μικρό r") υποδηλώνει την απουσία του D και ο τόνος χρησιμοποιείται για να δηλώσει, όπως και πρίν τα αντιγόνα C/c και E/e : τόνος για Ce (r'), διπλός τόνος για το cE (r'') και για το CE (r^Y).

Μια αριθμητική ονοματολογία που εισήχθη το 1962 από τον Rosenfeld έδωσε σε κάθε Rh αντιγόνο έναν αριθμό που βασίζεται στη χρονολογική σειρά από την ανακάλυψή του ή την εκχώρηση του στο σύστημα Rh. Παρόλο που δεν χρησιμοποιείται ευρέως, εκτός από την ιστορική συμβολή της, εφαρμόζεται συχνά όταν γίνεται αναφορά σε αντιγόνα υψηλού επιπολασμού στο σύστημα Rh (π.χ. Rh17, Rh29, Rh32 κ.λπ.).

Με στόχο τη δημιουργία μίας ομοιόμορφης ονοματολογίας, η ομάδα εργασίας για την ορολογία του ISBT δημιούργησε έναν εξαψήφιο αριθμό για κάθε αντιγόνο ερυθροκυττάρων. Οι τρεις πρώτοι αριθμοί αντιπροσωπεύουν το σύστημα και τα υπόλοιπα τρία ψηφία αναφέρονται στην ειδικότητα του αντιγόνου. Το σύστημα Rh έλαβε τον αριθμό 004. Το 2008, η ομάδα ISBT δημιούργησε τη σχετιζόμενη με την Rh γλυκοπρωτεΐνη (RHAG) ως ένα νέο σύστημα με αριθμός 30 (84).

Η σύγχρονη ορολογία Rh διακρίνεται μεταξύ των αντιγόνων, των γονιδίων και των πρωτεϊνών. Τα αντιγόνα αναφέρονται με τους χαρακτήρες D, C, c, E και e. Τα

γονίδια *RH* υποδεικνύονται με κεφαλαία γράμματα, με ή χωρίς πλάγιους χαρακτήρες, και περιλαμβάνουν τα *RHD* και *RHCE*. Τα αλληλόμορφα της *RHCE* ορίζονται ως *RHCE**, *RHCE*Ce*, *RHCE*cE* και *RHCE*CE*, σύμφωνα με τα αντιγόνα που κωδικοποιούν και τις παραλλαγές ή μερικά *RHD* αλληλόμορφα τα οποία χαρακτηρίζονται ως *RHD*DVI*, *RHD*DFR* κλπ. και υποδεικνύονται ως RhD ή Rhce, RhCe, RhcE και RhCE, σύμφωνα με τα ειδικά αντιγόνα που φέρουν.(85)

A.3.2 Rh Γονίδια και Rh Πρωτεΐνες

Δύο γονίδια (*RHD* και *RHCE*) τα οποία βρίσκονται σε κοντινή απόσταση από το χρωμόσωμα 1 κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Rh, 416 αμινοξέων, όπου το ένα γονίδιο κωδικοποιεί το αντιγόνο D και το άλλο κωδικοποιεί τα αντιγόνα CE σε διάφορους συνδυασμούς (ce, cE, Ce ή CE). Τα γονίδια έχουν έκαστος δέκα εξόνια, είναι 97% ταυτόσημα και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που διαφέρουν από 32 έως 35 αμινοξέα. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα περισσότερα αντιγόνα της ομάδας αίματος που κωδικοποιούνται από μεμονωμένα γονίδια με αλληλόμορφα που διαφέρουν μόνο σε ένα ή μερικά αμινοξέα.

Οι περισσότεροι D-αρνητικοί (Rh-αρνητικοί) φαινότυποι είναι το αποτέλεσμα πλήρους διαγραφής του γονιδίου *RHD*. Η έκθεση σε RhD ενός ατόμου με αρνητικό D οδηγεί συχνά στην παραγωγή αντι-D αντισώματα. Η ανοσογονικότητα μιας πρωτεΐνης συσχετίζεται από το βαθμό διαφοροποίησης της ως προς τον ξενιστή και ο μεγάλος αριθμός διάφορων αμινοξέων εξηγεί γιατί η έκθεση σε RhD μπορεί να οδηγήσει σε ισχυρή ανοσολογική αντίδραση.

Το *RHCE* (που βρίσκεται σε όλα τα σπάνια άτομα D, όπου οι παύλες αντιπροσωπεύουν τα ελλειπόντα αντιγόνα αυτών) κωδικοποιεί τόσο τα αντιγόνα C/c όσο και τα E/e σε μία μόνο πρωτεΐνη. Τα αντιγόνα C και c διαφέρουν κατά τέσσερα αμινοξέα, αλλά μόνο η αλλαγή των αμινοξέων Ser103Pro είναι εξωκυτταρική. Τα αντιγόνα E και e διαφέρουν κατά ένα αμινοξύ, Pro226Ala, το οποίο βρίσκεται στον τέταρτο εξωκυτταρικό βρόγχο της πρωτεΐνης. Τα γονίδια και οι πρωτεΐνες *RH* είναι τυπικά για την πλειονότητα των ατόμων και υπάρχουν εμπορικά αντιδραστήρια αντισωμάτων για την ανίχνευση της έκφρασης των κύριων Rh αντιγόνων-D, C, c, E και e.

Τα πέντε κύρια αντιγόνα είναι υπεύθυνα για την πλειοψηφία της Rh ασυμβατότητας, παρόλο που το σύστημα είναι πιο περίπλοκο και έχουν ανατεθεί

αριθμοί αντιγόνων έως Rh58. Νέα αντιγόνα μπορεί να προκύψουν από σημειακές μεταλλάξεις και αναδιάταξη γονιδίων. Για παράδειγμα, οι πολυάριθμες γενετικές μεταβολές μεταξύ *RHD* και *RHCE* έχουν δημιουργήσει υβριδικές πρωτεΐνες που έχουν RhD με ένα μέρος του RhCE ή αντίστροφα. Οι αναδιατάξεις διευκολύνονται από τον ανεστραμμένο προσανατολισμό των γονιδίων *RH* όπου τα 3' άκρα των γονιδίων είναι γειτονικά. Αυτή η δομή προωθεί τον σχηματισμό βρόγχου φουρκέτας και την επακόλουθη γενετική ανταλλαγή μέσω μετατροπής γονιδίων. Ένα μέλος ενεργεί ως ένα πρότυπο κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής, αλλά παραμένει αμετάβλητο στη διαδικασία. Η περιοχή μπορεί να εκτείνεται σε αρκετά ζεύγη βάσεων, σε μονά εξόνια ή και σε πολλαπλά εξόνια. Αυτές οι υβριδικές πρωτεΐνες εκφράζουν μοναδικούς επίτοπους. (85)

A.3.3 Αντιγόνα Rh

Το D είναι το πιο ανοσογόνο Rh αντιγόνο, ακολουθούμενο από το c και το E. Δοκιμασίες ρουτίνας δότη και προσδιορισμού τύπου του ασθενούς μόνο για το D, δοκιμασίες για άλλα κοινά Rh αντιγόνα εκτελούνται κυρίως για την επίλυση ή την επιβεβαίωση της ταυτοποίησης αντισωμάτων, με την εξαίρεση ότι ορισμένα προγράμματα μετάγγισης δρεπανοκυτταρικών ασθενών πραγματοποιούν την τυποποίηση Rh πριν από τη μετάγγιση για να ταιριάζουν ασθενείς και δότες για D, C και E (επιπλέον του K) και να μειωθεί η περίπτωση ανάπτυξης αντισωμάτων. (85)

A.3.3.1 Rh Φαινότυποι

Μερικοί γονότυποι είναι πιο συνηθισμένοι σε μια συγκεκριμένη εθνοτική ομάδα. Για παράδειγμα, ένα άτομο ευρωπαϊκής προέλευσης με φαινότυπο D, C, c, e θα μπορούσε να είναι D Ce/ce (δηλαδή, R₁r). Ένα πρόσωπο αφρικανικής καταγωγής με αυτόν τον φαινότυπο θα ήταν πιθανώς DCe/Dce (δηλαδή, R₁R₀). Πρόβλεψη του γονότυπου RH σε άτομα μικτή εθνικότητα είναι λιγότερο βέβαιη. Ο ορολογικός έλεγχος δεν μπορεί να προσδιορίσει εάν τα ερυθροκύτταρα προέρχονται από ομόζυγο (D/D) ή ετερόζυγο (D/-), καθώς το αντι-D σπάνια εμφανίζει οποιαδήποτε διαφορά στην αντιδραστικότητα μεταξύ ερυθροκυττάρων με μονή ή διπλή δόση του αντιγόνου D. Η γνώση του παθολογικού ζυγωτού *RHD* είναι σημαντική στην προγεννητική πρακτική για την πρόβλεψη της κατάστασης του αντιγόνου του εμβρύου, για την εκτίμηση του κινδύνου HDFN όταν η μητέρα έχει αντι-D.

Ο απλότυπος Rh επηρεάζει το επίπεδο έκφρασης του αντιγόνου D. Λιγότερο D εκφράζεται με την παρουσία των C, και ως εκ τούτου τα ερυθροκύτταρα ενός ατόμου με φαινότυπο DcE/DcE (R2R2) μεταφέρουν περισσότερους χώρους D αντιγόνου και παρουσιάζουν υψηλότερους βαθμούς τιτλοδότησης των αντι-D από ένα αντίστοιχο άτομο με φαινότυπο DCe/DCe (R1R1). Όπως μετράται με ροή προτίμησης θέσης, η αντοχή D του αντιγόνου μειώνεται με την ακόλουθη σειρά: DcE/DcE (R2R2)> DCe/ DcE (R1R2)> DCe/ DCe (R1R1)> DcE/ ce (R2r)> DCe/ ce (R1r). (86)

A.3.3.2 Rh D αντιγόνο

Το αντιγόνο D αποτελείται από πολυάριθμους επιτόπους (epD) οι οποίοι αρχικά ορίστηκαν από αντισώματα θετικών D ανθρώπων που είχαν αντι-D αντισώματα στο ορό τους. Μεταγενέστερες μελέτες με μονοκλωνικά αντισώματα που ορίζονται με 30 ή περισσότερους επιτόπους, προσδιορίστηκαν ως epD1 σε epD9 με περαιτέρω υποδιαίρεσεις (π.χ., epD6.1, κ.λπ.). Πολλοί επίτοποι εμπλέκουν αρκετούς από τους εξωκυτταρικούς βρόγχους της πρωτεΐνης ενώ μεταβολές των αμινοξέων στις ενδοκυτταρικές περιοχές της πρωτεΐνης μπορούν επίσης να μεταβάλλουν τους D επιτόπους. Η διαθεσιμότητα της κρυσταλλικής δομής του ομόλογου της Rh πρωτεΐνης AmtB από *Escherichia coli* (87), και η πρόσφατη ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του ανθρώπινης RhCG πρωτεΐνη επιτρέπουν, την τριών διαστάσεων μοντελοποίηση της πρωτεΐνης, η οποία παρέχει σημαντική κατανόηση της δομής των πρωτεϊνών της ομάδας αίματος Rh.

A.3.3.2.1 D θετικό (Rh θετικό)

Οι περισσότεροι φαινοτύποι των ερυθροκυττάρων που είναι θετικοί στο αντιγόνο D, φέρουν τη συμβατική πρωτεΐνη RhD. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί περισσότερα από 100 διαφορετικά αλληλόμορφα RHD που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με αλλαγές αμινοξέων. Αυτά μπορεί να προκαλέσουν πολυάριθμες παραλλαγές στην έκφραση του D και να περιλαμβάνουν αδύναμους φαινοτύπους D, μερικής D και Del. Τα ερυθροκύτταρα με κάποια μορφή αλλοιωμένης έκφρασης D, απαντώνται σπάνια στην πρακτική της μετάγγισης κατά τον έλεγχο ρουτίνας. Υπολογίζεται ότι στο 1% έως 2% των ατόμων με ευρωπαϊκή εθνικότητα, φέρουν αλληλόμορφα RHD που κωδικοποιούν ασθενή D weak αντιγόνα ή μερικά αντιγόνα D partial ενώ η συχνότητα εμφάνισης στα άτομα αφρικανικής εθνικότητας είναι υψηλότερη. (86)

A.3.3.2.2 WEAK D (ΠΡΩΗΝ Du)

Τα D weak (αδύναμα) ερυθροκύτταρα έχουν ιστορικά οριστεί ως έχοντα μειωμένη ποσότητα αντιγόνου D, απαιτώντας ένα ανιχνεύσιμο αντίσωμα αντισφαιρίνης (IAT) για την ανίχνευση του. Ο αριθμός των δειγμάτων που ταξινομούνται ως ασθενή D, ωστόσο, εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των αντιδραστηρίων τυποποίησης, τα οποία έχουν αλλάξει με την πάροδο των ετών. Η ασθενής έκφραση του αντιγόνου D προκύπτει κυρίως από μεμονωμένες νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *RHD* που κωδικοποιούν αλλαγές των αμινοξέων, τα οποία προβλέπεται να τοποθετηθούν ενδοκυτταρικά ή στις διαμεμβρανικές περιοχές του RhD και όχι στην εξωτερική επιφάνεια του ερυθροκυττάρου (88). Οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την εισαγωγή της πρωτεΐνης στη μεμβράνη, που αντανακλάται στον μειωμένο αριθμό των θέσεων του αντιγόνου D στα ερυθροκύτταρα. Πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις προκαλούν αδύναμη έκφραση D και χαρακτηρίζονται ως Τύπος 1 έως Τύπος 73 (85). Η πιο συνηθισμένη είναι ο Τύπος 1, ο οποίος περιέχει τη μετάλλαξη των αμινοξέων Val270Gly και ο οποίος μαζί με τους Τύπους 2 και 3 αντιπροσωπεύει περίπου το 90% των αδύναμων D που βρέθηκαν σε άτομα της ευρωπαϊκής εθνότητας (88).

A.3.3.2.3 D_{eI}

Τα D_{eI} ερυθροκύτταρα εκφράζουν εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα του αντιγόνου D τα οποία δεν μπορούν να ανιχνευθούν από τις καθιερωμένες ορολογικές μεθόδους. Εντούτοις, αυτά τα ερυθροκύτταρα μπορούν να προσροφηθούν και στη συνέχεια να εκλούσουν. Τα αντι-D αντισώματα των κυττάρων D_{eI} βρίσκονται στο 10% έως 30% στους Ασιάτες με D-αρνητικό φαινότυπο και προκύπτουν από πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *RHD* που μειώνουν σημαντικά την έκφραση του RhD αντιγόνου στη μεμβράνη. Τα ερυθροκύτταρα D_{eI} είναι πολύ λιγότερο κοινά στα άτομα της Ευρωπαϊκής Ένωσης (0,027%) και φέρουν διαφορετική μετάλλαξη (88, 89).

A.3.3.2.4 D Partial (Μερικό D)

Τα ερυθροκύτταρα με μερικό D αντιγόνο (D partial) έχουν ιστορικά ταξινομηθεί τοιούτοτρόπως με βάση το γεγονός ότι οι τύποι των ερυθροκυττάρων D

είναι θετικοί, αλλά τα άτομα αυτά παράγουν αντι-D αντισώματα όταν εκτίθενται σε συμβατικό αντιγόνο D. Αυτά τα ερυθροκύτταρα είχαν χαρακτηρησθεί με τμήματα του D που λείπουν, και πράγματι η πλειονότητα των μερικών D φαινοτύπων οφείλεται σε υβριδικά γονίδια στα οποία τμήματα του γονιδίου *RHD* αντικαθίστανται από τα αντίστοιχα τμήματα του γονιδίου *RHCE*. Οι νέες αλληλουχίες της υβριδικής αυτής πρωτεΐνης προκύπτουν από περιοχές RhD ενωμένες με RhCE που δεν μπορούν να οδηγήσουν στην απώλεια των D επιτόπων αλλά επίσης ούτε να δημιουργήσουν νέα αντιγόνα. Για παράδειγμα, τα ερυθροκύτταρα DVI φέρουν το αντιγόνο BARC. Μερικοί D φαινοτύποι, όπως το αδύναμο D (D weak) που συζητήθηκε παραπάνω, είναι το αποτέλεσμα απλών μεταβολών οξέων. Ωστόσο, σε αντίθεση με το ασθενές D, οι αλλαγές στα ερυθροκύτταρα προβλέπεται να βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. (87)

A.3.3.2.5 D και D-like επίτοποι στο RHCE.

Η έκφραση των D επιτόπων από το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου *RHCE*, απουσία του *RHD*, περιπλέκει περαιτέρω τον ορολογικό προσδιορισμό της κατάστασης D. Αρκετές πρωτεΐνες Rhce έχουν D-ειδικά αμινοξέα που αντιδρούν με κάποια μονοκλωνικά αντι-D αντισώματα. Συχνά απαντώνται σε μια συγκεκριμένη ομάδα πληθυσμού. Παραδείγματα περιλαμβάνουν το D^{HAR} αντιγόνο, το οποίο απαντάται σε άτομα Γερμανικής καταγωγής και το Crawford αντιγόνο (ceCF), τα οποία απαντώνται στα άτομα καταγωγής από την Αφρική. Τα δύο αυτά αντιγόνα είναι αξιοσημείωτα, επειδή τα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν ισχυρή αντιδραστικότητα με κάποια μονοκλωνικά αντιδραστήρια αλλά δεν αντιδρούν με άλλα, συμπεριλαμβανομένων των πολυκλωνικών αντι-D αντιδραστηρίων. Οι φαινοτύποι DAR και Crawford μπορούν να προκαλέσουν αποκλίσεις στην αναγνώριση του D αντιγόνου. Λιγότερο δραματικές είναι οι μεταβολές στις πρωτεΐνες Rhce που μιμούνται μια δομή D-επιτόπου, που κωδικοποιείται από αλληλόμορφα που ονομάζονται ceRT και ceSL (90, 91). Τα ερυθροκύτταρα είναι ασθενώς αντιδραστικά με κάποια μονοκλωνικά αντι-D αντιδραστήρια, αλλά όχι όλα. Το πιο σημαντικό είναι ότι τα άτομα με αυτούς τους φαινότυπους, στερούνται αντιγόνου RhD και μπορούν εύκολα να ευαισθητοποιηθούν (92, 93).

A.3.3.2.6 D αρνητικό (Rh αρνητικό)

Ο D-αρνητικός φαινότυπος κυριαρχεί στους λευκούς (15% -17%), λιγότερο πιθανός είναι στους Αφρικανούς μαύρους (3% -5%) και πιο σπάνια στους Ασιάτες (<0,1%). Ο D-αρνητικός φαινότυπος έχει προκύψει πολλές φορές, όπως αποδεικνύεται, από τις διάφορες μεταλλάξεις που είναι υπεύθυνες για την έλλειψη της έκφρασης του αντιγόνου-D σε διάφορες εθνοτικές ομάδες. Στα περισσότερα λευκά άτομα, προκύπτει από τη διαγραφή ολόκληρου του γονιδίου RHD (94).

Σε άλλες εθνοτικές ομάδες, οι D-αρνητικοί φαινότυποι προκαλούνται κυρίως από την απενεργοποίηση μεταλλάξεων στο RHD. Σε άτομα με αφρικανικό υπόβαθρο, το 66% έχει εισαγωγή της 37-bp στο γονίδιο RHD, με αποτέλεσμα ενός πρόωρου κωδικονίου τερματισμού. Στο 15% αναφέρθηκε ότι εμπεριέχεται το υβριδικό RHD-CE-D, που χαρακτηρίζεται από την έκφραση ασθενούς C (Cw) και όχι του αντιγόνου D, και στο υπόλοιπο 19% εμπεριέχεται η διαγραφή του γονιδίου RHD. Οι D-αρνητικοί φαινότυποι στους Ασιάτες προκύπτουν από μεταλλάξεις στο γονίδιο RHD και πιο συχνά συνδέονται με ένα Ce(r') απλοτυπο, αν και το 10% έως 30% των Ασιατών που τυποποιούνται ως D αρνητικοί, είναι στην πραγματικότητα Del.

A.3.4 Δοκιμασίες για το D

Τα πρώιμα αντιδραστήρια που αναπτύχθηκαν για τη δοκιμασία του αντιγόνου D αξιοποιούσαν αντισώματα που παρήχθησαν σε γυναίκες ευαισθητοποιημένες μετά από εγκυμοσύνη ή σε εθελοντές. Αυτά τα πολυκλωνικά αντισώματα είναι κατά κύριο λόγο IgG και αναγνωρίζουν πολλούς επιτόπους D. Τα υψηλής περιεκτικότητας σε πρόσθετες πρωτεΐνες σε αυτά τα αντιδραστήρια, αυξάνουν την ισχύ αλλά μπορούν να προκαλέσουν αυθόρμητη συσσωμάτωση των ερυθροκύτταρων και απαιτούν τη διενέργεια κατάλληλων ελέγχων.

A.3.4.1 Αντιδραστήρια

Η τεχνολογία των μονοκλωνικών αντισωμάτων, που εισήχθη στη δεκαετία του '80, απελευθέρωσε τους κατασκευαστές από την εξάρτηση σε υλικό ανθρώπινης προέλευσης. Ωστόσο, τα αντισώματα που είναι ειδικά για ένα μόνο D επίτοπο δεν ανιχνεύουν όλα τα D-θετικά ερυθροκύτταρα. Συνεπώς, πολλά αντι-D αντιδραστήρια που έχουν εγκριθεί από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) συνδυάζουν

ένα μονοκλωνικό αντίσωμα IgM, αντιδραστικό σε θερμοκρασία δωματίου, και ένα μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό αντίσωμα IgG, αντιδραστικό με ΙΑΤ, για τον προσδιορισμό των ασθενών D. Το Anti-D αντίσωμα για τη δοκιμασία συσσωμάτωσης στήλης είναι μια εξαίρεση και περιέχει μόνο ένα μονοκλωνικό IgM. Τρία από τα πέντε αντιδραστήρια περιέχουν μοναδικούς IgM κλώνους όπου μπορούν να αντιδρούν διαφορετικά με τα ερυθροκύτταρα που έχουν αδύναμους D, μερικούς D ή D-ομοιάζοντες επίτοπους.

A.3.4.2 Δότες

Ο στόχος ελέγχου του αντιγόνου D για τους δότες είναι να αποτρέψουν την ανοσοποίηση των δεκτών, η οποία περιλαμβάνει την αναγνώριση μονάδων με ασθενή D ή μερικά αντιγόνα D. Επομένως, τα πρότυπα AABB για τις τράπεζες αίματος και τις υπηρεσίες μετάγγισης απαιτούν να ελέγχεται το αίμα του δότη χρησιμοποιώντας μια μέθοδο που έχει σχεδιαστεί για να ανιχνεύει την ασθενή έκφραση του D και να επισημαίνεται ως "Rh θετικό" εάν η δοκιμασία είναι θετική. Επιπροσθέτως, πριν από τη μετάγγιση πρέπει να επιβεβαιωθεί μια μονάδα που φέρει την ένδειξη Rh αρνητική (D αρνητική) από ένα ολοκληρωμένο τμήμα (δεν απαιτείται επιβεβαιωτική δοκιμή για ασθενές D) και οι διαφορές πρέπει να αναφέρονται πριν την παράδοση της μονάδας του αίματος για μετάγγιση. Οι περισσότερες μονάδες αίματος ασθενούς αντιγόνου D ή μερικού αντιγόνου D ανιχνεύονται με αυτά τα μέτρα. Σπάνια, ωστόσο, δεν ανιχνεύονται κάποια πολύ ασθενή ερυθροκύτταρα D και τα ερυθροκύτταρα Del δεν αντιδρούν με αντι-D αντισώματα, ακόμη και με μεθόδους ΙΑΤ. Αν και τα ερυθροκύτταρα με ασθενές αντιγόνο D είναι λιγότερο ανοσογόνα από τα φυσιολογικά D-θετικά ερυθροκύτταρα (95), πολύ αδύναμες μονάδες δότη D και Del έχουν διεγείρει τα αντι-D αντισώματα σε μερικούς D-αρνητικούς υποδοχείς (86, 96-98). Τα συστατικά του αίματος που είναι επισημασμένα ως Rh αρνητικά, τα οποία μπορεί να έχουν διεγείρει τα αντι-D αντισώματα στους δέκτες, θα πρέπει να διερευνηθούν με ορολογικές μεθόδους και μεθόδους προσδιορισμού του γονότυπου για επιβεβαίωση της κατάστασης του D αντιγόνου. Ο γονότυπος RHD μπορεί να αναγνωρίσει την παρουσία δυνητικά ανοσογόνου έκθεσης RhD, η οποία δεν ανιχνεύεται από την ορολογία.

A.3.4.3 Δυσλειτουργίες στην αναγνώριση του D αντιγόνου

Οι αποκλίσεις στην αναγνώριση του D θα πρέπει πάντα να διερευνούνται και να επιλύονται. Το Rh- αρνητικό αίμα είναι μια κατάλληλη επιλογή για τους ασθενείς που χρειάζονται άμεση μετάγγιση, αλλά πρέπει να διεξαχθεί μία εμπειριστατωμένη επιστημονική και ορολογική έρευνα. Ο γονότυπος του *RHD* είναι χρήσιμος για την επίλυση των αποκλίσεων, στα κέντρα αιμοδοσίας, ελέγχουν για την ύπαρξη ασθενώς αντιγόνου D, καθώς ένας ασθενής με ασθενές D φαινότυπο, είναι κατάλληλος ως δότης για Rh-D θετικό ασθενή, ενώ πρέπει να ταξινομηθεί ως Rh-D αρνητικός ως δέκτης-ασθενής. Αυτό δεν πρέπει να θεωρείται περίεργο αλλά θα πρέπει να γνωστοποιείται στον δότη-ασθενή καθώς και στο υγειονομικό προσωπικό.

A.3.4.3.1 Κλινικές εκτιμήσεις

Το ιστορικό μεταγγίσεων των ασθενών με D weak αντιγόνα στα ερυθροκύτταρά τους, με D-θετικό αίμα υποδηλώνει ότι οι ασθενέστεροι τύποι 1, 2 και 3, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν την πλειοψηφία των λευκών με ασθενές D αντιγόνο στα ερυθρά τους, είναι απίθανο να εμφανίζουν αντι-D αντίσωμα και μπορούν να λάβουν D θετικό αίμα. Οι λιγότερο συνήθεις ασθενείς τύπου D 11 και τύπου 15 έχουν αναφερθεί ότι κάνουν αντι-D, υποδηλώνοντας ότι έχουν τροποποιήσει D επίτοπους. Απαιτούνται περισσότερα δεδομένα για τον προσδιορισμό του κινδύνου για την παραγωγή αντι-D σε άλλους αδύναμους τύπους D.

Οι ασθενείς με D partial ερυθροκύτταρα διατρέχουν κίνδυνο για την παραγωγή αντι-D αντισώματα και θα πρέπει να λαμβάνουν D αρνητικό αίμα και να θεωρούνται υποψήφιοι για ανοσοπροφύλαξη με RhIG. Πολλά ερυθροκύτταρα D partial αντιγόνα (π.χ. DIIIa, τα πιο κοινά D partial στην μαύρη φυλή) τύπου D θετικά, στις άμεσες δοκιμές αναγνωρίζονται μόνο μετά την παραγωγή αντι-D.

Οι πολιτικές σχετικά με τις διαδικασίες αναγνώρισης των D αντισωμάτων και την επιλογή των προϊόντων αίματος για μετάγγιση, θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τον πληθυσμό των ασθενών, τον κίνδυνο ανοσοποίησης στο D αντιγόνο και την περιορισμένη παροχή D-αρνητικών συστατικών του αίματος. Το αντι-D αντίσωμα είναι κλινικά σημαντικό αντίσωμα και είναι απαραίτητο να αποφευχθεί η ανοσοποίηση των γυναικών αναπαραγωγικού δυναμικού για την αποφυγή των

επιπλοκών του HDFN. Για τους υπόλοιπους ασθενείς, οι επιπλοκές του αντι-D αντισώματος είναι λιγότερο σοβαρές. Αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν την εξάρτηση των D αρνητικών ερυθροκυττάρων για μελλοντικά αιμορραγικά επεισόδια και τον πιθανό αυξημένο κίνδυνο παραγωγής πολλαπλών αντισωμάτων ομάδων αίματος επιπλέον των αντι-D. Η χορήγηση αντι-D αντισωμάτων, δεν είναι αναγκαία σε όλους του D-αρνητικούς ασθενείς που ευαισθητοποιούνται σε D θετικά ερυθροκύτταρα.

Οι υπηρεσίες θα πρέπει να ακολουθούν πολιτικές για την αντιμετώπιση της διαχείρισης των D θετικών ερυθροκυττάρων στους D- αρνητικούς ασθενείς και τη χρήση των RhIG, το οποίο είναι ένα προϊόν αίματος ανθρώπινης προέλευσης.

A.3.5 Αντιγόνο G

Το αντιγόνο G βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα που έχουν C ή D αντιγόνα και εκφράζεται από το γονίδιο 103Ser που υπάρχει στα RhD, RhCe ή RhCE ερυθροκύτταρα. Το αντιγόνο G είναι σημαντικό, επειδή τα αντισώματα έναντι αυτού φαίνεται ότι είναι αντι-D και αντι-C τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν με ορολογική δοκιμασία, αλλά το αντίσωμα μπορεί να απορροφηθεί από D- C+ ή D+ C- ερυθροκύτταρα. Το Anti-G μπορεί να εξηγήσει το D- αρνητικό άτομο που έχει μεταμοσχευθεί με D- (C+) μονάδα αίματος ή την γυναίκα με D- που γέννησε ένα παιδί D- (C +), το οποίο στη συνέχεια φαίνεται να εμφανίζει αντι-D αντισώματα.

Τα αντί-D, αντί-C και αντί-G αντισώματα μπορούν να διακριθούν με δοκιμασίες προσρόφησης και έκλουσης. Αυτό δεν είναι συνήθως αναγκαίο, καθώς οι ασθενείς με αντι-G αντισώματα πρέπει να λαμβάνουν D- C- αίματος. Εντούτοις, για τους μαιευτικούς ασθενείς είναι σημαντικό να προφυλάσσεται η προφύλαξη από RhIG σε γυναίκες με αντι-G αντισώματα στον ορό τους ώστε να αποφευχθεί η ανοσοποίηση στο D όταν υποδεικνύεται (δηλαδή, η έγκυος γυναίκα είναι D-C- και φαίνεται ότι έχει αντι-D και αντι- C αντισώματα, αλλά λόγω του αντι-G αντισώματος αυτή διεγείρεται από το C αντιγόνο, και το βρέφος είναι δυνητικά D+).

A.3.6 Αντιγόνα C/c και E/e

Τα κοινά αλληλόμορφα RHCE κωδικοποιούν τα αντιγόνα C ή c και E ή e. Ωστόσο, είναι γνωστά, περισσότερα από 60 διαφορετικά αλληλόμορφα γονιδια, και πολλά σχετίζονται με αλλοιωμένη ή ασθενή έκφραση των κύριων αντιγόνων και σε ορισμένες περιπτώσεις, με την απώλεια των αντιγόνων υψηλής επικράτησης. Μερικά

C αντισώματα καθώς και πολλά μερικά αντιγόνα C είναι καλά αναγνωρισμένα, ενώ λιγότερα μερικά αντιγόνα έχουν αναφερθεί στα αντιγόνα c. Τα αλληλόμορφα RHCE που απαντώνται συχνότερα στην πράξη μετάγγισης εξετάζονται παρακάτω.

A.3.7 Κλινικές εκτιμήσεις

Ο επιπολασμός των αλληλομόρφων RH που κωδικοποιούν άλλα αντιγόνα D, C και e σε αφρικανικές εθνοτικές ομάδες συχνά υποκρύπτουν την παραγωγή σύνθετων ειδικοτήτων αλλοαντισώματος Rh σε χρόνιους ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο (SCD). Έχει αναγνωριστεί από καιρό ότι η αλλοανοσοποίηση αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό πρόβλημα σε αυτόν τον πληθυσμό ασθενών, καθώς το 25% έως 30% των ασθενών με χρόνιες μεταγγίσεις SCD αναπτύσσουν αντισώματα κατά των ερυθροκυττάρων. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, πολλά προγράμματα καθορίζουν το φαινότυπο των ερυθροκυττάρων πριν τη μετάγγιση και μεταγγίζουν τα ερυθροκύτταρα που αντιστοιχούν στα αντιγόνα D, C, E και K, επειδή τα αντιγόνα αυτά θεωρούνται τα πιο ανοσογόνα. Επιπρόσθετα, ορισμένα προγράμματα επιχειρούν επίσης να προμηθεύονται ερυθροκύτταρα από δότες αφρικανικής καταγωγής, όποτε είναι δυνατόν.

Παρότι δεν υπάρχει επί του παρόντος ενημέρωση σχετικά με την ανάγκη πραγματοποίησης αντίστοιχου φαινοτύπου ερυθροκυττάρων για όλους τους ασθενείς με SCD (99), προγράμματα μετεμβολιασμού που έχουν πραγματοποιήσει μετάγγιση αίματος αντιστοίχου με αντιγόνο για D, C, E και K, έχουν καταφέρει να μειώσουν την επίπτωση της παραγωγής αλλοαντισωμάτων (100). Η εκτέλεση αυτής της προσέγγισης περιορίζεται από τους φαινοτύπους των διαθέσιμων δοτών και συχνά απαιτεί σημαντικές προσπάθειες για να αυξηθεί ο αριθμός των νέων δοτών. Δυστυχώς όμως, παρά την ταυτοποίηση των D, C/c και E/e, μερικοί ασθενείς εξακολουθούν να ευαισθητοποιούνται στα Rh αντιγόνα (D, C, e και hr^B, Hr^B, hr^S, Hr^S).

A.3.8 Γονότυπος του Rh

Οι μέθοδοι μοριακής εξέτασης DNA που χρησιμοποιούν την τεχνολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) εισήχθησαν πριν από μια δεκαετία, αφού η κλωνοποίηση των γονιδίων κατέστησε δυνατή τη διεξαγωγή γενετικών εξετάσεων για τις ομάδες αίματος. Η δημιουργία γονοτύπων περιορίστηκε κυρίως στο εργαστήριο αναφοράς, αλλά η ανάπτυξη αυτοματοποιημένων πλατφόρμων υψηλής

απόδοσης, έχει επεκτείνει τις δοκιμασίες και προσφέρει τη δυνατότητα για έναν οικονομικά αποδοτικό και γρήγορο έλεγχο για όλα τα αντιγόνα που μας ενδιαφέρουν.

Οι προσδιορισμοί που στοχεύουν στους πολυμορφισμούς των αλληλόμορφων που επικρατούν σε όλους τους πληθυσμούς είναι αναπαραγώγιμοι και σε μεγάλο βαθμό συσχετίζονται με τον φαινότυπο των ερυθροκυττάρων. Για ορισμένες ομάδες αίματος, οι δοκιμασίες που ανιχνεύουν μεταλλάξεις σίγασης γονιδίων, όπως εκείνες που υποδεικνύουν οι Fy(a-b-) και S-s- (U-), απαιτούνται επίσης για ακριβή ανίχνευση. Η γονιδιωματική γονοτύπιση κατά τα συστήματα ABO και Rh είναι αναγκαία, επειδή καθώς οι πολυάριθμοι πολυμορφισμοί επηρεάζουν την έκφραση του αντιγόνου. Πολλαπλές περιοχές των γονιδίων πρέπει να υποβληθούν σε έλεγχο για να ανακαλυφθούν και νέοι πολυμορφισμοί.

A.3.8 Λειτουργία των πρωτεϊνών RhCE και RhD

Η λειτουργία των πιο πρόσφατα εξελιγμένων πρωτεϊνών της ομάδας αίματος των ερυθροκυττάρων, RhCE και RhD, δεν έχει προσδιοριστεί. Οι RhCE και RhD πρωτεΐνες στερούνται τα υψηλά συντηρημένα υπολείμματα ιστιδίνης, που βρίσκονται στον πόρο της μεμβράνης και είναι κρίσιμα για τη μεταφορά αμμωνίας και οι λειτουργικές μελέτες υποδεικνύουν ότι δεν μεταφέρουν αμμωνία. Μια ελκυστική εναλλακτική υπόθεση είναι ότι η RhCE/RhD μπορεί να μεσολαβεί στην κίνηση του μη φορτισμένου μορίου CO₂. Ωστόσο, δεν υπάρχουν άμεσα στοιχεία για αυτό. Εναλλακτικά, αυτές οι Rh πρωτεΐνες μπορούν να συνεισφέρουν στη δομική ακεραιότητα της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων.

A.3.9 Αντισώματα Rh

Τα περισσότερα αντισώματα Rh είναι της τάξης των IgG, αν και σε ορισμένους ορούς μπορεί να περιέχουν συστατικό της τάξης των IgM. Τυπικά, τα αντισώματα Rh δεν ενεργοποιούν το συμπλήρωμα, με σπάνιες εξαιρέσεις. Ως αποτέλεσμα, στις αντιδράσεις μετάγγισης που εμπλέκονται τα αντισώματα Rh, η αιμόλυση είναι κυρίως εξωαγγειακή παρά ενδοαγγειακή. Τα αντισώματα οφείλονται πάντα στην ανοσοποίηση των ερυθροκυττάρων μετά από εγκυμοσύνη ή μετάγγιση, όπου συνήθως παραμένουν για πολλά χρόνια. Τα περισσότερα αντισώματα Rh θεωρείται ότι έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν κλινικά σημαντικές αντιδράσεις

HDFN και μετάγγισης. Το αντι-c, αποτελεί κλινικά το πιο σημαντικό αντίσωμα Rh μετά από αντι-D, και μπορεί να προκαλέσει σοβαρή HDFN. Τα αντι-C, -E και -e συχνά δεν προκαλούν HDFN και όταν συμβαίνει κάνουν, είναι συνήθως σε ήπιο βαθμό. Εάν τα επίπεδα των αντισωμάτων ορού πέσουν κάτω από τα επίπεδα ανίχνευσης, η επακόλουθη έκθεση στο αντιγόνο δημιουργεί χαρακτηριστικά μια γρήγορη ανοσιακή ανταπόκριση. Η αντιδραστικότητα των αντισωμάτων Rh ενισχύεται από την ενζυμική επεξεργασία των ερυθροκυττάρων και τα περισσότερα αντιδρούν βέλτιστα στους 37 ° C.

Ορισμένα αντισώματα Rh βρίσκονται συχνά μαζί. Για παράδειγμα, ένας ασθενής DCe/DCe (R₁R₁) με αντι-E αντισώματα έχει, βεβαίως, εκτεθεί και στο αντιγόνο c. Το αντι-c μπορεί να υπάρχει και σε αντίθεση με το αντι-E, μπορεί να είναι ασθενές και μη ανιχνεύσιμο κατά τη στιγμή της δοκιμασίας. Η μετάγγιση φαινομενικά συμβατού E-αρνητικού αίματος πιθανότατα θα είναι θετική και μπορεί να προκαλέσει μια άμεση ή καθυστερημένη αντίδραση μετάγγισης. Ως εκ τούτου, ορισμένοι υποστηρίζουν την αποφυγή του c+ θετικού αίματος σε αυτή την κατάσταση. Αντίθετα η ύπαρξη, αντι-E στον ορό που περιέχει αντι-c δεν δικαιολογείται, επειδή ο ασθενής πιθανώς θα έχει εκτεθεί στο c αντιγόνου χωρίς να έχει εκτεθεί στο αντιγόνο E. Επιπλέον, η συντριπτική πλειοψηφία του αίματος c-αρνητικού θα είναι αρνητική για το αντιγόνο E.

Αλλοαντισώματα σε αντιγόνα Rh υψηλής επικράτησης περιλαμβάνουν τα αντι-Rh29, που παράγονται από μερικά Rh_{null} άτομα που δεν έχουν Rh αντιγόνα, καθώς και άλλα που απαντώνται πιο συχνά σε μεταγγιζόμενους ασθενείς με SCD. Τα αλλοαντισώματα αντι-hr^S, -hr^B, -Hr^B και -Hr, μπορεί να είναι δύσκολο να εντοπιστούν είναι όμως κλινικά σημαντικά καθώς μπορούν να προκαλέσουν θάνατο κατά την μετάγγιση. Αυτοαντισώματα στα αντιγόνα Rh και σε υψηλό τίτλο, παρουσιάζονται συχνά στους ορούς των ασθενών με αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία.

A.3.10 Τεχνικές ελέγχου δοκιμασιών Rh

A.3.10.1 Αντιδραστήρια και ελέγχους υψηλής πρωτεΐνης

Ορισμένα αντιδραστήρια Rh που χρησιμοποιούνται σε δοκιμασίες διαφανειών, ταχείων σωληναρίων ή μικροπλακών περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις

πρωτεϊνών (20% έως 24%) και άλλων μακρομοριακών πρόσθετων. Αυτά τα αντιδραστήρια παράγονται από ομάδες ορών ανθρώπινης προέλευσης και παρέχουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Ωστόσο, τα υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών και τα μακρομοριακά πρόσθετα μπορεί να προκαλέσουν ψευδώς θετικές αντιδράσεις. Αυτά τα αντιδραστήρια Rh πρέπει να χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και μετά από κατάλληλους ελέγχους. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα θα οδηγούσαν έναν D- αρνητικό ασθενή να λάβει D+ θετικό αίμα και να γίνει ανοσοποιημένος. Αν τα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν συσσωμάτωση στη δοκιμασία ελέγχου, τα αποτελέσματα της δοκιμασίας δεν είναι έγκυρα.

A.3.10.2 Αντιδραστήρια και έλεγχοι χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες

Τα περισσότερα αντιδραστήρια Rh καθημερινής χρήσης είναι αντιδραστήρια χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη και σχηματίζονται κυρίως με μονοκλωνικά αντισώματα IgM. Περιέχουν συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης που προσεγγίζει εκείνη του ανθρώπινου ορού και τα ερυθροκύτταρα που είναι επικαλυμμένα με ανοσοσφαιρίνη μπορούν συνήθως να ανιχνευθούν επιτυχώς στις άμεσες δοκιμές. Μπορεί να συμβεί αυθόρμητη συγκόλληση που προκαλεί ψευδώς θετικό αποτέλεσμα, λιγότερο όμως συχνά από ό,τι παρατηρείται με παράγοντες υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας, που εκτελείται ταυτόχρονα με παρόμοιο τρόπο, χρησιμεύει ως έλεγχος. Για παράδειγμα, για την τυποποίηση ABO και Rh, η απουσία συγκόλλησης με το αντι-A ή το αντι-B αντίσωμα χρησιμεύει ως έλεγχος για την αυθόρμητη συσώρευση. Για τα ερυθροκύτταρα που παρουσιάζουν συγκόλληση με όλα τα αντιδραστήρια (π.χ. ομάδα AB, D+) απαιτείται επιπλέον έλεγχος, όπως συνιστάται από τον παρασκευαστή των αντιδραστηρίων (με εξαίρεση την επαναφορά του δότη). Στις περισσότερες περιπτώσεις, ένας κατάλληλος έλεγχος είναι η χρήση ενός εναιωρήματος με τα ερυθροκύτταρα του ασθενούς αναμειγμένα με αυτορρυθμισμένο ορό ή με αλβουμίνη 6% ή 8%.

Τα περισσότερα αντιδραστήρια προσδιορισμού Rh, με εξαίρεση το αντιδραστήριο αντι-D, δεν προορίζονται για δοκιμή IAT και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται κατ'αυτόν τον τρόπο, εκτός εάν το αναγράφει ο παρασκευαστής

στις οδηγίες. Η δοκιμή έμμεσης αντισφαιρίνης δεν ισχύει σε ερυθροκύτταρα με θετικό DAT, εκτός εάν χρησιμοποιούνται μέθοδοι για την απομάκρυνση του IgG αντισώματος. Θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι θα πρέπει να πραγματοποιούνται και τα θετικά ερυθροκύτταρα ελέγχου θα πρέπει να έχουν μία δόση του αντιγόνου ή να είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν αρνητική αντιδραστικότητα.

A.3.10.3 Αιτίες ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων ανάγνωσης του Rh

Η ψευδώς θετική ανάγνωση μπορεί να προκύψει από:

1. Θερμές ή ψυχρές αυτο-συγκολλητίνες που προκαλούν επικάλυψη ανοσοσφαιρίνης στα ερυθροκύτταρα. Οι IgM ψύχρο συγκολλητίνες μπορούν συχνά να εξαλειφθούν με έκπλυση των ερυθροκυττάρων αρκετές φορές με θερμό φυσιολογικό ορό και επανέλεγχο. Οι θερμές IgG αυτο-συγκολλητίνες προκαλούν κυρίως ψευδώς θετικά αποτελέσματα στη φάση της δοκιμής IAT.

2. Παράγοντες ορού που επάγουν την αυθόρμητη συσσωμάτωση των ερυθροκυττάρων. Οι παράγοντες του ορού μπορούν να εξαλειφθούν με την πλήρη πλύση των ερυθροκυττάρων και την επανεξέταση.

3. Λάθος αντιδραστήριο το οποίο χρησιμοποιείται ακούσια.

4. Αντιδραστήριο μολυσμένο με αντιδραστήριο από άλλο φιαλίδιο.

5. Κάποιο συστατικό του αντιδραστηρίου εκτός από το αντίσωμα (δηλαδή συντηρητικό, αντιβιοτικό ή χρωστική ουσία) που προκαλεί μη ειδική συσσωμάτωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

6. Ερυθροκύτταρα που είναι συσσωματωμένα με αντιδραστήρια που περιέχουν ανθρώπινο ορό.

Η ψευδώς αρνητική τυποποίηση μπορεί να προκύψει από:

1. Αποτυχία προσθήκης του αντιδραστηρίου. Καλή πρακτική αποτελεί η προσθήκη αντιδραστηρίου τυποποίησης σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες ή φρεάτια, πριν από την προσθήκη των ερυθροκυττάρων.

2. Λάθος αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται.

3. Εναιώρημα ερυθροκυττάρων που είναι πολύ βαρύ για τη δοκιμασία του σωλήνα ή είναι πολύ ασθενές για τη δοκιμασία διαφανειών.
4. Ανεπιθύμητα ερυθροκύτταρα με ασθενές αντιγόνο D σε άμεσες δοκιμές μετά από άμεση φυγοκέντρηση.
5. Ένα ειδικό αντιδραστήριο που δεν αντιδρά με μια παραλλαγή ή αδύναμη μορφή του αντιγόνου.
6. Τα συγκολλημένα ερυθροκύτταρα διασκορπίζονται με έντονη ανακίνηση των ερυθροκυττάρων.
7. Μόλυνση, ακατάλληλη αποθήκευση ή απενεργοποίηση του αντιδραστήριου.
8. Τα ερυθροκύτταρα με έντονα θετικό DAT και με θέσεις αντιγόνου μπλοκαρίστηκαν λόγω μιας μεγάλης ποσότητας δεσμευμένου αντισώματος (που εμφανίζεται κυρίως σε σοβαρή HDFN που προκαλείται από αντι-D).

A.4 Άλλα Συστήματα

Η διεθνής κοινότητα μετάγγισης (ISBT) αναγνωρίζει 328 είδη αντιγόνων, εκ των οποίων τα 284 αντιγόνα ανήκουν σε ένα από τα 30 συστήματα αίματος.(84, 101) Κάθε σύστημα αντιπροσωπεύει είτε ένα μόνο γονίδιο είτε δύο ή τρία στενά συνδεδεμένα ομόλογα γονίδια. Το ABO και το Rh σύστημα είναι τα πιο γνωστά και κλινικά πιο σημαντικά συστήματα τα οποία περιγράφηκαν παραπάνω. Τα αντιγόνα των H, τα συστήματα Lewis, I, P1PK και Globoside είναι υδατάνθρακικές δομές που βιοχημικά σχετίζονται στενά με τα αντιγόνα ABO. Τα υπόλοιπα συστήματα περιγράφονται παρακάτω. Εκτός από τα 30 συστήματα, ορισμένες ομάδες αντιγόνων που είναι ορολογικά, βιοχημικά ή γενετικά σχετικές, αλλά μη επιλέξιμες να ενταχθούν σε ένα σύστημα ταξινομούνται μαζί ως συλλογές. Άλλα αντιγόνα που δεν είναι επιλέξιμα να συμμετάσχουν σε ένα σύστημα ή μια συλλογή είναι είτε χαμηλού ή υψηλού επιπολασμού στους περισσότερους μεγάλους πληθυσμούς και συνθέτουν τις σειρές 700 και 901, αναστέλλοντας τον ανασυνδυασμό μεταξύ των στενά συνδεδεμένων. Η πιο σημαντική πτυχή της ομάδας αίματος στη διαδικασία της μετάγγισης είναι εάν τα αντίστοιχα αντισώματα είναι αιμολυτικά και ως εκ τούτου έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν αιμολυτικές αντιδράσεις μετάγγισης (HTRs) και αιμολυτική ασθένεια του εμβρύου- νεογνού (HDFN) .

A.4.1 Σύστημα MNS

Το MNS είναι ένα εξαιρετικά πολύπλοκο σύστημα ομάδων αίματος που αποτελείται από 46 αντιγόνα. Όπως και με το Rh, μεγάλο μέρος της πολυπλοκότητας προκύπτει από τον ανασυνδυασμό μεταξύ στενά συνδεδεμένων ομοιογενών γονιδίων. (1, 84, 102)

A.4.1.1 Οι MNS Γλυκοπρωτεΐνες και τα γονίδια που τις κωδικοποιούν

Τα αντιγόνα του συστήματος MNS βρίσκονται στην περιοχή μίας ή αμφότερων των δύο γλυκοπρωτεϊνών της γλυκοφορίνη A (GPA, CD235A) και της γλυκοφορίνης B (GPB, CD235B). Καθένα διασχίζει τη μεμβράνη μία φορά, με μια εξωτερική περιοχή N-αμινοτελικού (GPA, 72 αμινοξέα, GPB, 44 αμινοξέα) και μία τελική κυτοσολική περιοχή (GPA, 36, GPB, 8). Οι εξωκυτταρικές περιοχές και των δύο μορίων έχουν πολλές πλούσιες σε σιαλικό οξύ O-γλυκάνες. Η GPA είναι N-γλυκοζυλιωμένη στην ασπαραγίνη-45 (26 σε φυσική πρωτεΐνη), ενώ η GPB δεν είναι N-γλυκοζυλιωμένη.

Η μακρά κυτοσολική ουρά της GPA αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό. Η GPA έχει περίπου 200.000 αντίγραφα ανά κύτταρο. Η GPA αποτελεί την ένωση στην μεμβράνη με τη ζώνη 3 (Diego αντιγόνο), και τόσο η GPA όσο και η GPB φαίνεται να είναι μέρος του συμπλόκου Band 3/Rh ankirin (27, 103). Μια περιοχή του εξωνίου 3 της GYPB είναι ομόλογη στο εξώνιο 3 της GYPA αλλά δεν εκφράζεται λόγω ελαττωματικής θέσης ματίσματος (104). Το εξόνιο 1 κάθε γονιδίου κωδικοποιεί ένα σηματοδοτικό 19-αμινοξύ πεπτίδιο που δεν υπάρχει στην ώριμη πρωτεΐνη. Ένα τρίτο γονίδιο, το GYPE, πιθανότατα παράγει μια τρίτη γλυκοπρωτεΐνη, της γλυκοφορίνη E, αλλά αυτό έχει ελάχιστο ή καθόλου ενεργό ρόλο στην έκφραση του αντιγόνου. Η GPA περιορίζεται στα ερυθροκύτταρα και χρησιμοποιείται συχνά ως μια σήμανση των ερυθρών. Τόσο η GPA όσο και η GPB εκμεταλλεύονται το ελονοσιακό παράσιτο *Plasmodium falciparum* ως υποδοχείς για σύνδεση με τα ερυθροκύτταρα και μπορεί να είναι κρίσιμης σημασίας για τη διαδικασία εισβολής. Επίσης, μοριο της GPA πρωτεΐνης έχει ανιχνευθεί και στο νεφρικό ενδοθήλιο. (105, 106)

A.4.2 Σύστημα Kell και Kx

Συχνά αναφέρεται ως Kell αντιγόνο, αλλά σωστά ονομάζεται K ή KEL1. Είναι το αρχικό αντιγόνο του συστήματος Kell και του πρώτου αντιγόνου της ομάδας αίματος που έχει εντοπιστεί, μετά την ανακάλυψη του στη δοκιμασία αντισφαιρίνης το 1946. Τώρα πλέον το σύστημα Kell αποτελείται τώρα από 32 αντιγόνα αριθμημένα από KEL1 έως KEL35. Περιλαμβάνει πέντε ζεύγη (K / k, Js^a/ Js^b, K11 / K17, K14 / K24, VLAN / VONG) και μία τριάδα (Kp^a/ Kp^b/ Kp^c) του Kell αντιθετικά αντιγόνα. Αρχικά τα περισσότερα αντιγόνα εντάχθηκαν στο Kell σύστημα μέσω γενετικών συσχέτισεων που παρατηρήθηκαν σε οικογένειες. Οι ενώσεις αυτές έχουν τώρα επιβεβαιωθεί με την αλληλουχία του DNA του γονιδίου KEL. (107)

A.4.3 Σύστημα Duffy

Το σύστημα Duffy περιλαμβάνει επίσημα πέντε αντιγόνα που βρίσκονται σε μια γλυκοπρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο Duffy (DARC), το οποίο αποτελείται από δύο εξόνια, με το εξόνιο 1 να κωδικοποιεί μόνο τα πρώτα επτά αμινοξέα της γλυκοπρωτεΐνης Duffy. Το DARC βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1q23.2. (107)

Fya (FY1) και Fyb (FY2)

Στο λευκό πληθυσμό και στον πληθυσμό ασιατικής καταγωγής, ο πολυμορφισμός Duffy αποτελείται από δύο αντιγόνα, Fya και Fyb, που δημιουργούν τρεις φαινότυπους, Fy (a + b-), Fy (a + b +), και Fy (a-b +). Τα αλληλόμορφα Fya και Fyb αντιπροσωπεύουν έναν SNP στο εξόνιο 2 του DARC, που κωδικοποιούν τις Gly42 και Asp42, αντιστοίχως, στην N-τερματική εξωκυτταρική περιοχή της γλυκοπρωτεΐνης. Τα Fya και Fyb είναι πολύ ευαίσθητα στα περισσότερα πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως η παπαΐνη, η φικίνη και η βρωμελίνη, αλλά δεν καταστρέφονται από τη θρυψίνη. Στους ανθρώπους της αφρικανικής εθνικότητας υπάρχει ένα τρίτο αλληλόμορφο, το Fy, σε μεγαλύτερη ποσότητα από το Fya και το Fyb. Το Fy δεν παράγει γλυκοπρωτεΐνη Duffy στα ερυθροκύτταρα και συνεπώς ούτε τα αντιγόνα Fya και Fyb. Οι επιμέρους ομόζυγοι για τη Fy έχουν το φαινότυπο των

ερυθροκυττάρων Fy (a-b-), ο επιπολασμός του οποίου κυμαίνεται από περίπου 70% στους Αφροαμερικανούς έως 100% στη Γκάμπια.

A.4.4 Σύστημα Kidd

Το Kidd περιλαμβάνει τρία αντιγόνα που εντοπίζονται σε μια γλυκοπρωτεΐνη. Το γονίδιο Kidd (SLC14A1) περιέχει 11 εξόνια, με τα εξόνια 4 έως 11 που κωδικοποιούν την ώριμη πρωτεΐνη να εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 18q12.3. (107)

A.4.4.1 Jk^a (JK1) και Jk^b (JK2)

Τα Jk^a και Jk^b είναι τα προϊόντα των αλληλόμορφων, που αντιπροσωπεύουν Asp280 και Asn280 στον τέταρτο εξωτερικό βρόγχο της γλυκοπρωτεΐνης Kidd. Έχουν παρόμοιο επικρατή ρυθμό μεταξύ του Λευκού και Ασιατικού πληθυσμούς, αλλά η Jk^a είναι σε μεγαλύτερη ποσότητα από την Jk^b στους Μαύρους. Τα αντιγόνα Kidd είναι ανθεκτικά σε πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η παπαΐνη και η φικίνη.

A.4.4.2 Jk (a-b-) και Jk3

Ο μηδενικός φαινότυπος, Jk (a-b-) Jk: -3, συνήθως προκύπτει από την ομοζυγωτία ενός σιωπηλού γονιδίου στον τόπο JK. Μολονότι είναι πολύ σπάνιο στους περισσότερους πληθυσμούς, ο μηδενικός φαινότυπος είναι σχετικά κοινός στους Πολυνησίους, με έναν επιπολασμό περίπου 1 στους 400, αλλά έως και 1,4% στους Niueans. Το πολυνησιακό αλληλίο null περιέχει μία μετάλλαξη θέσης ματίσματος στο εξόνιο 5, με αποτέλεσμα την απώλεια του εξονίου 6 από το mRNA. Στους Φινλανδούς, όπου το Jk (a-b-) είναι λιγότερο σπάνιο από ό,τι σε άλλους πληθυσμούς ευρωπαϊκής εθνικότητας και η μετάλλαξη είναι υπεύθυνη για την υποκατάσταση της Ser291Pro, τα ανοσοποιημένα άτομα με τον φαινότυπο Jk(a-b-) μπορεί να παράγουν αντι-Jk3. Μια εξαιρετικά σπάνια μορφή φαινοτύπου Jk(a-b-) που βρέθηκε στα ιαπωνικά αποτελέσματα από ετεροζυγωτικότητα από ένα κυρίαρχο γονίδιο παρεμποδιστή, που ονομάζεται In (Jk) είναι κατα αναλογία με τον In (Lu) έναν κυρίαρχο αναστολέα των Lutheran και άλλων αντιγόνων. Πολύ ασθενής έκφραση του Jk^a ή Jk^b μπορεί να ανιχνευθεί σε ερυθροκύτταρα In (Jk) με δοκιμασίες προσρόφησης/έκλυσης.

A.4.5 Σύστημα Diego

Τα 22 αντιγόνα του συστήματος Diego βρίσκονται στη ζώνη 3, είναι κοινή η ονομασία για τον ανιοντοανταλλάκτη ερυθροκυττάρων και την οικογένεια φορέων διαλυτής ουσίας 4 A1 (SLC4A1) (108).

Η ζώνη 3 είναι μία μείζων γλυκοπρωτεΐνη μεμβράνης ερυθροκυττάρων με περίπου 106 αντίγραφα ανά ερυθρό κύτταρο. Εκτός από μια διαμεμβρανική περιοχή που διασχίζει τη μεμβράνη περίπου 14 φορές, με μία N-γλυκάνη στην τέταρτη εξωκυτταρική θηλειά, η ζώνη 3 έχει ένα μακρύ κυτταροπλασματικό N-τελικό πεδίο που αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες αγκιρίνης σκελετού μεμβράνης 4.1R και πρωτεΐνη 4.2 όπου λειτουργεί επίσης ως θέση δέσμευσης για την αιμοσφαιρίνη. Η βραχεία κυτταροπλασματική C-τερματική περιοχή δεσμεύει την ανθρακική ανυδράση II. Η ζώνη 3 στα ερυθροκύτταρα έχει τουλάχιστον δύο κύριες λειτουργίες:

- i. την ταχεία ανταλλαγή ιόντων HCO^- και Cl^- , σημαντικές για τη μεταφορά CO_2 και
- ii. την προσάρτηση της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων στον κυτταρόπλασμα.

Τα τετραμερή της ζώνης 3 αποτελούν τον πυρήνα της ζώνης-3/Rh πρωτεϊνών μεμβράνης ερυθροκυττάρων, η οποία θα μπορούσε να λειτουργήσει ως αγωγός αερίου για το O_2 και το CO_2 (27). Η ζώνη-3 είναι επίσης ένα συστατικό του συμπλέγματος που συνδέει την μεμβράνη των ερυθροκυττάρων με τον σκελετό της μεμβράνης μέσω γλυκοφορίνης C(103). Το γονίδιο Band 3 (SLC4A1) αποτελείται από 20 εξόνια κωδικοποίησης και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17.

A.5 Ερυθροκυτταρική αλλοανοσοποίηση στην εγκυμοσύνη

Τα μητρικά αντισώματα έναντι των αντιγόνων των ερυθροκυττάρων μπορούν να περάσουν από τον πλακουντιακό φραγμό, να συνδεθούν με τα ερυθροκύτταρα του εμβρύου και να οδηγήσουν τελικά στην καταστροφή τους. Ιστορικά, τα περιγεννητικά αποτελέσματα αυτών των αντισωμάτων δεν μπορούσαν να αξιολογηθούν παρά μετά την γέννηση και χρησιμοποιήθηκε ο περιγραφικός όρος αιμολυτική νόσος του

νεογνού (HDN). Η εμφάνιση τέτοιων διαγνωστικών εργαλείων, όπως η υπερήχηση και η δειγματοληψία αίματος εμβρύου (FBS), επέτρεψε τη διάγνωση της εμβρυϊκής αναιμίας και του εμβρυϊκού ύδρωπα πριν την γέννηση. Για το λόγο αυτό, ο όρος αιμολυτική νόσος του εμβρύου και του νεογνού (HDFN) είναι καταλληλότερη για να περιγράψει αυτή τη διαταραχή. Ένας άλλος ιστορικός όρος, εμβρυϊκή ερυθροβλάστωση, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά όταν οι νεογνικές μελέτες αποκάλυψαν ένα μεγάλο ποσοστό κυκλοφορούντων ερυθροβλαστών σε ασθενείς με σοβαρή HDFN. Αυτό αντιπροσωπεύει μια βαθιά κατάσταση εμβρυϊκής αναιμίας που πιθανώς συμβαίνει σε ένα μικρό ποσοστό μόνο των περιπτώσεων HDFN. Επομένως, ο όρος εμβρυϊκή ερυθροβλάστωση θα πρέπει να αντικατασταθεί από HDFN. Τέλος, η μητρική αιτιολογία της HDFN, δηλαδή ο σχηματισμός αντισωμάτων σε αντιγόνα ερυθροκυττάρων, πρέπει να ονομάζεται αλλοανοσοποίηση ερυθροκυττάρων αντί του παλαιότερου όρου της ισοανοσοποίησης των ερυθροκυττάρων.

A.5.1 Ιστορικές προοπτικές

Η πρώτη περίπτωση του HDFN περιγράφηκε πιθανότατα στη γαλλική λογοτεχνία από μαία το 1609. Η περίπτωση ήταν μια δίδυμη κύηση κατά την οποία το πρώτο έμβρυο είχε επιβιώσει και το δεύτερο δίδυμο ανέπτυξε ίκτερο και πέθανε αμέσως μετά τη γέννηση. Υπάρχουν κάποιες υποδείξεις ότι το HDFN προκλήθηκε από το αντίσωμα Rhesus D (RhD).(109)

Η δεκαετία του 1990 έβλεπε την εισαγωγή γενετικών τεχνικών που χρησιμοποιούσαν αμνιογνωστικές μεθόδους για την τυποποίηση των ερυθροκυττάρων του εμβρύου. Με την αυγή της νέας χιλιετίας, η μη επεμβατική ανίχνευση της εμβρυϊκής αναιμίας μέσω υπερήχων Doppler έγινε πραγματικότητα. Ο μη επεμβατικός προσδιορισμός της κατάστασης του εμβρυϊκού αντιγόνου χρησιμοποιώντας ελεύθερο DNA στη μητρική κυκλοφορία εισέρχεται πλέον στην κλινική πρακτική.

A.5.2 Η συμβολή της ανοσοπροφύλαξης

Η εμφάνιση της συνηθισμένης χορήγησης προγεννητικής και μεταγεννητικής ανοσοσφαιρίνης Rhesus (RhIG) οδήγησε σε αξιοσημείωτη μείωση σε περιπτώσεις αλλοανοσοποίησης ερυθροκυττάρων δευτερογενώς προς το αντιγόνο RhD. Μια έκθεση από τα νοσοκομεία παρακολούθησης των Κέντρων Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων σημείωσε το 1991 ότι 1 στα 1000 γεννημένα βρέφη εμφάνισαν κάποια επίδραση από την αιμολυτική νόσου Rhesus (110). Δεδομένα από την επανεξέταση του εθνικού μητρώου αμερικανικών πιστοποιητικών γέννησης το 2003 έδειξαν συχνότητα 6,8 περιπτώσεων ανά 1000 γεννήσεις. Παρόλο που φαίνεται ότι αυτό δείχνει μια αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης, η αναφορά στη δεύτερη μελέτη πιθανότατα εξηγεί αυτή τη διαφορά. Σαφώς, η μετατόπιση σε άλλα αντισώματα ερυθροκυττάρων που σχετίζονται με HDFN έχει συμβεί ως αποτέλεσμα της μειωμένης επίπτωσης της αλλοανοσοποίησης RhD. (111)

A.5.3 Παθοφυσιολογία

Είναι γνωστό ότι η διεπαφή εμβρύου-μητέρας δεν αποτελεί απόλυτο φραγμό, διότι υπάρχουν ενδείξεις ότι υπάρχει σημαντική διακίνηση πολλών τύπων κυττάρων μεταξύ του εμβρύου και της μητέρας καθ'όλη τη διάρκεια της κύησης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το αντιγονικό φορτίο ενός υποτιθέμενου αντιγόνου στα ερυθροκύτταρα και στους ερυθροκυτταρικούς προδρόμους του εμβρύου είναι ανεπαρκές για να διεγείρει το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα. Ωστόσο, στην περίπτωση μεγάλης κερατοειδούς εμβρυϊκής αιμορραγίας (FMH) ή FMH κατά την γέννα, κλώνοι των B λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν το ξένο αντιγόνο ερυθροκυττάρων είναι παρόντες. Η αρχική μητρική παραγωγή της ανοσοσφαιρίνης M (IgM) είναι βραχύβια και ακολουθείται από ταχεία αλλαγή σε απόκριση IgG. Ένας ανθρώπινος τίτλος αντισφαιρίνης μπορεί συνήθως να ανιχνευθεί από 5 έως 16 εβδομάδες μετά την ευαισθητοποίηση.

Η αντι-D ανοσοανταπόκριση είναι μεγαλύτερη, χαρακτηρίζεται από αντι-ερυθροκυτταρικά αντισώματα και σχετίζεται κατά κύριο λόγο με HDFN. Σε ένα τρίτο

των περιπτώσεων παράγεται μόνο η υποκατηγορία IgG1. Στο υπόλοιπο των περιπτώσεων, ένας συνδυασμός υποκλάσεων IgG1 και IgG3 (107). Η IgG3 αντι-D πιστεύεται ότι προάγει την αλληλεπίδραση μονοκυττάρου-ερυθροκυττάρου αποτελεσματικότερα από την IgG1. Το αντι-D IgG είναι ένα μη-συσσωματωμένο αντίσωμα που δεν δεσμεύει το συμπλήρωμα. (112)

Μετά την αρχική αντιγονική έκθεση, τα λεμφοκύτταρα B της μνήμης περιμένουν την εμφάνιση ερυθροκυττάρων που περιέχουν το υποτιθέμενο αντιγόνο σε μεταγενέστερη κύηση. Αν διεγείρονται από εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα, αυτά τα B λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε κύτταρα πλάσματος που μπορούν να πολλαπλασιαστούν γρήγορα και να παράγουν IgG αντισώματα και αύξηση του μητρικού τίτλου. Η μητρική IgG διαπερνά τον πλακούντα και συνδέεται με τα ερυθροκύτταρα του εμβρύου που έχουν εκφράσει το πατρικό αντιγόνο. Αυτά τα κύτταρα στη συνέχεια απομονώνονται από μακροφάγα στον εμβρυϊκό σπλήνα, όπου υποβάλλονται σε εξωαγγειακή αιμόλυση, προκαλώντας αναιμία του εμβρύου. Το εμβρυϊκό φύλο μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ανταπόκριση του εμβρύου στα μητρικά αντισώματα. Ο Ulm και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι η πιθανότητα για εμβρυϊκό ύδρωπα αυξήθηκε κατά 13 φορές σε RhD αρσενικά έμβρυα συγκριτικά με τα αντίστοιχα θύλη, ο προσαρμοσμένος λόγος πιθανότητας για περιγεννητική θνησιμότητα ήταν 3,38 σε αρσενικά έμβρυα. (113)

Τέλος, οι Vaughan και συνεργάτες (96) ανέλαβαν μια *in vitro* ανάλυση ερυθροειδών προγόνων για να εκτιμήσουν την επίδραση των αντισωμάτων αντι-K1 σε σύγκριση με τα αντί-D αντισώματα. Kell- και Kell+ ερυθροειδείς κυτταρικές σειρές δημιουργήθηκαν από αίμα ομφάλιου λώρου. Ο ορός από 22 γυναίκες που ευαισθητοποιήθηκαν στο Kell υπέστησαν την ανάπτυξη Kell+ ερυθροειδών, δεν υπήρξε καταστολή στις Kell-cultures. Το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-K1 προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη καταστολή ανάπτυξης σε κυτταρικές σειρές Kell+ αλλά όχι σε κυτταρικές σειρές Kell. Το μονοκλωνικό αντί-RhD αντίσωμα δεν παρουσίασε καταστολή σε καμία από τις κυτταρικές σειρές. Ο ρόλος του αντιγόνου Kell στην φυσιολογία των ερυθροκυττάρων είναι άγνωστος. Ωστόσο, η πρωτεΐνη Kell έχει δομικές ομοιότητες με τις ενδοπεπτιδάσες και επομένως μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση πρωτεϊνών και την κυτταρική ανάπτυξη στα ερυθροειδή κύτταρα. Αυτή τη στιγμή, λίγα είναι γνωστά ως προς το αν άλλα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα σχετίζονται με την καταστολή της εμβρυϊκής ερυθροποίησης.

A.5.4 Πρόληψη της αιμολυτικής νόσου RhD του εμβρύου και του νεογέννητου

Τέσσερα παρασκευάσματα RhIG είναι σήμερα διαθέσιμα στις Ηνωμένες Πολιτείες για την πρόληψη της αλλοανοσοποίησης RhD. Δύο από τα προϊόντα (RhoGAM, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ και HyperRHO S/D, Talecris Biotherapeutics-USA, Research Triangle Park, NC) περιορίζονται στην ενδομυϊκή χρήση επειδή παρασκευάζονται με κλασματοποίηση Cohnold αιθανόλης, μπορεί να καταλήξουν σε μόλυνση με IgA και άλλες πρωτεΐνες πλάσματος. Τα υπόλοιπα δύο προϊόντα (WinRho-SDF, Cangene Corporation, Winnipeg, Canada και Rhophlac, CSL Behring, Marburg, Germany) παρασκευάζονται μέσω στήλης σεφαρόζης και χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων, αντίστοιχα. Επί του παρόντος, όλα τα διαθέσιμα προϊόντα υπόκεινται σε επεξεργασία με απορρυπαντικά διαλύτη για την απενεργοποίηση των επικαλυμμένων ιών. Πολλοί κατασκευαστές χρησιμοποιούν επίσης ένα επιπλέον στάδιο φιλτραρίσματος μικρο-πόρων για περαιτέρω μείωση της πιθανότητας μόλυνσης από ιούς. Το Thimerosal, ένα προερχόμενο από υδράργυρο συντηρητικό που χρησιμοποιείται για την πρόληψη της βακτηριακής και μυκητιακής μόλυνσης, έχει αφαιρεθεί από όλα τα προϊόντα RhIG που χρησιμοποιούνται στις Ηνωμένες Πολιτείες.

Ο περιορισμένος πόρος των δοτών και τα θέματα με την ασφάλεια της έγχυσης εξωγενών ερυθροκυττάρων οδήγησαν αρκετούς ερευνητές να αναπτύξουν μονοκλωνικά αντι-D παρασκευάσματα για να αντικαταστήσουν τα σημερινά πολυκλωνικά προϊόντα που κυκλοφορούν στην αγορά (114). Το πολυκλωνικό αντι-D αποτελείται από περίπου 85% IgG1 και 15% IgG3. Δοκιμασίες έχουν αναφερθεί με μείγματα μονοκλωνικών αντισωμάτων όπως BRAD-5/BRAD-3 (99). Αν και οι περισσότερες κλινικές δοκιμές έχουν αποκαλύψει αυξημένη κάθαρση των RhD+ ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία των ασθενών με RhD, οι περισσότερες από τις μονοκλωνικές που ελέγχθηκαν δεν έχουν επιτύχει ρυθμούς κάθαρσης που ισοδυναμεί με εκείνη του πολυκλωνικού αντι-D. Μία από τις μεγαλύτερες μελέτες που χρησιμοποίησαν ένα μονοκλωνικό αντίσωμα συνδυασμού BRAD-5/BRAD-3 αποκάλυψε ποσοστό αποτυχίας 2% για την πρόληψη της αλλοανοσοποίησης (99). Μόνο το μονοκλωνικό αντίσωμα T125 παρουσίασε κάθαρση ερυθρών αιμοσφαιρίων

ίση με πολυκλωνικό αντι-D σε μοντέλο ποντικού σοβαρής ανοσοανεπάρκειας (SCID). (115)

Όλες οι έγκυες ασθενείς πρέπει να υποβάλλονται σε εξέταση αντισωμάτων κατά την πρώτη προγεννητική επίσκεψη. Εάν δεν υπάρχουν ενδείξεις αντι-D αλλοανοσοποίησης στη γυναίκα RhD, οι συστάσεις στη Βόρεια Αμερική περιλαμβάνουν την ενδομυϊκή χορήγηση 300 μg RhIG στην 28 εβδομάδα.

Αυτή η πρακτική έχει αναφερθεί ότι μειώνει τη συχνότητα της προληπτικής αλλοανοσοποίησης από 2% σε 0,1% (116). Στο Ηνωμένο Βασίλειο χρησιμοποιείται προγενετικό πρωτόκολλο χορήγησης 100 μg (500 IU) RhIG στην 28 και 34 εβδομάδα. Οι περιορισμένοι πόροι δεν επέτρεψαν την επέκταση αυτού του πρωτοκόλλου σε όλες τις εγκυμοσύνες. (117)

Η Αμερικανική Ένωση Τραπεζών Αίματος συνιστά να πραγματοποιηθεί έλεγχος επαναλαμβανόμενων αντισωμάτων πριν από τη χορήγηση του προγεννητικού RhIG, αν και η επίπτωση της αλλοανοσοποίησης πριν από 28 εβδομάδες είναι πολύ χαμηλή. Η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας αυτής της πρακτικής αμφισβητήθηκε από το American College of Obstetricians (100). Εάν πρόκειται να πραγματοποιηθεί μια επαναλαμβανόμενη εξέταση αντισωμάτων, ένα δείγμα μητρικού αίματος μπορεί να ληφθεί στην ίδια επίσκεψη πριν την έγχυση της ένεση RhIG. Αν και η χορήγηση του εξωγενούς αντι-D τελικά θα οδηγήσει σε ασθενώς θετικό τίτλο, αυτό δεν θα συμβεί στο σύντομο διάστημα αρκετών ωρών λόγω της αργής απορρόφησης από την ενδομυϊκή περιοχή. Μερικοί ειδικοί συνιστούν να δοθεί μια δεύτερη δόση RhIG εάν δεν έχει χορηγηθεί μεχρι την 40 εβδομάδα κύησης.

A.5.5 Διαγνωστική μέθοδος προσδιορισμού μητρικού αντισώματος

Ο μητρικός τίτλος είναι το πρώτο βήμα στην αξιολόγηση του ευαισθητοποιημένου με RhD ασθενούς. Προηγούμενες μεθοδολογίες που χρησιμοποιούν αλβουμίνη ή φυσιολογικό ορό δεν πρέπει πλέον να ασκούνται επειδή εντοπίζουν ποικίλα επίπεδα αντιγόνου IgM. Επειδή η δομή του πενταμερούς αυτής της κατηγορίας αντισώματος δεν επιτρέπει τη διέλευση από τον πλακούντα, η

συμβολή του IgM στην ποσοτικοποίηση του τίτλου δεν έχει κλινική σημασία. Ο ανθρώπινος τίτλος αντισφαιρίνης (έμμεσος Coombs) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του βαθμού αλλοανοσοποίησης, επειδή μετρά την απόκριση της μητρικής IgG.

A.5.5.1 Δοκιμασίες *In Vitro*

Επειδή οι μετρήσεις του μητρικού αντι-D ήταν κακοί ως προγνωστικός παράγοντας της HDFN, υπήρξε έντονο ενδιαφέρον για *in vitro* δοκιμασίες που θα μπορούσαν να προβλέψουν καλύτερα την εμβρυϊκή ασθένεια μιμούμενοι την καταστροφή των ερυθρών κυττάρων που συμβαίνει στο έμβρυο (118, 119). Τυπικά, στο μητρικό ορό που περιέχει αντι-D τα κυτταρικά αντισώματα αναμιγνύονται με ενηλίκων ερυθροκυττάρων για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Αυτά τα ευαισθητοποιημένα ερυθροκύτταρα στη συνέχεια συνδυάζονται με διάφορους τύπους δικτυοενδοθηλιακών κυττάρων, όπως μακροφάγα, μονοκύτταρα ή λεμφοκύτταρα. Ο βαθμός αιμόλυσης ή ενεργοποίησης των ερυθροκυττάρων των δικτυοενδοθηλιακών κυττάρων στη συνέχεια ποσοτικοποιείται.

Οι τρεις συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες δοκιμασίες είναι η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας που εξαρτάται από αντίσωμα (ADCC), η δοκιμασία μονοστιβάδας μονοκυττάρου και η δοκιμή χημειοφωταύγειας μονοκυττάρων. Στην ανάλυση ADCC, η απελευθέρωση χρωμίου (120) από ευαισθητοποιημένα ερυθροκύτταρα που προηγουμένως επώαστηκαν με αυτό το ισότοπο χρησιμοποιείται ως μέτρο της *in vitro* καταστροφής που προκαλείται από τα μονοκύτταρα. Το ποσοστό των συνολικών μονοκυττάρων που εμπλέκονται στην προσκόλληση ή τη φαγοκυττάρωση των ερυθρών κυττάρων εκτιμάται με μικροσκοπική εξέταση στην δοκιμασία μονοστιβάδας μονοκυττάρου. Ο προσδιορισμός χημειοφωταύγειας χρησιμοποιεί τη φωτοδραστικότητα της λουμινόλης, μιας ένωσης που παράγει φως καθώς αντιδρά με ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που απελευθερώνονται από τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα.

Οι δοκιμασίες αυτές δεν έχουν ευρεία χρήση στις Ηνωμένες Πολιτείες, αν και χώρες όπως η Ολλανδία χρησιμοποιούν συστηματικά την ADCC σε μια κεντρική τοποθεσία (κεντρικό εργαστήριο του Ολλανδικού Ερυθρού Σταυρού) για να αποφασίσουν πότε πρέπει να προχωρήσουν σε επεμβατικές δοκιμές στο έμβρυο.

A.5.5.2 Ταυτοποιώντας το Εμβρυικό αίμα μέσω της γενετικής

Το πατρικό ζυγωτικό παίζει σημαντικό ρόλο στη διαχείριση της ερυθροκυττάρο-αλλοανοσοποιημένης κύησης. Σε περιπτώσεις ετερόζυγου παθολογικού γονότυπου, το 50% των εμβρύων δεν θα εκφράσει το εμπλεκόμενο αντιγόνο ερυθροκυττάρων και συνεπώς θα ξεφύγει από τις αιμολυτικές επιδράσεις του μητρικού αντι-ερυθροκυτταρικού αντισώματος. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μπορούν να εξαλειφθούν περαιτέρω δοκιμασίες για τη μητέρα και το έμβρυο.

Επειδή τα αντιγόνα RhC/c και RhE/e κληρονομούνται με τρόπο στενά συνδεδεμένο με τον RhD, οι αντιοροί για αυτά τα αντιγόνα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με πίνακες γονιδιακής συχνότητας, με βάση την εθνικότητα για να προσδιοριστεί η παθολογική ζυγότητα στον τόπο RhD. Το μαθηματικό μοντέλο θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για να τροποποιήσει τη συχνότητα εμφάνισης ετεροζυγωτίας με βάση το πατρικό ιστορικό προηγούμενου απογόνου RhD⁺ (121).

Ως παράδειγμα, ένας λευκός συνεργάτης του οποίου τα αποτελέσματα ορολογικού ελέγχου δείχνουν φαινότυπο Dce και ο οποίος δεν έχει ιστορικό ενός απογόνου RhD⁺, έχει 94% πιθανότητα να είναι ετερόζυγος. Μια ιστορία επαναλαμβανόμενων απογόνων RhD⁺, ωστόσο, θα μείωνε σημαντικά την πιθανότητα μιας ετεροζυγωτικής κατάστασης. Η εθνικότητα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό της πιθανότητας ετεροζυγωτικότητας, διότι μπορεί να παρατηρηθούν διαφορετικά αποτελέσματα με παρόμοια ορολογικά ευρήματα.

Η άμεση δοκιμασία ζυγώσεως σε πατέρα είναι τώρα διαθέσιμη μέσω ποσοτικών τεχνικών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Οι εντάσεις σήματος PCR των εξονίων 5 και 7 της RHD συγκρίνονται με γονίδια εσωτερικού ελέγχου (εξόνιο 7 των γονιδίων RHCE) για τον προσδιορισμό των ετερόζυγων ή ομοζυγωτικών πατρικής κατάστασης για το γονίδιο RHD. Η δοκιμασία έχει επίσης αποδειχθεί αποτελεσματική στην ανίχνευση του ψευδογόνου RhD.

Το 1993 εξετάζονται για πρώτη φορά τα αμνιοκύτταρα, όπου έχουν γίνει η κύρια πηγή που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή του τύπου αίματος εμβρύου σε περιπτώσεις ετερόζυγου γονότυπου του πατέρα (122, 123). Η αμνιοπαρακέντηση για την ανίχνευση του τύπου αίματος εμβρύου αξιολογεί τον εμβρυϊκό γονότυπο αντί του

εμβρυϊκού φαινοτύπου, που είναι η έκφραση του RhD αντιγόνου στα ερυθροκύτταρα του εμβρύου όπως προσδιορίζεται από την ορολογία.

Η ορολογική εμβρυϊκή ερυθροκυτταρική τυποποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί στο αίμα που λαμβάνεται με FBS κατευθυνόμενο με υπερηχογράφημα, αλλά αυτή η τεχνική σχετίζεται με ρυθμό περιγεννητικής απώλειας τουλάχιστον τετραπλάσια από ότι με την αμνιογένεση. Η εκτεταμένη εμπειρία με τη χρήση της αμνιοκέντησης για τον προσδιορισμό του τύπου αίματος εμβρύου έχει αποκαλύψει σπάνιες αποκλίσεις. Στην περίπτωση ενός αποτελέσματος DNA που αποκαλύπτει ένα RhD-fetus όταν το έμβρυο είναι RhD + με ορολογία, οι συνήθεις τεχνικές επιτήρησης δεν θα χρησιμοποιηθούν και μπορεί να προκύψει απώλεια εμβρύου. Σε μια σειρά 500 αμνιοκέντεων, αυτό συνέβη σε 1,5% των περιπτώσεων (124). Εκτός από την εσφαλμένη πατρότητα, η πιο πιθανή αιτιολογία αυτής της ασυνέπειας είναι μια αναδιάταξη στην πατρική γονιδιακή θέση του γονιδίου RhD. Τέτοιες αναδιαρθρώσεις έχουν τεκμηριωθεί σε περίπου 2% των ατόμων (125, 126).

Ο έλεγχος του πατρικού αίματος, η πηγή του γονιδίου RhD του εμβρύου, με τους ίδιους εκκινητές PCR που χρησιμοποιούνται στο αμνιακό υγρό, επιβεβαιώνει ότι η αναδιάταξη γονιδίων δεν αποτελεί πιθανή πηγή σφάλματος. Για το λόγο αυτό, τα περισσότερα εργαστήρια που πραγματοποιούν τυποποίησης ερυθροκυττάρων εμβρύου στο αμνιακό υγρό απαιτούν συνοδευτικό δείγμα πατρικού αίματος. Η πολυπλεξία PCR, η οποία στοχεύει τουλάχιστον δύο διαφορετικά εξόνια του γονιδίου RhD, χρησιμοποιείται από πολλά κέντρα για να μειώσει την πιθανότητα μη ανίχνευσης μιας αναδιάταξης γονιδίων.

Σε περιπτώσεις όπου δεν διασφαλίζεται η πατρότητα ή δεν υπάρχει συνεργάτης για την αποστολή δείγματος αίματος για επιβεβαίωση των εκκινητών PCR, το αποτέλεσμα ενός τύπου αίματος RhD- εμβρύου που πραγματοποιείται με αμνιοκέντηση πρέπει να θεωρείται ύποπτο. (127).

Σε καταστάσεις αμφισβητήσιμης πατρότητας, ένας επαναλαμβανόμενος τίτλος μητρικής αντιγλοβουλίνης θα πρέπει να λαμβάνεται 4 έως 6 εβδομάδες μετά τα αποτελέσματα της αμνιοκέντησης ως επιβεβαιωτική στρατηγική. Εάν παρατηρηθεί τετραπλή αύξηση του τίτλου αντισώματος, τότε θα πρέπει να αμφισβητηθεί ένα αποτέλεσμα RhD-PCR στο αμνιακό υγρό. Επαναλαμβάνεται η αμνιοκέντηση για να αξιολογηθεί η φασματική ανάλυση του αμνιακού υγρού στα 450

nm (ΔOD450) ή FBS για τον προσδιορισμό της κατάστασης RhD του εμβρύου χρησιμοποιώντας ορολογικές τεχνικές.(128)

Εάν η μητρική εθνικότητα είναι μαύρη, τότε πρέπει να αποκλειστεί η παρουσία ενός μητρικού ψευδογόνου. Σε αυτήν την περίπτωση, η έγκυος ασθενής η οποία είναι RhD- σε ορολογικό έλεγχο, αλλά υπάρχει ολόκληρο το γονίδιο RhD ως ψευδογονίδιο, το έμβρυο όπου και κληρονομεί ένα από τα γονίδια RhD από τη μητέρα, η PCR από αμνιοπαρακέντηση θα έδινε ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα - δηλαδή, το έμβρυο θα ήταν RhD+ με έλεγχο γονοτύπου αλλά RhD- με ορολογία. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε περιττή παρέμβαση με τους εγγενείς κινδύνους. Για το λόγο αυτό, ένα δείγμα μητρικού αίματος θα πρέπει επίσης να συνοδεύει το αμνιακό υγρό που αποστέλλεται για εμβρυϊκό έλεγχο RhD, σε μια προσπάθεια να αποκλειστεί η παρουσία ενός μητρικού ψευδογόνου RhD. Εάν το μητρικό δείγμα είναι θετικό για αυτό παραλλαγή, τότε θα πρέπει να πραγματοποιηθεί και έλεγχος εμβρύου για το ψευδογενές.

Η βιοψία των χοριακών λαχνών έχει χρησιμοποιηθεί για την τυποποίηση των εμβρυϊκών ερυθροκυττάρων, αλλά αυτή η τεχνική πρέπει να αποθαρρύνεται σε ασθενείς που επιθυμούν να συνεχίσουν την εγκυμοσύνη τους σε περίπτωση που το έμβρυο είναι RhD +. Η διαταραχή των χοριακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει σε FMH και αύξηση του μητρικού τίτλου, επιδεινώνοντας έτσι την εμβρυϊκή νόσο.

Η μη επεμβατική εμβρυϊκή εξέταση για το γονίδιο RhD έχει σήμερα ευρεία κλινική χρήση στην Ευρώπη και πρόσφατα έχει γίνει διαθέσιμη στη Βόρεια Αμερική (129). Το εμβρυϊκό DNA χωρίς κύτταρα είναι γνωστό ότι υπάρχει στην μητρική κυκλοφορία ήδη από την 38η ημέρα της κύησης. με βάση τον όρο, συνθέτει το 6% της συνολικής δεξαμενής DNA (130-133). Η πηγή αυτού του DNA πιστεύεται ότι είναι απόπτωση των τροφοβλαστών του πλακούντα. αυτό θα συνεπαγόταν τον σχετικά βραχύ χρόνο ημιζωής, ο οποίος μετράται σε λεπτά μετά την παράδοση. Είναι μια ελκυστική πηγή προγεννητικής διάγνωσης, διότι δεν θα πρέπει να υπάρχει υπολειμματικό εμβρυϊκό DNA από προηγούμενες κήσεις (134, 135). Η χρήση του ελεύθερου DNA για τον προσδιορισμό του status of RhD του εμβρύου αναφέρθηκε αρχικά από τον Lo και τους συνεργάτες του το 1998 (136, 137). Από τότε έχουν εμφανιστεί πολυάριθμες αναφορές στην γραφή. Οι Geifman-Holtzman και

συνεργάτες(138, 139) συνέταξαν αναφορές περισσότερων από 2000 ασθενών για τους οποίους η κατάσταση του εμβρυϊκού RhD προσδιορίστηκε από το ελεύθερο DNA στο μητρικό πλάσμα, με ακρίβεια 97%. Ένα μόνο κέντρο στις Κάτω Χώρες έχει αναφέρει ακρίβεια 99,4% σε περισσότερες από 1200 περιπτώσεις (140, 141). Η μη επεμβατική τυποποίησης RhCc, RhE και Kell εμβρύου είναι τώρα διαθέσιμη σε ορισμένα ευρωπαϊκά κέντρα χρησιμοποιώντας επίσης ελεύθερο εμβρυϊκό DNA.(142)

A.5.6 Αιμολυτική Νόσος του εμβρύου και του νεογέννητου που προκαλούνται από μη-RhD αντισώματα

Περισσότερα από 50 διαφορετικά αντιγόνα ερυθροκυττάρων έχουν αναφερθεί ότι σχετίζονται με HDFN. Ωστόσο, τα αντισώματα που συσχετίζονται συχνά με σοβαρή HDFN φαίνεται ότι περιλαμβάνουν αντισώματα έναντι των RhD, Rhc και Kell (K1). Σε μια έρευνα από τη Μανιτόπα του Καναδά, που πραγματοποιήθηκε τα έτη 1962 έως 1988, συσσωρεύτηκαν 1022 περιπτώσεις αλλοανοσοποίησης χωρίς RhD (143, 144). Μόνο το αντι-c συσχετίστηκε με σοβαρή HDFN που κατέληξε σε υδρόφοβη θνησιμότητα ή χρειάστηκε IUT. Το αντι-c οδήγησε σε διπλάσια και επταπλάσια αύξηση της αιμολυτικής νόσου σε σύγκριση με αντισώματα αντι-K1 και αντι-E, αντίστοιχα. Τα αντισώματα αντι-c και αντι-K1 ήταν εξίσου πιθανόν να συνδέονται με την ανάγκη μετάγγισης ανταλλαγής νεογνών ή φωτοθεραπείας, το αντι-E ήταν κατά το ήμισυ πιθανότερο να απαιτεί νεογνική θεραπεία. Ένας επιλεγμένος πληθυσμός 22 ασθενών αναφέρθηκε από το εξωτερικό της Manitoba κατά την ίδια χρονική περίοδο (143, 144). Αντισώματα κατά των ακόλουθων αντιγόνων συσχετίστηκαν με την ανάγκη για IUTs: K1 (n = 9), k (1), c (7), cE (1), Fy^a (1), Jk^a (1), CC^w (1) και E (1). Σε μια σειρά από 258 εγκυμοσύνες που διαχειρίστηκαν με IUTs σε ένα εθνικό κέντρο παραπομπής στις Κάτω Χώρες από το 1988 έως το 2001, το 85% των περιστατικών αφορούσε αλλοανοσοποίηση RhD (145, 146). Το δέκατο ποσοστό των περιστατικών αφορούσε αντι-K1 και το 3,5% αντι-c, αντι-RhE, αντι-Rhc και αντι-Fya συνδέθηκαν το καθένα με μία μόνο περίπτωση.

Τα αντισώματα στα αντιγόνα των ερυθροκυττάρων Lewis, I και P συναντώνται συχνά μέσω της αντίχνευσης αντισωμάτων κατά τη διάρκεια της

προγεννητικής φροντίδας. Επειδή αυτά τα αντισώματα είναι τυπικά της κατηγορίας IgM, δεν συνδέονται με HDFN.(147)

A.5.6.1 *Αντι-Rhc*

Το αντίσωμα αντι-c έχει συσχετιστεί με σοβαρό HDFN παρόμοιας έκτασης με αυτό που προκαλείται από το αντι-D. Σε μία σειρά, περισσότεροι από τις μισές εγκύους ασθενείς είχαν ιστορικό προηγούμενης μετάγγισης αίματος (148, 149). Έρευνα που πραγματοποιήθηκε στις ΗΠΑ, σε μια σειρά από 177 εγκυμοσύνες παρουσιάστηκε 1 νεογνική θανάτωση με διάγνωση εμβρυϊκού ύδρωπα και 11 άλλα βρέφη που απαιτήθηκε μεταγγίσεις ανταλλαγής. Ο Wenk και οι συνεργάτες (150) ανέφεραν 70 περιπτώσεις μητρικής ανοσοανοσοποίησης σε Rhc με ένα γνωστό c-αντιγόνο θετικό βρέφος. Οκτώ περιπτώσεις οδήγησαν σε νεκροφόρους ή σε περιγεννητικούς θανάτους, το 26% των περιπτώσεων είχε ήπιο HDFN και δεν χρειάστηκε μεταγγίσεις μετά τη γέννηση και ένα επιπλέον 29% είχε μέτρια HDFN που απαιτούσε θεραπεία μετάγγισης. Ο Kozlowski και οι συνάδελφοι(151) ανέφεραν ότι, μεταξύ 100 νεογνών που είχαν θετικό αντίκτυπο σε c-αντιγόνο και είχαν γεννηθεί σε αλλοανοσοποιημένους τοκετούς, μόνο μία εγκυμοσύνη χρειάστηκε IUTs, ενώ το 14% των νεογνών χρειάστηκε μεταγγίσεις νεογνού. Τέλος, οι Hackney και συνεργάτες (152) διαπίστωσαν ότι 25% των εμβρυϊκών θετικών ως προς το αντιγόνο c εμφάνισαν σοβαρή HDFN. Το 7% της συνολικής ομάδας παρουσίασαν εμβρυϊκό ύδρωπα και το 17% απαιτούσε IUTs.

A.5.6.2 Αντι-RhC, -RhE και -Rhe

Τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων ρέζους C, E και e συνήθως βρίσκονται ως χαμηλός τίτλος σε συνδυασμό με αντι-RhD αντίσωμα (για παράδειγμα, αντι-D 128, με αντι-C 2). Η παρουσία τους μπορεί να είναι προσθετική στην αιμολυτική επίδραση του αντι-D στο έμβρυο (153). Οι IUTs αναφέρονται μόνο σπάνια όταν αυτά τα αντισώματα εμφανίζονται ως το μοναδικό εύρημα (146, 154). Η Joy και οι συνεργάτες του (155) ανέφεραν 32 εγκυμοσύνες αλλοανοσοποιημένες αποκλειστικά σε RhE, 15% των απογόνων σημειώθηκαν ότι έχουν ενδείξεις εμβρυϊκής ή νεογνικής αναιμίας. ένα έμβρυο διαγνώστηκε με εμβρυϊκό ύδρωπα

A.5.6.3 Αντι-RhG

Σε ορισμένες ασθενείς, οι τίτλοι αντι-D και αντι-C παρατηρούνται ότι είναι ίσοι εναλλακτικά, η τιμή του τίτλου αντι-C μπορεί στην πραγματικότητα να υπερβαίνει εκείνη του αντι-D (για παράδειγμα, αντι-D 128, με αντι-C 256). Σε αυτές τις περιπτώσεις, κάποιος πρέπει να υποψιάζεται την παρουσία αντι-RhG. Πρέπει να διεξάγεται διαβούλευση με παθολογοανατόμο και την αιμοδοσία για να διευκρινιστεί εάν υπάρχει αντι-RhG. Προηγούμενες αναφορές περιστατικών έδειξαν ότι το αντι-G σχετίζεται με ήπιο HDFN. Ωστόσο, ένας υψηλός τίτλος μπορεί να συσχετιστεί με σημαντική νόσου του εμβρύου που απαιτεί IUT(156). Οι εμβρυϊκές διαδικασίες υποδεικνύονται, RhIG θα πρέπει να χορηγείται για να αποφευχθεί ο σχηματισμός αντι-D.

A.5.6.4 Αντι- K (K1)

Το σύστημα αντιγόνων ερυθροκυττάρων Kell περιλαμβάνει 23 διαφορετικά μέλη. Τα μεμονωμένα αντιγόνα στο σύστημα προσδιορίζονται με το όνομα, τη συντομογραφία ή τον αριθμό. Αντισώματα σε τουλάχιστον εννέα από τα αντιγόνα έχουν συσχετιστεί με HDFN. Τα πιο κοινά από αυτά είναι τα Kell (K, ή K1) και Cellano (k, ή K2). Πρόσθετα αντισώματα που έχουν αναφερθεί ότι προκαλούν HDFN περιλαμβάνουν αντι-Penny (Kp^a, ή K3), -Rautenberg (Kp^b ή K4), -Peltz (Ku, ή K5), -Sutter (Js^a ή K6) Matthews (Js^b, ή K7), -Καρουλά (U1^a ή K10) και -K22.(157)

Το αντιγόνο K1 βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα του 9% των λευκών και του 2% των μαύρων, ενώ ουσιαστικά όλα τα αντιγόνα θετικά άτομα είναι ετεροζυγικά. Σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε στις ΗΠΑ, το αντίσωμα Kell ανιχνεύθηκε σε 127 από 127.076 εγκυμοσύνες, λόγω όμως της χαμηλής συχνότητας των γονιδίων, μόνον 13 περιπτώσεις είχαν ως αποτέλεσμα τα Kell+ έμβρυα (158). Παρατηρήθηκε εμβρυϊκός ύδροπας σε τέσσερις περιπτώσεις τρία από αυτά τα βρέφη παρουσίασαν εμβρυϊκό ή νεογνικό θάνατο. Οι Bowman και οι συνεργάτες του (159) μετά από 46ετή εμπειρία σε Kell- αλλοανοσοποιημένες εγκυμοσύνες σε 311 γυναίκες 14% από αυτές τις εγκυμοσύνες τελείωσαν σε αυθόρμητες ή επαγόμενες αποβολές, 82% οδηγήθηκαν σε νεογνά Kell ή σε βρέφη χωρίς κλινική ασθένεια. Σε μια σειρά παραπομπών από 16 εγκυμοσύνες που εμφανίστηκαν μεταξύ 1970 και 1985, οι συγγραφείς ανέφεραν ποσοστό περιγεννητικής θνησιμότητας 67% πριν από την εμφάνιση της IVT, σε σύγκριση με ποσοστό 10% μετά την έναρξη της χρήσης αυτής της τεχνικής.

A.5.6.5 Anti-M

Το αντι-M είναι ένα φυσικώς απαντώμενο αντίσωμα IgM που συνήθως παρουσιάζεται ως ψυχρή συγκολλητίνη. Ένας τύπος IgG μπορεί να συμβεί σπάνια και μπορεί να συσχετιστεί με HDFN. Συνολικά έξι ασθενείς με σοβαρή HDFN έχουν αναφερθεί στην αγγλική βιβλιογραφία. Η πρώτη περίπτωση αφορούσε τίτλο μητρικού αντι-M λευκωματίνης 1/1000 σε συνδυασμό με υδρόφοβο εμβρυϊκό θάνατο σε ένα δίδυμο και την ανάγκη ανταλλαγής μεταγγίσεων στον αδελφό (160). Μία δεύτερη ασθενής με τίτλο 1/2048 σημειώθηκε να έχει ιστορικό τεσσάρων εμβρυϊκών θανάτων (161). Οι Matsumoto και συνεργάτες (162) ανέφεραν μία ασθενή που είχε βιώσει τρεις απώλειες εμβρύου σε συνδυασμό με μητρικό τίτλο anti-M 1/1024. Οι Furukawa και συνεργάτες του (163) ανέφεραν μία ασθενή με ιστορικό τριών περιγεννητικών απωλειών. Ένα επιτυχημένο αποτέλεσμα επιτεύχθηκε στην μια τέταρτη εγκυμοσύνη μετά από εντατική πλασμαφαίρεση για να θεραπεύσει έναν τίτλο 1/4096, το βρέφος απαιτούσε μόνο φωτοθεραπεία. Ο Duguid και οι συνεργάτες (164) περιέγραψαν μία ασθενή με τίτλο 1/16 οι οποίοι έκαναν γέννηση σε ένα παιδί που απαιτούσε φωτοθεραπεία και ανταλλαγή μετάγγισης. Οι Kanra και συνεργάτες του (165) διερεύνησαν μία ασθενή η οποία είχε υποστεί επτά εγκυμοσύνες με απώλειες που σημειώθηκαν μεταξύ 10 και 33 εβδομάδων κύησης δευτερογενώς προς το θάνατο ή το νεογνικό θάνατο, πέντε από αυτές τις εγκυμοσύνες συσχετίστηκαν με το εμβρυϊκό ύδρωπα. Έγινε ανίχνευση μητρικού αντι-M τίτλου 1/512, αν και υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με την αξιολόγηση των νεογνών.

Ο De Young-Owens και οι συνάδελφοί του (166) επανεξέτασαν με βάση την 26 ετή εμπειρία στο ίδρυμα τους και σημείωσαν αντίσωμα αντι-M σε 115 εγκυμοσύνες σε 90 γυναίκες. Ανέφεραν μια τριπλάσια έως επταπλάσια αυξημένη ανίχνευση αντι-M κατά τη διάρκεια της περιόδου της μελέτης. Οι εξηγήσεις που προσφέρονται για την αυξανόμενη συχνότητα περιελάμβαναν μια μεταβολή της τεχνικής διαλογής αντισωμάτων από αλβουμίνη σε αιθυλενογλυκόλη και την προσθήκη ερυθροκυττάρων δείκτη ομόζυγου για το αντιγόνο M, ο τίτλος της αντισφαιρίνης ήταν μικρότερος από 1/4 στο 90% των περιπτώσεων. Ωστόσο, τα έμβρυα σημειώθηκαν αρνητικά για το αντιγόνο M σε τέσσερις από αυτές τις πέντε περιπτώσεις, στην πέμπτη περίπτωση, η κατάσταση του αντιγόνου M του εμβρύου ήταν άγνωστη.

Αυτά τα δεδομένα οδήγησαν τον De Young-Owens και τους συναδέλφους (166) να συμπεράνουν ότι εάν δεν υπάρχει προηγούμενο ιστορικό μίας επηρεασμένης εγκυμοσύνης, ένας αρχικός τίτλος 1/4 ή μικρότερος δεν απαιτεί περαιτέρω αξιολόγηση. Εάν ο τίτλος είναι μεγαλύτερος από 1/4 ή υπάρχει ιστορικό προηγούμενου εμβρύου ή βρέφους, θα πρέπει να υπάρχει παρακολούθηση του τίτλου του αντισώματος κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης.

A.5.6.6 Anti-S

Σε μία σειρά 175.000 κήσεων κατά τη διάρκεια μιας πενταετούς περιόδου στην περιοχή της Οξφόρδης της Αγγλίας, ανιχνεύθηκε αντι-S αντίσωμα σε 22 εγκυμοσύνες σε 19 γυναίκες. Οι προηγούμενες μεταγγίσεις θεωρήθηκαν πιθανή πηγή ευαισθητοποίησης σε 13 ασθενείς. Μια θετική άμεση ανάλυση Coombs σημειώθηκε μόνο σε τέσσερις περιπτώσεις, ένα βρέφος χρειάστηκε μετάγγισης. Οι περισσότερες περιπτώσεις HDFN που περιγράφονται στη βιβλιογραφία περιλαμβάνουν ήπια νεογνική ασθένεια

A.5.6.7 Anti-N

Έχει αναφερθεί μία περίπτωση ήπιας HDFN που σχετίζεται με αντι-N, η οποία απαιτούσε μόνο φωτοθεραπεία (167).

A.6 Ανίχνευση αντισωμάτων, ταυτοποίηση αντισωμάτων και ορολογική συμβατότητα.

A.6.1 Ανίχνευση αντισωμάτων στα Ερυθροκύτταρα ΙΑΤ

Ομάδα Ο ερυθροκύτταρα κατάλληλα για διαλογή αντισωμάτων είναι εμπορικά διαθέσιμα και προσφέρονται ως σετ είτε δύο ή τριών φιαλιδίων ερυθρών κυττάρων ενός δότη. Τα συγκεντρωμένα κύτταρα ανίχνευσης αντισωμάτων (συνήθως από δύο δότες) μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο για τη δοκιμή δειγμάτων ορού από δότες.

Η απόφαση χρήσης δύο ή τριών κυττάρων σε μια δοκιμασία ανίχνευσης αντισωμάτων πρέπει να βασίζεται σε περιστάσεις σε κάθε μεμονωμένο εργαστήριο. Τα ερυθροκύτταρα του αντιδραστήριου επιλέγονται για να εκφράζουν τα αντιγόνα που σχετίζονται με τα συνηθέστερα αντιμετωπιζόμενα αντισώματα. Τα κύτταρα αντι-παράγοντα, έχουν λάβει άδεια από τη διοίκηση τροφίμων και φαρμάκων (FDA) για το σκοπό αυτό πρέπει να εκφράζουν τα ακόλουθα αντιγόνα: D, C, E, c, e, M, N, S, s, P1, Lea, Leb, K, k, Fya, Fyb, Jka και Jkb.⁴ Ορισμένα ασθενώς αντιδραστικά αντισώματα αντιδρούν μόνο με ερυθροκύτταρα από δότες οι οποίοι είναι ορμονικοί για τα γονίδια που ελέγχουν την έκφραση αυτών των αντιγόνων, ένα ορολογικό φαινόμενο που ονομάζεται εξάρτηση από τη δόση. Τα αντισώματα στα συστήματα Rh, Duffy, MNS και Kidd δείχνουν συχνότερα δοσολογία. Τα ερυθροκύτταρα του αντιδραστήριου θα πρέπει να ψύχονται όταν δεν χρησιμοποιούνται και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για ανίχνευση αντισωμάτων μετά την ημερομηνία λήξης τους.

A.6.2 Πίνακες ταυτοποίησης αντισωμάτων

Η ταυτοποίηση ενός αντισώματος σε αντιγόνο ερυθροκυττάρων απαιτεί τον έλεγχο του ορού έναντι ενός πίνακα επιλεγμένων δειγμάτων ερυθροκυττάρων με γνωστή σύνθεση αντιγόνου για τις κύριες ομάδες αίματος. Συνήθως, λαμβάνονται από εμπορικούς προμηθευτές, αλλά τα ιδρύματα μπορούν να συγκεντρώσουν τα δικά τους χρησιμοποιώντας ερυθροκύτταρα από τοπικές πηγές. Τα στοιχεία των πάνελ είναι (εκτός από ειδικές περιπτώσεις) ομάδα O, επιτρέποντας τον ορό οποιασδήποτε ομάδας ABO που θα εξεταστεί.

Κάθε κελί του πίνακα είναι από ένα διαφορετικό άτομο. Τα κύτταρα επιλέγονται έτσι ώστε, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα κύτταρα, ένα διακριτικό πρότυπο θετικής και αρνητικής αντίδρασης, υπάρχουν για κάθε ένα από τα πολλά αντιγόνα. Για να είναι λειτουργικό, ένα αντιδραστήριο ερυθροκυτταρικού πίνακα πρέπει να επιτρέπει την ταυτοποίηση με ταυτοσημία αυτών των κλινικά σημαντικών αλλοαντισωμάτων που απαντώνται συχνότερα, όπως τα αντι-D, -E, -K και -Fya. Οι φαινότυποι των ερυθροκυττάρων του αντιδραστήριου θα πρέπει να διανέμονται έτσι ώστε να μπορούν να αναγνωρίζονται με σαφήνεια οι μοναδικές ιδιαιτερότητες των κοινών αλλοαντισωμάτων και οι περισσότεροι να αποκλείονται. Ιδανικά, το σχήμα της αντιδραστικότητας για τα περισσότερα παραδείγματα μονών αλλοαντισωμάτων

δεν θα επικαλύπτεται με κανένα άλλο. π.χ., όλα τα δείγματα K + δεν πρέπει να είναι τα μόνα που είναι επίσης E +. Μπορεί επίσης να είναι πολύτιμο να περιληφθούν δείγματα ερυθροκυττάρων με διπλή δόση του εν λόγω αντιγόνου για αντισώματα που συχνά εμφανίζουν δοσολογία. Για να μειωθεί η πιθανότητα ότι μόνο η τύχη προκάλεσε ένα προφανώς οριστικό πρότυπο, πρέπει να υπάρχει ένας επαρκής αριθμός δειγμάτων ερυθροκυττάρων που δεν διαθέτουν και επαρκή δείγματα ερυθροκυττάρων που να εκπέμπουν τα περισσότερα από τα αντιγόνα που παρατίθενται.

Εμπορικά προετοιμασμένα πάνελ εκδίδονται γενικά κάθε 2 έως 4 εβδομάδες. Κάθε πίνακας περιέχει διαφορετικά δείγματα ερυθροκυττάρων με διαφορετικά μοτίβα αντιγόνου, γι 'αυτό είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσετε το φύλλο καταχώρησης φαινοτύπου που συνοδεύει τον χρησιμοποιούμενο πίνακα. Τα εμπορικά κύτταρα συνήθως εμφανίζονται ως εναιώρημα 2% έως 5% σε ένα συντηρητικό μέσο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας από το φιαλίδιο. Το πλύσιμο γενικά δεν είναι απαραίτητο εκτός εάν τα μέσα στα οποία αναστέλλονται τα κύτταρα αντιδραστηρίων είναι ύποπτα ότι παρεμβαίνουν στην ταυτοποίηση του αλλοαντιδραστικού. Τα στοιχεία του πίνακα δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά την ημερομηνία λήξης. Ωστόσο, αυτό δεν είναι πάντα πρακτικό. Οι περισσότεροι ορολόγοι χρησιμοποιούν επικαιροποιημένα κύτταρα αντιδραστηρίων για τα αρχικά πάνελ ανίχνευσης αντισωμάτων και, εάν είναι απαραίτητο, χρησιμοποιούν εκπεμπόμενα κύτταρα αντιδραστηρίων για αποκλεισμό ή επιβεβαίωση της ιδιαιτερότητας. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καταρτίζει και να επικυρώνει μια πολιτική για τη χρήση των κυττάρων επανενεργοποίησης που έχουν λήξει.

A.6.3 Αντιδραστήρια αντισφαιρίνης DAT

Για την ανίχνευση κλινικά σημαντικών αντισωμάτων, οι περισσότερες δοκιμασίες προσδιορισμού αντισωμάτων περιλαμβάνουν μια φάση αντισφαιρίνη. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε πολυειδικά είτε IgG-αντιδραστήρια αντισφαιρίνης. Τα πολυειδικά αντιδραστήρια μπορούν να ανιχνεύουν ή να ανιχνεύουν πιο εύκολα τα αντισώματα που δεσμεύουν το συμπλήρωμα. Αυτό μπορεί να έχει αξία στην ανίχνευση ορισμένων αντισωμάτων Kidd.⁶ Αν και αυτό μπορεί να είναι επωφελές σε μερικές περιπτώσεις, πολλοί ορολόγοι προτιμούν να χρησιμοποιούν αντιδραστήρια ειδικά για την IgG για να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη αντιδραστικότητα

που προκύπτει από την *in-vitro* συμπλήρωση της πρόσδεσης, αντιδραστικά αντισώματα.

B. Ειδικό Μέρος

B.1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης αυτής ήταν η καταγραφή των συχνότερων άλλο-αντισωμάτων κατά την κύηση ανεξαρτήτου Rh της μητέρας για να εξεταστεί το ενδεχόμενο της εξέτασης ανίχνευσης άλλο-αντισωμάτων Έμμεση Coombs (IAT)-στις εγκύους ως προγεννητικός έλεγχος ρουτίνας. Τα αποτελέσματα πιθανά να συμβάλλουν στην αποφυγή ανεπιθύμητων συμβάντων κατά την διάρκεια της κύησης και έπειτα του νεογνού.

B.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.2.1 Υλικά

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την Γυναικολογική-Μαιευτική κλινική ΡΕΑ. Η συλλογή των στοιχείων από τα αρχεία της κλινικής αφορά στα έτη 2014 έως 2017.

Συνολικά εξετάστηκαν τα δεδομένα από 6700 έγκυες που προσήλθαν στην κλινική για τοκετό και των νεογνών τους.

Η λήψη του γυναικολογικού - μαιευτικού ιστορικού των εγκύων πραγματοποιήθηκε από το νοσηλευτικό προσωπικό του ιδρύματος. Περιλαμβάνει την καταγραφή των ολοκληρωμένων κύσεων, καθώς επίσης και τις αυτόματες και τεχνητές εκβολές αλλά και τη γέννηση νεκρού εμβρύου. Επιπλέον συμπεριλήφθηκε το ιστορικό μετάγγισης, αιμολυτικής νόσου του εμβρύου - νεογνού σε προηγούμενες κυήσεις και τέλος για στις Rh αρνητικές γυναίκες, η χορήγηση προφυλακτικής υπεράνοσης Rh γ-σφαιρίνη (RhIgG) την 28η εβδομάδα, όπως συστήνεται από την πλειοψηφία των διεθνών οδηγιών για την πρόληψη της RH-D αλλοανοσοποίησης.

B.2.2 Μεθοδολογία

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κλασική ορολογική μέθοδος για τον προσδιορισμό των ομάδων αίματος και του RhD που βασίζεται σε αντιδράσεις άμεσης

αιμοσυγκόλλησης μεταξύ των αντιγόνων και των αντισωμάτων. Συγκεκριμένα ο προσδιορισμός των ομάδων αίματος ABO, RhD, Rh φαινοτύπων και Kell έγινε με την χρήση καρτών μικροσφαιριδίων. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι εύκολη και ευαίσθητη και βασίζεται στην αρχή, ότι ερυθροκύτταρα με το αντιγόνο που μελετάτε κάθε φορά, συγκολλούνται με τα αντίστοιχα αντισώματα, παγιδεύονται στη γέλη του μικροσωληναρίου, εικόνα που πιστοποιεί θετική αντίδραση. Αντίθετα, προκύπτει εικόνα αρνητικής αντίδρασης όταν απουσιάζει το αντιγόνο και τα ερυθροκύτταρα διαπερνούν την γέλη σχηματίζοντας ίζημα στον πυθμένα του μικροσωληναρίου.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν τα δείγματα όλων των γυναικών με την μέθοδο της Έμμεσης δοκιμασίας Coombs (Indirect Antiglobulin Test, IAT). Σε αυτή τη φάση χρησιμοποιήθηκαν ερυθροκύτταρα ελέγχου γνωστού αντιγονικού φαινοτύπου 3 κυττάρων για την ανίχνευση μη αναμενομένων αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων σε δοκιμασία έμμεση Coombs στους 37°C με την μέθοδο καρτών γέλης (screening test). Επί θετικού αποτελέσματος πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια ταυτοποίηση με ερυθροκύτταρα γνωστής αντιγονικής σύνθεσης 11 κυττάρων σε δοκιμασία έμμεσης Coombs στους 37°C με την μέθοδο καρτών γέλης καθώς και έλεγχος ανεύρεσης του τίτλου του άλλο-αντισώματος.

Όσον αφορά στα νεογνά εκτός από τον προσδιορισμό της ομάδας κατά ABO, Rh και του φαινοτύπου, πραγματοποιήθηκε και εξέταση Άμεσης Coombs (DAT). Η μέθοδος της Άμεσης Coombs βασίζεται σε κάρτες με πολυδύναμο αντισφαιρινικό ορό στους 37°C, με την μέθοδο γέλης.

Η μέθοδος της Άμεσης Coombs βασίζεται σε κάρτες μικροσφαιριδίων γέλης με πολυδύναμο αντισφαιρινικό ορό, με την μέθοδο γέλης.

Επίσης τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA και εξετάστηκαν μέσα σε διάστημα 2 ωρών από τη λήψη τους. Συγκεκριμένα τα δείγματα των νεογνών συλλέχθηκαν σε σωληνάριο EDTA από τον ομφάλιο λώρο κατά την διάρκεια του τοκετού. Στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος ζητήθηκε επιβεβαίωση από επιπλέον δείγμα αίματος σε EDTA περιφερικό ή τριχοειδικό του νεογνού.

Τέλος, ο καθορισμός της ομάδας αίματος καθώς και η διαδικασία τόσο της Έμμεσης όσο και της άμεσης Coombs πραγματοποιήθηκαν με χρήση της μεθόδου καρτών μικροσφαιριδίων γέλης δύο εταιρειών. Εκ των οποίων η μια είναι η πλήρως

αυτοματοποιημένη μέθοδος που διεξάγεται στον αυτόματο αναλυτή Innova Ortho Clinical Diagnostics σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας και η άλλη σε κάρτες Diamed.

B.2.2.1 Μέθοδος

- Προσθήκη 1,0 ml από το ID-Diluent 2 σε δοκιμαστικό σωληνάριο.
- Προσθήκη 10ml συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων.
- Ήπια ανάμειξη
- Προσθήκη 50ml εναιωρήματος ερυθροκυττάρων σε κάθε μικροσωληνάριο της ID κάρτας.
- Προσθήκη 25μl από κάθε ένα αντι-D αντίσωμα στο κατάλληλο μικροσωληνάριο της ID κάρτας.
- Επώαση της ID-Card για 15 λεπτά στους 37°C.
- Φυγοκέντρηση της ID-Card για 10 λεπτά στην ID φυγόκεντρο
- Ανάγνωση αποτελεσμάτων

B.2.2.2 Ερμηνεία αποτελεσμάτων

- Αρχή: παρουσία ή μη συγκόλλησης

Θετική αντίδραση: συγκολλημένα κύτταρα σχηματίζουν κόκκινη γραμμή στην επιφάνεια του gel ή συγκολλήσεις διασκορπίζονται μέσα στη γέλη.

Αρνητική αντίδραση: συμπαγές ίζημα ερυθροκυττάρων στον πυθμένα του μικροσωληναρίου.

- Αντιδράσεις για τις ομάδες αίματος του συστήματος ABO

Αντί-A	Αντί-B	Αντί-AB	Ομάδα αίματος
+ έως ++++	Αρνητική	+ έως ++++	A
Αρνητική	+ έως ++++	+ έως ++++	B
+ έως ++++	+ έως ++++	+ έως ++++	AB
Αρνητική	Αρνητική	Αρνητική	O

- Αντιδράσεις για το αντιγόνο του RhD του αντιγονικού συστήματος Rhesus

++++	RhD θετικό
+ έως +++	RhD weak
Αρνητική	RhD αρνητικό

- Αντίδραση για τη μέθοδο άμεσης αντισφαιρίνη (DAT)
 - Θετική αντίδραση (+ έως ++++): τα ερυθροκλύτταρα του νεογνού είναι ευαισθητοποιημένα (συγκόλληση ερυθροκυττάρων με τα μητρικά αντισώματα)
 - Αρνητική αντίδραση: απουσία αντισωμάτων στα ερυθροκύτταρα του νεογνού.

B.3. Στατιστική Ανάλυση

Η ανάλυση των συλλεχθέντων δεδομένων έγινε με χρήση του εξειδικευμένου λογισμικού IBM SPSS Version Statistics 21. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε ως $p < 0.05$.

Γ. Αποτελέσματα

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν από το 2014 έως το 2017 6700 γυναίκες, οι παραπάνω προσήλθαν στην κλινική για τοκετό. Σε όλες πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός ομάδων αίματος κατά ABO και του RhD καθώς και η εξέταση της έμμεσης δοκιμασίας Coombs. Από το σύνολο των εγκύων που ελέγχθησαν ανιχνεύτηκε θετική η δοκιμασία της Έμμεσης Coombs στις 346 εγκύες γυναίκες, εκ των οποίων οι 161 ήταν πρωτότοκες, και από αυτές οι 116 δεν ανέφεραν ιστορικό προηγούμενων αποβολών ή τοκετών (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Επί θετική την Έμμεση Coombs συχνότητα Κύηση* Αποβολές

		ΑΠΟΒΟΛΕΣ		Σύνολο
		ΟΧΙ	ΝΑΙ	
ΚΥΗΣΗ	ΟΧΙ	116	45	161
	ΝΑΙ	151	34	185
Σύνολο		267	79	346

Γ.1 Έγκυες Αρνητικές επί Rh D αντιγόνο

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από το σύνολο των εγκύων με θετική την Έμμεση κατά coombs που ελέγχθησαν, οι 278 ήταν αρνητικές ως προς το Rhesus D αντιγόνο. Από αυτές στις 255 είχε χορηγηθεί υπεράνοση αντι-RhD γ-σφαιρίνη (RhDIgG) για την πρόληψη της ευαισθητοποίησης τους και εμφάνισαν 100% θετικότητα στο αντίσωμα anti-D χωρίς να ανιχνευθεί άλλο αντίσωμα ή να υπάρξει θετικότητα στην Άμεση Coombs των βρεφών τους.

Στις 23 γυναίκες που δεν χορηγήθηκε υπεράνοση αντι-Rhesus D γ-σφαιρίνης (RhDIgG) κατά την διαδικασία της ταυτοποίησης του αντισώματος ανιχνεύτηκαν 7 διαφορετικά αντισώματα Πίνακας 2. Από αυτά, θετικότητα στο anti- D παρουσίασαν 17 δείγματα εκτών οποίων τα 2 δείγματα παρουσίασαν και δεύτερο αντίσωμα. Στο 1 δείγμα παρουσιάστηκε anti D και C ενώ στο δεύτερο παρουσιάστηκε anti D και E, 1

anti-Cw, 1 anti-M, 2 anti-C, 1 anti-K. Τέλος, υπήρξε και 1 δείγμα στο οποίο δεν ταυτοποιήθηκε αλλοαντίσωμα.

Στα νεογνά των γυναικών που δεν πραγματοποιήθηκε η υπεράνοση αντι Rh D γ-σφαιρίνη παρουσιάστηκε μία θετικότητα της Άμεσης Coombs σε ποσοστό 65%, με μέσο όρο θετικότητας τους 3+.

Πίνακας 2: Ερυθροκυτταρικά αντισώματα επί Rh D αρνητικές μητέρες

	Rhesus D Αρνητικό
αντί-D	15
αντί-D,C	1
αντί-D,E	1
αντί-Cw	1
αντί-M	1
αντί-? ¹	1
αντί-C	2
αντί-K	1
Σύνολο	23

Γ.2 Έγκυες Θετικές επί Rh D αντιγόνο

Οι γυναίκες που ήταν θετικές ως προς το Rh D αντιγόνο και παρουσίασαν θετικότητα της Έμμεσης Coombs ήταν 68, εκ των οποίων 18 ήταν πρωτότοκες και από αυτές οι 4 είχαν προβεί σε διακοπή κύησης στο παρελθόν.

Κατά την διαδικασία της ταυτοποίησης των αντισωμάτων ανιχνεύτηκαν 13 διαφορετικά αντισώματα. Συγκεκριμένα: 1 anti-C, 1 anti-c, 1 anti-e, 22 anti-E, 1 anti-Cw, 12 anti-M, 1 anti-N, 1 anti-S, 4 anti-K, 1 anti-Jkb, 4 anti-Jka, 2 anti-Le, 1 anti-Fy(a). Τέλος σε 8 γυναίκες δεν ταυτοποιήθηκαν αντισώματα. Πίνακας 3

¹ Αντισώματα που δεν ήταν επιτυχείς η ταυτοποίηση τους

Πίνακας 3: Ερυθροκυτταρικά αντισώματα επί Rh D θετικών μητέρων

	Rhesus D θετικές μητέρες
αντί-Jkb	1
αντί-c, E	1
αντί-Fy(a)	1
αντί-Fy(b)	1
αντί-N	1
αντί-S	1
αντί-Le	2
αντί-c	7
αντί-e	1
αντί-Cw	1
αντί-E	22
αντί-M	12
αντί-Jka	4
αντί-?	8
αντί-C	1
αντί-K	4
ΣΥΝΟΛΟ	68

Αξίζει εδώ να αναφερθεί πως στα νεογνά των 68 γυναικών αυτών παρουσιάστηκε μια θετικότητα της άμεσης Coombs σε ποσοστό 13,3% με μέσο όρο θετικότητας του 2+. Πίνακας 4

Μετά την ερυθροκυτταρική ταυτοποίηση και των 346 γυναικών ανιχνεύτηκαν 15 διαφορετικά αντισώματα όπου παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 5

Πίνακας 4:Θετικότητα της Αμεσης Coombs στις RhD θετικές μητέρες

DAT		RhD
Θετικό +	αντί-K	1
	Σύνολο	1
Θετικό ++	αντί-D	0
	αντί-c, E	1
	αντί-c	1
	αντί-C	0
	Σύνολο	2
	αντί-D	0
Θετικό +++	αντί-D,C	0
	αντί-e	1
	αντί-E	2
	Σύνολο	3
	αντί-D	0
Θετικό ++++	αντί-c	1
	αντί-Cw	1
	αντί-E	1
	Σύνολο	3

Πίνακας 5: Ταυτοποίηση αλλοαντισωμάτων

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ	N ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	% ΣΤΙΣ ΘΕΤΙΚΕΣ ΙΑΤ
αντί-D	273	78,9
αντί-Jkb	1	0,3
αντί-c, E	1	0,3
αντί-Fy(a)	1	0,3
αντί-Fy(b)	1	0,3
αντί-N	1	0,3
αντί-S	1	0,3
αντί-Le	2	0,6
αντί-c	7	2
αντί-e	1	0,3
αντί-Cw	2	0,6
αντί-E	22	6,4
αντί-M	13	3,5
αντί-Jka	4	1,1
αντί-?	9	2,3
αντί-C	4	1,1
αντί-K	5	1,4
Σύνολο	346	100%

Γ.3 Rh D αντισώματα και αντί-IgG

Στην συνέχεια έγινε ανίχνευση και βρέθηκαν 271 (ποσοστό 78,9%) γυναίκες με αντι- Rh D αντίσωμα, δύο εκ των οποίων μάλιστα ήταν συνδυαστικά και με άλλο αντίσωμα.

Από τις 271 περιπτώσεις με αντι-Rhesus D αντισώματα τα 255 (ποσοστό 73,7%) οφειλόταν σε προηγούμενη χορήγηση υπεράνοσης αντι- Rh D γ-σφαιρίνης (RhDIgG) στις RhD αρνητικές έγκυες για τη μη ευαισθητοποίηση τους. Τα υπόλοιπα 16 οφείλονται σε ευαισθητοποίηση της εγκύου (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Παρουσία anti-D αντισώματος μετά την χορήγηση αντί-IgG σφαιρίνης

		ΠΑΡΟΥΣΙΑ αντί-D αντισώματος
Αντί-IgG	OXI	16
	NAI	255
ΣΥΝΟΛΟ		271

Η παρουσία των Rh D αντισωμάτων λόγω χορήγησης της RhDIgG σφαιρίνης δεν υποδηλώνει ανοσολογική απάντηση και συνεπώς ευαισθητοποίηση της εγκύου. Ως εκ τούτου δεν μπορούν να συμπεριληφθούν στην αξιολόγηση της συχνότητας εμφάνισης αλλοαντισωμάτων. Η αφαίρεση τους από το σύνολο των θετικών ΙΑΤ δίνει την πραγματική εικόνα ανάπτυξης αντισωμάτων λόγω ευαισθητοποίησης. Για αυτό στην περαιτέρω μελέτη αφαιρέθηκαν τα παραπάνω.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ανιχνεύτηκαν τα παρακάτω (Πίνακας 7)

Πίνακας 7: Ταυτοποίηση αλλοαντισωμάτων πλην των γυναικών που έχει χορηγηθεί η RhD IgG σφαιρίνη

	N ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	% ΣΤΙΣ ΘΕΤΙΚΕΣ ΙΑΤ
αντί-D	15	16,5
αντί-D,C	1	1,1
αντί-D,E	1	1,1
αντί-Jkb	1	1,1
αντί-c, E	1	1,1
αντί-Fy(a)	1	1,1
αντί-Fy(b)	1	1,1
αντί-N	1	1,1
αντί-S	1	1,1
αντί-Le	2	2,2
αντί-c	7	7,7
αντί-e	1	1,1
αντί-Cw	2	2,2
αντί-E	22	24,2
αντί-M	13	14,3
αντί-Jka	4	4,4
αντί-?	9	9,9
αντί-C	3	3,3
αντί-K	5	5,5
ΣΥΝΟΛΟ	91	100

Γ.4 Τίτλος αντισωμάτων

Αναλύοντας τον τίτλο του κάθε αντισώματος παρατηρήθηκε ότι μόνο σε 5 περιστατικά (ποσοστό 5,5%) ο τίτλος αντισώματος είναι πάνω από 1/64 και τα 5 περιστατικά ήταν στο αντιγόνο D εκ των οποίων 1 νεογνό παρουσίασε θετικότητα της Coombs 3+ και άλλα 3 νεογνά παρουσίασαν θετικότητα 4+ (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Τίτλος Αντισωμάτων.

Τίτλος	ΣΥΝΟΛΟ	%
1- 1/16	60	65,9
1/16-1/64	26	28,6
1/64-1/256	4	4,4

Με τίτλο 1/16- 1/64 παρουσίασαν 26 περιστατικά (ποσοστό 28,6%) από τα οποία 5 περιστατικά ήταν στο αντιγόνο D, 8 στο αντιγόνο E και 5 στο αντιγόνο M.

Με τίτλο 1-1/16 παρουσίασαν 60 περιστατικά (ποσοστό 65,9%) από τα οποία 14 περιστατικά ήταν στο αντιγόνο E, 8 στο αντιγόνο M και 5 στο αντιγόνο D (Πίνακας 9).

Πίνακας 9 Τίτλος ανά αντισώματα

	ΤΙΤΛΟΣ				ΣΥΝΟΛΟ
	1- 1/16	1/16-1/64	1/64-1/256	1/256-1/2048	
αντί-D	5	5	4	1	15
αντί-D,C	0	1	0	0	1
αντί-D,E	0	1	0	0	1
αντί-Jkb	1	0	0	0	1
αντί-c, E	1	0	0	0	1
αντί-Fy(a)	1	0	0	0	1
αντί-Fy(b)	1	0	0	0	1
αντί-N	1	0	0	0	1
αντί-S	1	0	0	0	1
αντί-Le	2	0	0	0	2
αντί-c	5	2	0	0	7
αντί-e	0	1	0	0	1
αντί-Cw	2	0	0	0	2
αντί-E	14	8	0	0	22
αντί-M	8	5	0	0	13
αντί-Jka	4	0	0	0	4
αντί-?	7	2	0	0	9
αντί-C	3	0	0	0	3
αντί-K	4	1	0	0	5
ΣΥΝΟΛΟ:	60	26	4	1	91

Γ.5 Νεογνά και Άμεση Coombs

Τα 15 αντισώματα που ανιχνεύθηκαν στις 91 έγκυους με θετική ΙΑΤ ήταν κλινικά σημαντικά καθώς πιθανά μπορούν να προκαλέσουν αιμολυτική νόσο του νεογνού. Από την κατηγορία αυτή εξαιρούνται τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων του συστήματος Lewis επειδή αυτά δεν προκαλούν την αιμολυτική νόσο του νεογνού.

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 10, από τις 91 μητέρες με θετική την ΙΑΤ ως τελικό δείγμα μετά την αφαίρεση των γυναικών που τους χορηγήθηκε η αντι D γ-σφαιρίνη, τα 33 νεογνά αυτών (ποσοστό 26,4%) παρουσίασαν θετικότητα στην Άμεση δοκιμασίας Coombs. Κατά συνέπεια εμφάνισαν εργαστηριακή εικόνα αιμολυτικής νόσου του νεογνού, χωρίς κανένα να παρουσιάσει βαριά αιμολυτική νόσο ώστε να υποβληθεί σε αφαιμαξομετάγγιση.

Πίνακας 10: Άμεση Coombs (DAT)

	N	%
APN.	67	73,6
ΘΕΤ+	2	2,2
ΘΕΤ++	7	7,7
ΘΕΤ+++	8	8,8
ΘΕΤ++++	7	7,7
ΣΥΝΟΛΟ	91	100

Τα αντιγόνα που παρουσίασαν την θετικότητα στην Άμεσης Coombs στα νεογνά ανάλογα με την θετικότητα της DAT, σε ΘΕΤ+ αντί-K, ΘΕΤ++ αντί-D, αντί C και ένα περιστατικό που είχε δύο αντισώματα αντί-c,E, ΘΕΤ+++ αντί-D, αντί-e, αντί-E και ένα περιστατικό με δύο αντισώματα αντί-D,C και ΘΕΤ++++ αντί-D, αντί-c, αντί-Cw, αντί-E (Πίνακας 11).

Ενδιαφέρον η παρατήρηση του βαθμού θετικότητας της Άμεσης Coombs σε συνδυασμό με τον τίτλο του αντισώματος. Έτσι, αναλύοντας τον Πίνακα 12 φαίνεται, ότι όσο μεγαλύτερος ο τίτλος του αντισώματος τόσο θετικοποιείται η DAT και ότι

τα αντισώματα anti-D, anti-K, anti-E ακόμα και σε μικρό τίτλο μπορούν να προκαλέσουν θετικότητα της DAT.

Πίνακας 11: Θετική Άμεση Coombs ανά αντισώματα

	DAT					Σύνολο
	APN	ΘΕΤ+	ΘΕΤ++	ΘΕΤ+++	ΘΕΤ++++	
αντί-D	4	0	3	4	4	15
αντί-D,C	0	0	0	1	0	1
αντί-D,E	1	0	0	0	0	1
αντί-Jkb	1	0	0	0	0	1
αντί-c, E	0	0	1	0	0	1
αντί-Fy(a)	1	0	0	0	0	1
αντί-Fy(b)	1	0	0	0	0	1
αντί-N	1	0	0	0	0	1
αντί-S	1	0	0	0	0	1
αντί-Le	2	0	0	0	0	2
αντί-c	5	0	1	0	1	7
αντί-e	0	0	0	1	0	1
αντί-Cw	1	0	0	0	1	2
αντί-E	19	0	0	2	1	22
αντί-M	13	0	0	0	0	13
αντί-Jka	4	0	0	0	0	4
αντί-?	9	0	0	0	0	9
αντί-C	1	0	2	0	0	3
αντί-K	3	2	0	0	0	5
Σύνολο	67	2	7	8	7	91

Πίνακας 12: Τίτλος ανά αντισώματα και θετικότητα της DAT

DAT		Τίτλος				Σύνολο
		1- 1/16	1/16-1/64	1/64-1/256	1/256-1/2048	
APN	αντί-D	3	0	1		4
	αντί-D,E	0	1	0		1
	αντί-Jkb	1	0	0		1
	αντί-Fy(a)	1	0	0		1
	αντί-Fy(b)	1	0	0		1
	αντί-N	1	0	0		1
	αντί-S	1	0	0		1
	αντί-Le	2	0	0		2
	αντί-c	4	1	0		5
	αντί-Cw	1	0	0		1
	αντί-E	14	5	0		19
	αντί-M	8	5	0		13
	αντί-Jka	4	0	0		4
	αντί-?	7	2	0		9
	αντί-C	1	0	0		1
	αντί-K	2	1	0		3
	<i>Σύνολο</i>	<i>51</i>	<i>15</i>	<i>1</i>		<i>67</i>
ΘET+	αντί-K	2				2
	<i>Σύνολο</i>	2				2
ΘET++	αντί-D	1	2			3
	αντί-c, E	1	0			1
	αντί-c	0	1			1
	αντί-C	2	0			2
	<i>Σύνολο</i>	4	3			7
ΘET+++	αντί-D		3	1		4
	αντί-D,C		1	0		1
	αντί-e		1	0		1
	αντί-E		2	0		2
	<i>Σύνολο</i>		7	1		8
ΘET++++	αντί-D	1	0	2	1	4
	αντί-c	1	0	0	0	1
	αντί-Cw	1	0	0	0	1
	αντί-E	0	1	0	0	1
	<i>Σύνολο</i>	3	1	2	1	7

Γ.6: Rh Θετικές μητέρες και θετική Coombs (Έμμεση -Άμεση)

Εξαιρώντας από το γενικό σύνολο των δειγμάτων τις μητέρες που ήταν αρνητικές ως προς το Rh και είχαν πραγματοποιήσει υπεράνωση Rhesus γ-σφαιρίνη (RhIgG) θα παρουσιάζονται αποτελέσματα ως προς το Rh της μητέρας.

Έτσι παρατηρήθηκε μία θετικότητα της Έμμεσης Coombs της τάξεως 74,7% στις Rh θετικές Γυναίκες και 25,3% σε Γυναίκες με αρνητικό Rh. Όπως φαίνεται και στον παρακάτω (Πίνακα 13).

Πίνακας 13: Θετικότητα IAT και Rh μητέρας

	ΣΥΝΟΛΟ	%
Rh D+	68	74,7
Rh D-	23	25,3
ΣΥΝΟΛΟ	91	100,0

Θετικότητα της Άμεσης Coombs της τάξεως 10,2% παρουσιάζεται στις Rh θετικές μητέρες ενώ στις Rh αρνητικές μητέρες παρουσιάζεται ένα ποσοστό της τάξεως του 16,2% (Πίνακας 14).

Πίνακας 14: Θετικότητα DAT και Rh μητέρες

	Rh ΜΗΤΕΡΑΣ			
	Rh D+		Rh D-	
	N	%	N	%
APN	59	64,9	8	8,7
ΘΕΤ+	1	1,1	1	1,1
ΑΤ ΘΕΤ++	2	2,3	5	5,4
ΘΕΤ+++	3	3,4	5	5,4
ΘΕΤ++++	3	3,4	4	4,3
ΣΥΝΟΛΟ	68	75,1	23	24,9

Γ.7 Στατιστική επεξεργασία

Από την στατική ανάλυση των δεδομένων παρατηρούμε ότι στατιστική σημαντική διαφορά παρουσιάζετε:

Το Rhesus D της μητέρας ανεξαρτήτως θετικού ή αρνητικού παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την κύηση ($p = 0,000$), τη μετάγγιση ($p = 0,003$), το Rh D του νεογνού ($p = 0,000$) καθώς και το Rh C ή c ($p = 0,000$).

Η Έμμεση Coombs παρουσιάζει θετική συσχέτιση με το Rh D της μητέρας ανεξαρτήτως θετικού ή αρνητικού ($p = 0,006$), με τη παρουσία ή απουσία του αντιγόνου Kell της μητέρας ($p = 0,044$), με το Rh D του νεογνού θετικού ή αρνητικού ($p = 0,002$).

Επίσης μεγάλη στατιστική συσχέτιση παρουσιάζεται με την παρουσία των συνδυασμών των αντισωμάτων αντι-D και αντι-c στην μητέρα ($p = 0,018$), με το αντίσωμα αντι-E και αντι-D ($p = 0,000$), αντι-E και αντι-M ($p = 0,000$), αντι-E και αντι-C ($p = 0,046$), αντι-E και αντι-K ($p = 0,013$).

Τέλος σημαντική είναι η στατιστική συσχέτιση που παρουσιάζει η άμεση Coombs με την χορήγηση της αντι-D γ-σφαιρίνης στις μητέρες που είναι Rhesus D αρνητικές ($p = 0,000$) καθώς και με την παρουσία του αντιγόνου Kell στα ερυθρά των νεογνών ($p = 0,044$).

Γ.8 Σύνοψη αποτελεσμάτων

Σε σύνολο 6700 δειγμάτων ανιχνεύθηκαν 346 δείγματα θετικά στην δοκιμασία της Έμμεσης Coombs, από τα οποία τα 255 δείγματα είχε χορηγηθεί υπεράνοση αντι-Rh D γ-σφαιρίνης που δεν είναι κλινικά σημαντικό.

Το υπόλοιπο των δειγμάτων που έχει κλινική σημασία ήταν ένα σύνολο αποτελούμενο από 91 δείγματα που έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά: έχει θετική την Έμμεση coombs και δεν έχει πραγματοποιηθεί υπεράνοση αντι-Rhesus D γ-σφαιρίνης. Η ανάλυση των δειγμάτων αυτών έχει ως εξής:

- Ταυτοποιήθηκαν 15 διαφορετικά αλλοαντισώματα.
- Θετικότητα της Άμεσης Coombs παρουσιάζεται σε 33 δείγματα (ποσοστό 26,4%).

- Rh θετικό παρουσιάζουν 68 εκ των δειγμάτων (ποσοστό 74,7%).
- Rh αρνητικό παρουσιάζουν 23 δείγματα (ποσοστό 25,3%) .
- Τα Σημαντικότερα άλλο-αντισώματα που ανιχνεύονται είναι το anti-D -15 δείγματα (ποσοστό 16,5%), το anti-E -22 δείγματα (ποσοστό 24,2%) και τέλος το anti-M -13 (ποσοστό 14,3%)

Ε. Συζήτηση

Κατά την διάρκεια της κύησης, όταν τα ερυθροκύτταρα του εμβρύου που φέρουν τα πατρικά αντιγόνα ξένα ως προς τα μητρικά, διέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος της μητέρας, προκαλούν την αλλοανοσοποίηση της. Από την στιγμή της πρώτης ανοσοποίησης σε κάθε επόμενη κύηση θετική στο υπεύθυνο αντιγόνο, η πιθανότητα εκδήλωσης σοβαρής αιμολυτικής νόσου του εμβρύου θα αυξάνεται.

Η εκτίμηση της συχνότητας των ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων κατά την κύηση λόγω της νοσηρότητας και της υψηλής θνησιμότητας που παρουσιάζει είναι σημαντική. Η αρχική χορήγηση της αντι-D γ-σφαιρίνης στον τοκετό και στην 28^η εβδομάδα αργότερα, υπήρξε το σημαντικότερο επίτευγμα της σύγχρονης προληπτικής ιατρικής, μειώνοντας της συχνότητα της αιμολυτικής νόσου από το 14% στο 1-2% και 0,1% αντίστοιχα.

Η μείωση της D αλλοανοσοποίησης, ανέδειξε την ύπαρξη άλλων ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων ως αιτίες στην πρόκληση της αιμολυτικής νόσου του νεογνού. Τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι, κατά την μελέτη των Koelewijn (168) το αντιγόνο Kell (11,6%) και το c μικρό (8,5%). Η βαρύτητα της αιμολυτικής νόσου που προκαλείται από τα εκτός D αλλοαντισώματα, ποικίλει από ήπια έως σοβαρή, ενώ δεν είναι σπάνιος ο εμβρυϊκός θάνατος.

Η αξιολόγηση της συχνότητας των ερυθροκυτταρικών αλλοαντισωμάτων κατά την κύηση στις έγκυες ήταν 5,16% (346/6700), ένα ποσοστό που είναι ψευδές επειδή σε αυτό το ποσοστό παρουσιάζονται και οι γυναίκες που τους έχει χορηγηθεί η αντι-D γ-σφαιρίνη κατά την διάρκεια του τοκετού με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν άνοση τη θετικότητα της Έμμεσης Coombs. Αφαιρώντας αυτά τα δείγματα υπάρχει ένα ποσοστό 1,3% που έχουν παρουσιάσει παθητικά αλλοαντίσωμα, με βάση την διεθνή βιβλιογραφία η οποία κυμαίνεται από 0,19%- 1,3% στην Ευρώπη και την Αμερική, τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα ευρήματά μας είναι αντίστοιχα με αυτά που αναφέρονται στην διεθνή βιβλιογραφία.(143, 147, 149, 155)

Στα δειγματά μας ανιχνεύθηκαν 15 αλλοαντισώματα σε 346 εγκύους. Από αυτά δεν ταυτοποιήθηκαν 9/15 (60%) και επί του συνόλου 0,13% (9/6700), επίσης το

3,8% του συνόλου, δηλαδή 255(255/6700) γυναίκες, ήταν Rh αρνητικές όπου και τους είχε χορηγηθεί αντί-D γ-σφαιρίνη με αποτέλεσμα να έχουν κατά τον έλεγχο άνοσο αντι-D αντίσωμα.

Τα Rh-D αντισώματα δεν είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε άνοσα ή παθητικά με εκτέλεση της ΙΑΤ, και για αυτό απαιτείται προσοχή και καλή λήψη του ιστορικού. Εάν δεν είναι εφικτό να ληφθούν πληροφορίες, τότε ένας πρακτικός τρόπος για διερεύνηση του αντισώματος είναι ο διαδοχικός έλεγχος του τίτλου του. Στις περιπτώσεις παθητικού αντισώματος, το οποίο μπορεί να ανιχνεύεται 12 ή και περισσότερες εβδομάδες μετά τη χορήγηση της ανοσοσφαιρίνης, ο τίτλος ακολουθεί φθίνουσα πορεία, σε αντίθεση με τα άνοσα που ο τίτλος τους παραμένει σταθερός ή αυξάνεται. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, έχουν προταθεί (169) τα γνωστού αντιγονικού φαινοτύπου ερυθροκύτταρα, που χρησιμοποιούνται για την εκτέλεση της έμμεσης δοκιμασίας Coombs, να είναι Rhesus D αρνητικά με την προϋπόθεση πάντα, ότι έχει επιβεβαιωθεί η προφυλακτική χορήγηση Rhesus D ανοσοσφαιρίνης.

Τα συχνότερα αλλοαντισώματα που παρατηρήθηκαν στην μελέτη, ήταν το αντι-E αντίσωμα 24,2% (22/91) και 0.3% (22/6700) εκ του συνόλου, καθώς και το αντι-D αντίσωμα στις ευαισθητοποιημένες γυναίκες σε ποσοστό 16.5% (15/91) και σε ποσοστό 0,22% (15/6700) στο σύνολο των γυναικών. Τα ευρήματα μας συμφωνούν με τη συχνότητα που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία και η οποία κυμαίνεται από 0,1%-0,3% (170, 171) για το αντι-D αντίσωμα.

Παρά την καθολική εφαρμογή της ανοσοπροφύλαξης των RhD αρνητικών γυναικών κατά τον τοκετό και την εφαρμογή της ανοσοπροφύλαξης κατά τη διάρκεια της κύησης, το αντι-D αντίσωμα εξακολουθεί να είναι ένα συχνό αλλοαντίσωμα που περιπλέκει την κύηση, καθώς προκαλεί και τα συχνότερα αίτια της αιμολυτικής νόσου του εμβρύου –νεογνού (172-174).

Στην Ελλάδα, εφαρμόζεται ένα πρόγραμμα πρόληψης της ευαισθητοποίησης των Rhesus D αρνητικών εγκύων. Οι κατευθυντήριες οδηγίες του προγράμματος περιλαμβάνουν τον έλεγχο, σε όλες τις έγκυες, της ομάδας αίματος ABO και RhD κατά την πρώτη επίσκεψη στον μαιευτήρα- γυναικολόγο. Όταν η γυναίκα βρεθεί RhD αρνητική τότε γίνεται αναζήτηση των μη αναμενομένων αντι-RhD αντισωμάτων με την εξέταση της έμμεσης Coombs. Σύμφωνα με το πρόγραμμα πρόληψης, χορηγείται

Rhesus ανοσοσφαιρίνη κατά τον τοκετό ή εντός 72 ωρών από αυτόν, όταν το νεογνό είναι RhD θετικό, καθώς χορηγείται και σε κάθε συμβάν κατά την διάρκεια της κύησης.

Για την προφυλακτική χορήγηση κατά την διάρκεια της κύησης στην 28^η εβδομάδα ή γύρω από αυτήν, δεν υπάρχει ενιαία κατευθυντήρια οδηγία στην Ελλάδα και η πρακτική διαφέρει μεταξύ των γυναικολόγων. Στην Ελλάδα, δεν υπάρχουν επιδημιολογικές μελέτες της συχνότητας ανίχνευσης του anti-D αντισώματος πριν και μετά την έναρξη της ανοσοπροφύλαξης για να αξιολογηθούν τα μέτρα πρόληψης της ανοσοπροφύλαξης, ούτε και μελέτες για την χορήγηση της ανοσοπροφύλαξης κατά την διάρκεια της κύησης.

Η αναζήτηση μη αναμενόμενων ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων στις RhD θετικές γυναίκες είναι προαιρετική, καθώς δεν υπάρχει ενιαία κατευθυντήρια οδηγία όπως γίνεται σε άλλες χώρες (175). Τα εκτός RhD αντισώματα μπορούν να προκαλέσουν εμβρυϊκό θάνατο, εμβρυϊκό ύδρωπα και σοβαρή έως θανατηφόρα αιμολυτική νόσο, ενώ δεν υπάρχει δυνατότητα ανοσοπροφύλαξης παρά μόνο η έγκυρη διάγνωση(176). Με βάση την διεθνή βιβλιογραφία η συχνότητα ανίχνευσης αλλοαντισωμάτων εκτός του D κυμαίνεται 0,15% με 1,6% (168, 176-182).

Το αντίσωμα που ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό στην μελέτη μας ήταν το αντι-E. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία (183-185), το αντι-E αντίσωμα μόνο του, είναι το συχνότερο συναντούμενο μετά το αντι-D αντισώματα, και σπάνια προκαλεί αιμολυτική νόσο του εμβρύου- νεογνού (155). Στην μελέτη μας ανιχνεύσαμε 3 νεογνά που παρουσίασαν θετική την άμεση Coombs, χωρίς την παρουσία κλινικών ευρημάτων αιμολυτικής νόσου από της 22 μητέρες με αντι-E αντισώματα στον ορό τους.

Το επόμενο σε συχνότητα εμφάνισης αντίσωμα ήταν το αντι-M, σε 13 περιστατικά με ποσοστό 14,3% (13/91) και 0,2% (13/6700) εκ του συνόλου. Σε κανένα νεογνό δεν παρατηρήθηκε κλινικό ή εργαστηριακό εύρημα συμβατό με την αιμολυτική νόσο του νεογνού- εμβρύου.

Στη διεθνή βιβλιογραφία ποικίλουν οι αναφορές για την συχνότητα εμφάνισης του αντι-Mαντισώματος. Σε μερικές αναφέρεται ως σπάνιο (166, 186) και σε άλλες σχετικά συχνό. Στη δική μας μελέτη στις 6700 γυναίκες εμφανίστηκε με συχνότητα 0,2% (13/6700) καθώς και το 14,3% (13/91) των άνοσων αντισωμάτων. Παρόλο που

δεν θα έπρεπε να μας απασχολεί ως κλινικά σημαντικό γιατί ανήκει στην τάξη των IgM αντισωμάτων που δεν διέρχεται τον πλακουντιακό φραγμό, εν τούτοις σε μικρές ποσότητες μπορεί να είναι της τάξης IgG που μπορεί να ανιχνευθεί στις δοκιμασίες με αντισφαιρινικό ορό. Λόγω του μεγάλου θερμικού εύρους που δρα, συχνά αναγνωρίζεται λανθασμένα σαν IgG, και για το λόγο αυτό οι δοκιμασίες ελέγχου θα πρέπει να γίνονται αυστηρά σε θερμοκρασία 37°C.

Η αιμολυτική νόσος προκαλούμενη από αντίσωμα αντι-M μπορεί να οδηγήσει σε εμβρυϊκό θάνατο ή αφαιμαξομετάγγιση του νεογνού. Επειδή στην διεθνή βιβλιογραφία (187) αναφέρονται λίγες περιπτώσεις αιμολυτικής νόσου, έχει μεγάλη σημασία να αξιολογηθεί και να ταυτοποιηθεί η ύπαρξη του αντι-M αντισώματος. Το τέταρτο σε εμφάνιση αντίσωμα, ήταν το αντι-c μικρό αντίσωμα, σε ποσοστό 7,7% (7/91) εκ των ανοσογόνων και 0,1% (7/6700) εκ του συνόλου των δειγμάτων. Ο τίτλος που εμφάνισαν και τα 7 περιστατικά δεν ξεπερνούσε το 1/64. Ενώ δύο εκ των νεογνών παρουσίασαν άμεση Coombs θετική με φαινότυπο Cc.

Η συχνότητα του αναφέρεται να είναι 0,7%/1000 κυήσεις αλλά η συχνότητα της αιμολυτικής νόσου του εμβρύου- νεογνού προκαλούμενη από το αντίσωμα αντι-c είναι πολύ μικρότερη είτε γιατί υποεκτιμάται, είτε επειδή ο τίτλος συχνά είναι τόσο χαμηλός που δεν ανιχνεύεται με τη συνήθη διαδικασία, ενώ η άμεση Coombs του νεογνού είναι αρνητική.

Το επόμενο αντίσωμα σε συχνότητα που εμφανίστηκε στην παρούσα μελέτη είναι το αντι-Kell αντίσωμα, σε ποσοστό 5,5% (5/91) στο σύνολο των ανοσογόνων και 0,08% (5/6700) εκ του συνόλου των δειγμάτων

Το σύνολο των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων Kell, περιλαμβάνει 24 αντιγόνα που είναι σημαντικά από απόψεως κλινικής σημασίας μετά το ABO και το Rhesus, αφού αποτελούν εξίσου συχνή αιτία στην πρόκληση αιμολυτικών αντιδράσεων μετά από μετάγγιση και σοβαρής αιμολυτικής νόσου του εμβρύου - νεογνού.

Το αντίσωμα Kell είναι κλινικά σημαντικό αντίσωμα και για αυτό η θετικότητά του πρέπει να αντιμετωπίζεται με χειρισμούς αντίστοιχους του αντι-D αντισώματος. Η αιμολυτική νόσος προκαλούμενη από αλλοανοσοποίηση που οφείλεται στο αντιγόνο Kell, διαφέρει σε αρκετά σημεία από το αντιγόνο D. Η εμβρυϊκή αναιμία παρουσιάζεται λόγω καταστολής της αιμοποίησης και λιγότερο λόγω αιμόλυσης. Αυτό έχει ως συνέπεια τα αποτελέσματα της ανάλυσης του

αμνιακού υγρού της αμνιοπαρακεντησης να δίνουν οπτική πυκνότητα, λόγω χαμηλής παραγωγής χολερυθρίνης, εντός φυσιολογικών ορίων ή συμβατή με ήπια νόσο. Λόγω αυτού η αμνιοπαρακέντηση υστερεί σαν μέθοδος διάγνωσης της αιμολυτικής νόσου του νεογνού, καθώς και ο τίτλος των αντισωμάτων σπανίως μεταβάλλεται και έτσι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης εκτίμησης ενώ σε μελέτες, έχουν αναφερθεί περιστατικά σοβαρής νόσου με πολύ χαμηλό τίτλο αντισώματος. (188)

Στην Ελλάδα, οι κατευθυντήριες οδηγίες σχετικές με τις RhD αρνητικές γυναίκες τόσο για την παρακολούθηση όσο και για την ανοσοπροφύλαξη μετά τον τοκετό είναι σαφείς, παρόλα αυτά δεν υπάρχουν οδηγίες όσον αφορά την ανοσοπροφύλαξη κατά τη διάρκεια της κύησης. Η διεθνής οδηγίες στην πλειοψηφία τους συνιστούν προφυλακτική χορήγηση RhIgG ανοσοσφαιρίνης οπωσδήποτε την 28^η εβδομάδα της κύησης με ή χωρίς επανάληψη χορήγησης την 34^η εβδομάδα. Σχετικά με τις γυναίκες με RhD θετικό, δεν υπάρχουν κατευθυντήριες οδηγίες για την αναζήτηση ερυθροκυτταρικών αλλοαντισωμάτων.

Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης μας, το 2,4% εκ του συνόλου των γυναικών ήταν πρωτότοκες που παρουσίασαν θετικότητα της Έμμεσης Coombs, ενώ το 2,7% είχαν και άλλες κυήσεις. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την ανάγκη της γενίκευσης του ελέγχου με την Έμμεση δοκιμασία Coombs όλων των εγκύων είτε είναι αρνητικές είτε θετικές ως προς τον παράγοντα Rhesus D. Η λήψη καλού μαιευτικού ιστορικού και η έγκαιρη αναγνώριση των αντισωμάτων δίνει την δυνατότητα ώστε να παρθούν όλα εκείνα τα μέτρα που είναι αναγκαία για την διάγνωση και την αντιμετώπιση της αιμολυτικής νόσου του εμβρύου – νεογνού (189).

ΣΤ. Συμπέρασμα

Από την παρούσα μελέτη προκύπτουν συνοπτικά τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η συχνότητα ανίχνευσης αλλοαντισωμάτων εκτός των RhD ανέρχεται στο ποσοστό του 1,13%.

- Η συχνότητα ανίχνευσης αμιγώς κλινικά σημαντικών αλλοαντισωμάτων εκτός των RhD αντισωμάτων ανέρχεται σε ποσοστό του 1% το οποίο είναι συγκρίσιμο με αυτό που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία (0,15%-1,6%).

- Το αντίσωμα αντι-D ήταν το σημαντικότερο αντίσωμα που ανιχνεύθηκε. Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας όπου κοινή αναφορά είναι ότι παρόλο που λαμβάνεται η ανοσοπροφύλαξη. Η RhD αλλοανοσοποίηση παραμένει ένα σοβαρό πρόβλημα της περιγεννητικής υγείας και η πρώτη αιτία σοβαρής αιμολυτικής νόσου του εμβρύου-νεογνού.

- Η συχνότητα των κλινικά σημαντικών αντισωμάτων ανέρχεται στο 1,35% του συνόλου το οποίο είναι συγκρίσιμο με αυτό που αναφέρεται στην διεθνή βιβλιογραφία (0,4%-3,68%).

- Ο αριθμός των προηγούμενων κυήσεων και η μετάγγιση αίματος αποτελούν παράγοντες κινδύνου που συσχετίζονται άμεσα με την ανάπτυξη των ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων στις μητέρες με αποτέλεσμα την πρόκληση αιμολυτικής νόσου του εμβρύου - νεογνού.

H. Βιβλιογραφία

1. Daniels G. Human Blood Groups (2nd edn). Transfusion Medicine. 2004;14(4):326-.
2. Reid ME, Mohandas N. Red blood cell blood group antigens: structure and function. Seminars in hematology. 2004;41(2):93-117.
3. Denomme GA. The structure and function of the molecules that carry human red blood cell and platelet antigens. Transfusion medicine reviews. 2004;18(3):203-31.
4. Mohandas N, Narla A. Blood group antigens in health and disease. Current opinion in hematology. 2005;12(2):135-40.
5. Viitala J, Järnefelt J. The red cell surface revisited. Trends in Biochemical Sciences. 1985;10(10):392-5.
6. Sands JM. Renal urea transporters. Current opinion in nephrology and hypertension. 2004;13(5):525-32.
7. Macey RI, Yousef LW. Osmotic stability of red cells in renal circulation requires rapid urea transport. The American journal of physiology. 1988;254(5 Pt 1):C669-74.
8. Lucien N, Sidoux-Walter F, Olives B, Moulds J, Le Pennec PY, Cartron JP, et al. Characterization of the gene encoding the human Kidd blood group/urea transporter protein. Evidence for splice site mutations in Jknull individuals. The Journal of biological chemistry. 1998;273(21):12973-80.
9. Irshaid NM, Henry SM, Olsson ML. Genomic characterization of the kidd blood group gene: different molecular basis of the Jk(a-b-) phenotype in Polynesians and Finns. Transfusion. 2000;40(1):69-74.
10. Sidoux-Walter F, Lucien N, Nissinen R, Sistonen P, Henry S, Moulds J, et al. Molecular heterogeneity of the Jk(null) phenotype: expression analysis of the Jk(S291P) mutation found in Finns. Blood. 2000;96(4):1566-73.
11. Frohlich O, Macey RI, Edwards-Moulds J, Gargus JJ, Gunn RB. Urea transport deficiency in Jk(a-b-) erythrocytes. The American journal of physiology. 1991;260(4 Pt 1):C778-83.
12. Sands JM, Gargus JJ, Frohlich O, Gunn RB, Kokko JP. Urinary concentrating ability in patients with Jk(a-b-) blood type who lack carrier-mediated urea transport. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 1992;2(12):1689-96.
13. Yang B, Bankir L, Gillespie A, Epstein CJ, Verkman AS. Urea-selective concentrating defect in transgenic mice lacking urea transporter UT-B. The Journal of biological chemistry. 2002;277(12):10633-7.
14. Klein JD, Sands JM, Qian L, Wang X, Yang B. Upregulation of urea transporter UT-A2 and water channels AQP2 and AQP3 in mice lacking urea transporter UT-B. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2004;15(5):1161-7.
15. King LS, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. Nature reviews Molecular cell biology. 2004;5(9):687-98.
16. Verkman AS. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. Journal of cell science. 2005;118(Pt 15):3225-32.
17. Smith BL, Preston GM, Spring FA, Anstee DJ, Agre P. Human red cell aquaporin CHIP. I. Molecular characterization of ABH and Colton blood group antigens. The Journal of clinical investigation. 1994;94(3):1043-9.
18. Preston GM, Smith BL, Zeidel ML, Moulds JJ, Agre P. Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels. Science (New York, NY). 1994;265(5178):1585-7.

19. Ma T, Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(8):4296-9.
20. Roudier N, Ripoche P, Gane P, Le Pennec PY, Daniels G, Cartron JP, et al. AQP3 deficiency in humans and the molecular basis of a novel blood group system, GIL. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(48):45854-9.
21. Hara-Chikuma M, Verkman AS. Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2006;63(12):1386-92.
22. Tanner MJ. Band 3 anion exchanger and its involvement in erythrocyte and kidney disorders. *Current opinion in hematology*. 2002;9(2):133-9.
23. Bruce L. Mutations in band 3 and cation leaky red cells. *Blood cells, molecules & diseases*. 2006;36(3):331-6.
24. Piermarini PM, Kim EY, Boron WF. Evidence against a direct interaction between intracellular carbonic anhydrase II and pure C-terminal domains of SLC4 bicarbonate transporters. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(2):1409-21.
25. Cherif-Zahar B, Raynal V, Gane P, Mattei MG, Bailly P, Gibbs B, et al. Candidate gene acting as a suppressor of the RH locus in most cases of Rh-deficiency. *Nature genetics*. 1996;12(2):168-73.
26. ANSTEE DJ, MALLINSON G. THE BIOCHEMISTRY OF BLOOD GROUP ANTIGENS - SOME RECENT ADVANCES. *Vox Sanguinis*. 1994;67(s3):1-6.
27. Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, Peters LL, Chasis JA, Delaunay J, et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood*. 2003;101(10):4180-8.
28. Arese P, Turrini F, Schwarzer E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2005;16(4-6):133-46.
29. Ribeiro ML, Alloisio N, Almeida H, Gomes C, Texier P, Lemos C, et al. Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with the total absence of band 3. *Blood*. 2000;96(4):1602-4.
30. Hadley TJ, Peiper SC. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood*. 1997;89(9):3077-91.
31. Rot A. Contribution of Duffy antigen to chemokine function. *Cytokine & growth factor reviews*. 2005;16(6):687-94.
32. Gardner L, Patterson AM, Ashton BA, Stone MA, Middleton J. The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;321(2):306-12.
33. Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, Apple T, Hebert CA, Valente AJ, et al. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(4):1362-9.
34. Pruenster M, Rot A. Throwing light on DARC. *Biochemical Society transactions*. 2006;34(Pt 6):1005-8.
35. Lee JS, Wurfel MM, Matute-Bello G, Frevert CW, Rosengart MR, Ranganathan M, et al. The Duffy antigen modifies systemic and local tissue chemokine responses following lipopolysaccharide stimulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;177(11):8086-94.

36. Shen H, Schuster R, Stringer KF, Waltz SE, Lentsch AB. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growth. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(1):59-64.
37. Wang J, Ou ZL, Hou YF, Luo JM, Shen ZZ, Ding J, et al. Enhanced expression of Duffy antigen receptor for chemokines by breast cancer cells attenuates growth and metastasis potential. *Oncogene*. 2006;25(54):7201-11.
38. Addison CL, Belperio JA, Burdick MD, Strieter RM. Overexpression of the duffy antigen receptor for chemokines (DARC) by NSCLC tumor cells results in increased tumor necrosis. *BMC cancer*. 2004;4:28.
39. Bandyopadhyay S, Zhan R, Chaudhuri A, Watabe M, Pai SK, Hirota S, et al. Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nature medicine*. 2006;12(8):933-8.
40. Daniels G. Functions of red cell surface proteins. *Vox Sang*. 2007;93(4):331-40.
41. Kroviarski Y, El Nemer W, Gane P, Rahuel C, Gauthier E, Lecomte MC, et al. Direct interaction between the Lu/B-CAM adhesion glycoproteins and erythroid spectrin. *British journal of haematology*. 2004;126(2):255-64.
42. Elyer CE, Telen MJ. The Lutheran glycoprotein: a multifunctional adhesion receptor. *Transfusion*. 2006;46(4):668-77.
43. Parsons SF, Mallinson G, Holmes CH, Houlihan JM, Simpson KL, Mawby WJ, et al. The Lutheran blood group glycoprotein, another member of the immunoglobulin superfamily, is widely expressed in human tissues and is developmentally regulated in human liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(12):5496-500.
44. Rahuel C, Le Van Kim C, Mattei MG, Cartron JP, Colin Y. A unique gene encodes spliceoforms of the B-cell adhesion molecule cell surface glycoprotein of epithelial cancer and of the Lutheran blood group glycoprotein. *Blood*. 1996;88(5):1865-72.
45. Parsons SF, Lee G, Spring FA, Willig TN, Peters LL, Gimm JA, et al. Lutheran blood group glycoprotein and its newly characterized mouse homologue specifically bind alpha5 chain-containing human laminin with high affinity. *Blood*. 2001;97(1):312-20.
46. Southcott MJ, Tanner MJ, Anstee DJ. The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system. *Blood*. 1999;93(12):4425-35.
47. Bony V, Gane P, Bailly P, Cartron JP. Time-course expression of polypeptides carrying blood group antigens during human erythroid differentiation. *British journal of haematology*. 1999;107(2):263-74.
48. Zen Q, Cottman M, Truskey G, Fraser R, Telen MJ. Critical factors in basal cell adhesion molecule/lutheran-mediated adhesion to laminin. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(2):728-34.
49. Bailly P, Tontti E, Hermand P, Cartron JP, Gahmberg CG. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *European journal of immunology*. 1995;25(12):3316-20.
50. Delahunty M, Zennadi R, Telen MJ. LW protein: a promiscuous integrin receptor activated by adrenergic signaling. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2006;13(1-2):44-9.
51. Parsons SF, Spring FA, Chasis JA, Anstee DJ. Erythroid cell adhesion molecules Lutheran and LW in health and disease. *Bailliere's best practice & research Clinical haematology*. 1999;12(4):729-45.
52. Ihanus E, Uotila LM, Toivanen A, Varis M, Gahmberg CG. Red-cell ICAM-4 is a ligand for the monocyte/macrophage integrin CD11c/CD18: characterization of the binding sites on ICAM-4. *Blood*. 2007;109(2):802-10.

53. Gubin AN, Njoroge JM, Wojda U, Pack SD, Rios M, Reid ME, et al. Identification of the dombrock blood group glycoprotein as a polymorphic member of the ADP-ribosyltransferase gene family. *Blood*. 2000;96(7):2621-7.
54. Lee S, Lin M, Mele A, Cao Y, Farmar J, Russo D, et al. Proteolytic processing of big endothelin-3 by the kell blood group protein. *Blood*. 1999;94(4):1440-50.
55. Claperon A, Hattab C, Armand V, Trottier S, Bertrand O, Ouimet T. The Kell and XK proteins of the Kell blood group are not co-expressed in the central nervous system. *Brain research*. 2007;1147:12-24.
56. Maier AG, Duraisingh MT, Reeder JC, Patel SS, Kazura JW, Zimmerman PA, et al. Plasmodium falciparum erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nature medicine*. 2003;9(1):87-92.
57. Watkins WM. The ABO blood group system: historical background. *Transfusion medicine (Oxford, England)*. 2001;11(4):243-65.
58. Stussi G, Halter J, Schanz U, Seebach JD. ABO-histo blood group incompatibility in hematopoietic stem cell and solid organ transplantation. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2006;35(1):59-69.
59. Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoen N, Clement M, et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie*. 2001;83(7):565-73.
60. Holgersson J, Breimer ME, Samuelsson BE. Basic biochemistry of cell surface carbohydrates and aspects of the tissue distribution of histo-blood group ABH and related glycosphingolipids. *APMIS Supplementum*. 1992;27:18-27.
61. Yamamoto F. Review: ABO blood group system--ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. *Immunohematology*. 2004;20(1):3-22.
62. Svensson L, Rydberg L, Hellberg A, Gilliver LG, Olsson ML, Henry SM. Novel glycolipid variations revealed by monoclonal antibody immunochemical analysis of weak ABO subgroups of A. *Vox Sang*. 2005;89(1):27-38.
63. Auf der Maur C, Hodel M, Nydegger UE, Rieben R. Age dependency of ABO histo-blood group antibodies: reexamination of an old dogma. *Transfusion*. 1993;33(11):915-8.
64. Daniel-Johnson J, Leitman S, Klein H, Alter H, Lee-Stroka A, Scheinberg P, et al. Probiotic-associated high-titer anti-B in a group A platelet donor as a cause of severe hemolytic transfusion reactions. *Transfusion*. 2009;49(9):1845-9.
65. Hata Y, Kominato Y, Takizawa H. Identification and characterization of a novel antisense RNA transcribed from the opposite strand of the human blood group ABO gene. *Transfusion*. 2007;47(5):842-51.
66. Kominato Y, Hata Y, Matsui K, Takizawa H, Tsukada J-i, Nakajima T, et al. Transcriptional regulation of the human ABO histo-blood group genes is dependent on the N box upstream of the proximal promoter. *Transfusion*. 2004;44(12):1741-9.
67. Koda Y, Soejima M, Kimura H. Changing transcription start sites in H-type alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT1) during differentiation of the human erythroid lineage. *European journal of biochemistry*. 1998;256(2):379-87.
68. Clausen H, Levery SB, Nudelman E, Tsuchiya S, Hakomori S. Repetitive A epitope (type 3 chain A) defined by blood group A1-specific monoclonal antibody TH-1: chemical basis of qualitative A1 and A2 distinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(4):1199-203.
69. Rouger P, Liberge G, Gane P, Oriol R, Salmon C. Immunological properties of 31 anti-A monoclonal antibodies. *Revue française de transfusion et immuno-hématologie*. 1987;30(5):413-20.

70. Rosenfield RE. Who discovered Rh? A personal glimpse of the Levine-Wiener argument. *Transfusion*. 1989;29(4):355-7.
71. Cherif-Zahar B, Bloy C, Le Van Kim C, Blanchard D, Bailly P, Hermand P, et al. Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(16):6243-7.
72. Mollison PL, Hughes-Jones NC, Lindsay M, Wessely J. Suppression of primary RH immunization by passively-administered antibody. *Experiments in volunteers*. *Vox Sang*. 1969;16(4):421-39.
73. Green FA. Phospholipid requirement for Rh antigenic activity. *The Journal of biological chemistry*. 1968;243(20):5519-21.
74. Gahmberg CG. Molecular characterization of the human red cell Rho(D) antigen. *The EMBO journal*. 1983;2(2):223-7.
75. Gahmberg CG. Molecular identification of the human Rh0(D) antigen. *FEBS Letters*. 1982;140(1):93-7.
76. Bloy C, Blanchard D, Lambin P, Goossens D, Rouger P, Salmon C, et al. Human monoclonal antibody against Rh(D) antigen: partial characterization of the Rh(D) polypeptide from human erythrocytes. *Blood*. 1987;69(5):1491-7.
77. Moore S, Woodrow CF, McClelland DB. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh(D), (c), (E) and Fy. *Nature*. 1982;295(5849):529-31.
78. Saboori AM, Smith BL, Agre P. Polymorphism in the Mr 32,000 Rh protein purified from Rh(D)-positive and -negative erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(11):4042-5.
79. Le van Kim C, Mouro I, Cherif-Zahar B, Raynal V, Cherrier C, Cartron JP, et al. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(22):10925-9.
80. Arce MA, Thompson ES, Wagner S, Coyne KE, Ferdman BA, Lublin DM. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals. *Blood*. 1993;82(2):651-5.
81. Simsek S, de Jong CA, Cuijpers HT, Bleeker PM, Westers TM, Overbeeke MA, et al. Sequence analysis of cDNA derived from reticulocyte mRNAs coding for Rh polypeptides and demonstration of E/e and C/c polymorphisms. *Vox Sang*. 1994;67(2):203-9.
82. Blumenfeld OO, Patnaik SK. Allelic genes of blood group antigens: a source of human mutations and cSNPs documented in the Blood Group Antigen Gene Mutation Database. *Human mutation*. 2004;23(1):8-16.
83. Tippett P. A speculative model for the Rh blood groups. *Annals of human genetics*. 1986;50(3):241-7.
84. Daniels G, Castilho L, Flegel WA, Fletcher A, Garratty G, Levene C, et al. International Society of Blood Transfusion Committee on terminology for red blood cell surface antigens: Macao report. *Vox Sang*. 2009;96(2):153-6.
85. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*. 2000;95(12):3662-8.
86. Wagner T, Kormoczi GF, Buchta C, Vadon M, Lanzer G, Mayr WR, et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*. 2005;45(4):520-6.
87. Khademi S, O'Connell J, 3rd, Remis J, Robles-Colmenares Y, Miercke LJ, Stroud RM. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science (New York, NY)*. 2004;305(5690):1587-94.
88. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*. 1999;93(1):385-93.

89. Sun CF, Chou CS, Lai NC, Wang WT. RHD gene polymorphisms among RhD-negative Chinese in Taiwan. *Vox Sang.* 1998;75(1):52-7.
90. Wagner FF, Ladewig B, Flegel WA. The RHCE allele ceRT: D epitope 6 expression does not require D-specific amino acids. *Transfusion.* 2003;43(9):1248-54.
91. Chen Q, Hustinx H, Flegel WA. The RHCE allele ceSL: the second example for D antigen expression without D-specific amino acids. *Transfusion.* 2006;46(5):766-72.
92. Beckers EA, Porcelijn L, Ligthart P, Vermey H, Von dem Borne AE, Overbeeke MA, et al. The RoHar antigenic complex is associated with a limited number of D epitopes and alloanti-D production: a study of three unrelated persons and their families. *Transfusion.* 1996;36(2):104-8.
93. Westhoff CM. Review: the Rh blood group D antigen... dominant, diverse, and difficult. *Immunohematology.* 2005;21(4):155-63.
94. Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood.* 1991;78(10):2747-52.
95. Snhmidt PJ, Morrison EG, Shohl J. The antigenicity of the Rh-o (Du) blood factor. *Blood.* 1962;20:196-202.
96. Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. *Transfusion.* 2005;45(10):1581-4.
97. Flegel WA, Khull SR, Wagner FF. Primary anti-D immunization by weak D type 2 RBCs. *Transfusion.* 2000;40(4):428-34.
98. Mota M, Fonseca NL, Rodrigues A, Kutner JM, Castilho L. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sang.* 2005;88(2):130-5.
99. Ness PM. To match or not to match: the question for chronically transfused patients with sickle cell anemia. *Transfusion.* 1994;34(7):558-60.
100. Vichinsky EP, Luban NL, Wright E, Olivieri N, Driscoll C, Pegelow CH, et al. Prospective RBC phenotype matching in a stroke-prevention trial in sickle cell anemia: a multicenter transfusion trial. *Transfusion.* 2001;41(9):1086-92.
101. Daniels GL, Fletcher A, Garratty G, Henry S, Jorgensen J, Judd WJ, et al. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sang.* 2004;87(4):304-16.
102. Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfusion medicine reviews.* 2007;21(1):58-71.
103. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood.* 2008;112(10):3939-48.
104. Palacajornsuk P. Review: molecular basis of MNS blood group variants. *Immunohematology.* 2006;22(4):171-82.
105. Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ, Miller LH. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science (New York, NY).* 1994;264(5167):1941-4.
106. Mayer DC, Cofie J, Jiang L, Hartl DL, Tracy E, Kabat J, et al. Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106(13):5348-52.
107. Westhoff CM, Reid ME. Review: the Kell, Duffy, and Kidd blood group systems. *Immunohematology.* 2004;20(1):37-49.
108. Byrne KM, Byrne PC. Review: other blood group systems--Diego, Yt, Xg, Scianna, Dombrock, Colton, Landsteiner-Wiener, and Indian. *Immunohematology.* 2004;20(1):50-8.
109. Wagner FF, Poole J, Flegel WA. Scianna antigens including Rd are expressed by ERMAP. *Blood.* 2003;101(2):752-7.

110. Broadberry RE, Lin M. The incidence and significance of anti-"Mia" in Taiwan. *Transfusion*. 1994;34(4):349-52.
111. Crew VK, Green C, Daniels G. Molecular bases of the antigens of the Lutheran blood group system. *Transfusion*. 2003;43(12):1729-37.
112. Lee S, Zambas ED, Marsh WL, Redman CM. Molecular cloning and primary structure of Kell blood group protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(14):6353-7.
113. Kormoczi GF, Scharberg EA, Gassner C. A novel KEL*1,3 allele with weak Kell antigen expression confirming the cis-modifier effect of KEL3. *Transfusion*. 2009;49(4):733-9.
114. Noizat-Pirenne F, Lee K, Pennec PY, Simon P, Kazup P, Bachir D, et al. Rare RHCE phenotypes in black individuals of Afro-Caribbean origin: identification and transfusion safety. *Blood*. 2002;100(12):4223-31.
115. Vege S, Westhoff CM. Molecular characterization of GYPB and RH in donors in the American Rare Donor Program. *Immunohematology*. 2006;22(3):143-7.
116. Reid ME, Rios M, Powell VI, Charles-Pierre D, Malavade V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion*. 2000;40(1):48-53.
117. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet (London, England)*. 1997;350(9076):485-7.
118. Ripoche P, Bertrand O, Gane P, Birkenmeier C, Colin Y, Cartron JP. Human Rhesus-associated glycoprotein mediates facilitated transport of NH(3) into red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(49):17222-7.
119. Russell RT, Carlin A, Ashworth M, Welch CR. Diffuse placental chorioangiomas and fetal hydrops. *Fetal diagnosis and therapy*. 2007;22(3):183-5.
120. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens LG, de Haas M. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2006;13(1-2):53-7.
121. Weiner ID, Miller RT, Verlander JW. Localization of the ammonium transporters, Rh B glycoprotein and Rh C glycoprotein, in the mouse liver. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1432-40.
122. Westhoff CM, Wylie DE. Transport characteristics of mammalian Rh and Rh glycoproteins expressed in heterologous systems. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2006;13(1-2):132-8.
123. Ganapathy R, Guven M, Sethna F, Vivekananda U, Thilaganathan B. Natural history and outcome of prenatally diagnosed cystic hygroma. *Prenatal diagnosis*. 2004;24(12):965-8.
124. Van den Veyver IB, Moise KJ, Jr. Fetal RhD typing by polymerase chain reaction in pregnancies complicated by rhesus alloimmunization. *Obstetrics and gynecology*. 1996;88(6):1061-7.
125. Judd WJ, Moulds M, Schlanser G. Reactivity of FDA-approved anti-D reagents with partial D red blood cells. *Immunohematology*. 2005;21(4):146-8.
126. Pertl B, Pieber D, Panzitt T, Haeusler MC, Winter R, Tului L, et al. RhD genotyping by quantitative fluorescent polymerase chain reaction: a new approach. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2000;107(12):1498-502.
127. Hopkins DF. Maternal anti-Rh(D) and the D-negative fetus. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1970;108(2):268-71.
128. Crombleholme TM, Coleman B, Hedrick H, Liechty K, Howell L, Flake AW, et al. Cystic adenomatoid malformation volume ratio predicts outcome in prenatally diagnosed cystic adenomatoid malformation of the lung. *Journal of pediatric surgery*. 2002;37(3):331-8.

129. Adzick NS, Harrison MR, Crombleholme TM, Flake AW, Howell LJ. Fetal lung lesions: management and outcome. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998;179(4):884-9.
130. Ierullo AM, Ganapathy R, Crowley S, Craxford L, Bhide A, Thilaganathan B. Neonatal outcome of antenatally diagnosed congenital cystic adenomatoid malformations. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2005;26(2):150-3.
131. Smith RP, Illanes S, Denbow ML, Soothill PW. Outcome of fetal pleural effusions treated by thoracoamniotic shunting. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2005;26(1):63-6.
132. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *American journal of human genetics*. 1998;62(4):768-75.
133. Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, Sullivan LM, Borgatta L, Bianchi DW, et al. Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination of pregnancy. *Fertility and sterility*. 2004;81(3):638-44.
134. Picone O, Benachi A, Mandelbrot L, Ruano R, Dumez Y, Dommergues M. Thoracoamniotic shunting for fetal pleural effusions with hydrops. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2004;191(6):2047-50.
135. Moise KJ. Fetal RhD typing with free DNA in maternal plasma. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2005;192(3):663-5.
136. Rodeck CH, Fisk NM, Fraser DI, Nicolini U. Long-term in utero drainage of fetal hydrothorax. *The New England journal of medicine*. 1988;319(17):1135-8.
137. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *The New England journal of medicine*. 1998;339(24):1734-8.
138. Wilson RD, Baxter JK, Johnson MP, King M, Kasperski S, Crombleholme TM, et al. Thoracoamniotic shunts: fetal treatment of pleural effusions and congenital cystic adenomatoid malformations. *Fetal diagnosis and therapy*. 2004;19(5):413-20.
139. Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood--a meta-analysis. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2006;195(4):1163-73.
140. Eddleman KA, Levine AB, Chitkara U, Berkowitz RL. Reliability of pleural fluid lymphocyte counts in the antenatal diagnosis of congenital chylothorax. *Obstetrics and gynecology*. 1991;78(3 Pt 2):530-2.
141. Manzanares S, Entrala C, Sanchez-Gila M, Fernandez-Rosado F, Cobo D, Martinez E, et al. Noninvasive fetal RhD status determination in early pregnancy. *Fetal diagnosis and therapy*. 2014;35(1):7-12.
142. Finning K, Martin P, Summers J, Daniels G. Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion*. 2007;47(11):2126-33.
143. Gray RG, Green A. Diagnosis and management of non-immune hydrops in the newborn. *Archives of disease in childhood*. 1994;71(2):F148-9.
144. Bowman JM. Treatment options for the fetus with alloimmune hemolytic disease. *Transfusion medicine reviews*. 1990;4(3):191-207.
145. Nagel HT, de Haan TR, Vandenbussche FP, Oepkes D, Walther FJ. Long-term outcome after fetal transfusion for hydrops associated with parvovirus B19 infection. *Obstetrics and gynecology*. 2007;109(1):42-7.

146. van Kamp IL, Klumper FJ, Bakkum RS, Oepkes D, Meerman RH, Scherjon SA, et al. The severity of immune fetal hydrops is predictive of fetal outcome after intrauterine treatment. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2001;185(3):668-73.
147. Graves GR, Baskett TF. Nonimmune hydrops fetalis: Antenatal diagnosis and management. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1984;148(5):563-5.
148. Ringer SA, Stark AR. Management of neonatal emergencies in the delivery room. *Clinics in perinatology*. 1989;16(1):23-41.
149. Howell PJ, Brown SE, Dike AE, Inskip MJ. The significance of anti-c alloimmunization in pregnancy. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1986;93(10):1044-8.
150. Wenk RE, Goldstein P, Felix JK. Alloimmunization by hr'(c), hemolytic disease of newborns, and perinatal management. *Obstetrics and gynecology*. 1986;67(5):623-6.
151. Kozlowski CL, Lee D, Shwe KH, Love EM. Quantification of anti-c in haemolytic disease of the newborn. *Transfusion medicine (Oxford, England)*. 1995;5(1):37-42.
152. Hackney DN, Knudtson EJ, Rossi KQ, Krugh D, O'Shaughnessy RW. Management of pregnancies complicated by anti-c isoimmunization. *Obstetrics and gynecology*. 2004;103(1):24-30.
153. Spong CY, Porter AE, Queenan JT. Management of isoimmunization in the presence of multiple maternal antibodies. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2001;185(2):481-4.
154. Jernman R, Stefanovic V, Korhonen A, Haimila K, Sareneva I, Sulin K, et al. Case report: Severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-C+G. *Immunohematology*. 2015;31(3):123-7.
155. Joy SD, Rossi KQ, Krugh D, O'Shaughnessy RW. Management of pregnancies complicated by anti-E alloimmunization. *Obstetrics and gynecology*. 2005;105(1):24-8.
156. Trevett TN, Jr., Moise KJ, Jr. Twin pregnancy complicated by severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-g and anti-C. *Obstetrics and gynecology*. 2005;106(5 Pt 2):1178-80.
157. de Haas M, Thurik FF, Koelewijn JM, van der Schoot CE. Haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang*. 2015;109(2):99-113.
158. Caine ME, Mueller-Heubach E. Kell sensitization in pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1986;154(1):85-90.
159. Bowman JM, Pollock JM, Manning FA, Harman CR, Menticoglou S. Maternal Kell blood group alloimmunization. *Obstetrics and gynecology*. 1992;79(2):239-44.
160. Stone B, Marsh WL. Haemolytic Disease of the Newborn Caused by Anti-M. *British journal of haematology*. 1959;5(4):344-7.
161. Duguid JKM, Bromilow IM, Entwistle GD, Wilkinson R. Haemolytic Disease of the Newborn due to Anti-M. *Vox Sanguinis*. 1995;68(3):195-6.
162. Matsumoto H, Tamaki Y, Sato S, Shibata K. A case of hemolytic disease of the newborn caused by anti-M: serological study of maternal blood. *Acta Obstet Gynaecol Jpn*. 1981;33(4):525-8.
163. Furukawa K, Nakajima T, Kogure T, Yazaki K, Yoshida M, Fukaishi T, et al. Example of a woman with multiple intrauterine deaths due to anti-M who delivered a live child after plasmapheresis. *Experimental and clinical immunogenetics*. 1993;10(3):161-7.
164. Duguid JK, Bromilow IM, Entwistle GD, Wilkinson R. Haemolytic disease of the newborn due to anti-M. *Vox Sang*. 1995;68(3):195-6.
165. Kanra T, Yuce K, Ozcebe IU. Hydrops fetalis and intrauterine deaths due to anti-M. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 1996;75(4):415-7.
166. De Young-Owens A, Kennedy M, Rose RL, Boyle J, O'Shaughnessy R. Anti-M isoimmunization: management and outcome at the Ohio State University from 1969 to 1995. *Obstetrics and gynecology*. 1997;90(6):962-6.

167. Telischi M, Behzad O, Issitt PD, Pavone BG. Hemolytic disease of the newborn due to anti-N. *Vox Sang.* 1976;31(2):109-16.
168. 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 the Netherlands. *Transfusion.* 2008;48(5):941-52.
169. Shulman IA, Nakayama R, Calderon C. The sensitivity of antibody detection testing using pooled versus unpooled reagent red cells. *Immunohematology.* 1991;7(1):16-9.
170. 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;48(8):1721-9.
171. Engelfriet CP, Reesink HW, Judd WJ, Ulander VM, Kuosmanen M, Koskinen S, et al. Current status of immunoprophylaxis with anti-D immunoglobulin. *Vox sanguinis.* 2003;85(4):328-37.
172. Howard H, Martlew V, McFadyen I, Clarke C, Duguid J, Bromilow I, et al. Consequences for fetus and neonate of maternal red cell allo-immunisation. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition.* 1998;78(1):F62-6.
173. Hardy J, Napier JA. Red cell antibodies detected in antenatal tests on rhesus positive women in South and Mid Wales, 1948-1978. *British journal of obstetrics and gynaecology.* 1981;88(2):91-100.
174. Florea DP. [The importance of laboratory diagnosis in allo-immunization through pregnancy and hemolytic disease of the newborn]. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi.* 2010;114(1):211-3.
175. British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task F, Gooch A, Parker J, Wray J, Qureshi H. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. *Transfusion medicine.* 2007;17(4):252-62.
176. de Vrijer B, Harthoorn-Lasthuizen EJ, Oosterbaan HP. [The incidence of irregular antibodies in pregnancy: a prospective study in the region of the 's-Hertogenbosch]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde.* 1999;143(50):2523-7.
177. Dajak S, Stefanovic V, Capkun V. Severe hemolytic disease of fetus and newborn caused by red blood cell antibodies undetected at first-trimester screening (CME). *Transfusion.* 2011;51(7):1380-8.
178. Basu S, Kaur R, Kaur G. Hemolytic disease of the fetus and newborn: Current trends and perspectives. *Asian journal of transfusion science.* 2011;5(1):3-7.
179. Geifman-Holtzman O, Wojtowycz M, Kosmas E, Artal R. Female alloimmunization with antibodies known to cause hemolytic disease. *Obstetrics and gynecology.* 1997;89(2):272-5.
180. Towns D, Hannon J, Hendry J, Barnes J, Goldman M. Hemolytic disease of the fetus and newborn caused by an antibody to a low-prevalence antigen, anti-SARA. *Transfusion.* 2011;51(9):1977-9.
181. Chandrasekar A, Morris KG, Tubman TR, Tharma S, McClelland WM. The clinical outcome of non-RhD antibody affected pregnancies in Northern Ireland. *The Ulster medical journal.* 2001;70(2):89-94.
182. Gunduz E, Meltem Akay O, Teke HU, Gulbas Z. Incidence of red-cell alloimmunization due to non-anti-D antibodies during pregnancy: an experience from Turkey. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis.* 2010;43(3):261-3.
183. Kornstad L. New cases of irregular blood group antibodies other than anti-D in pregnancy. Frequency and clinical significance. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica.* 1983;62(5):431-6.

184. van Dijk BA, Hirasing RA, Overbeeke MA. [Hemolytic disease of the newborn and irregular blood group antibodies in the Netherlands: prevalence and morbidity]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*. 1999;143(28):1465-9.
185. Onesimo R, Rizzo D, Ruggiero A, Valentini P. Intravenous Immunoglobulin therapy for anti-E hemolytic disease in the newborn. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2010;23(9):1059-61.
186. Tondon R, Kataria R, Chaudhry R. Anti-M: Report of two cases and review of literature. *Asian journal of transfusion science*. 2008;2(2):81-3.
187. Gao XY, Huang H, Li LD. [Hemolytic disease of neonates due to anti-M: report of one case and review of reports of 21 cases]. *Zhonghua er ke za zhi = Chinese journal of pediatrics*. 2009;47(9):648-52.
188. Babinszki A, Lapinski RH, Berkowitz RL. Prognostic factors and management in pregnancies complicated with severe kell alloimmunization: experiences of the last 13 years. *American journal of perinatology*. 1998;15(12):695-701.
189. Carbonne B, Castaigne V, Cynober E, Levy R, Cortey A, Mailloux A, et al. [Follow-up of pregnancies with red-cell allo-immunisation: State-of-the art]. *Gynecologie, obstetrique & fertilite*. 2010;38(3):205-13.