

The first case of hydrops foetalis caused by anti-Js^a. A case report and suggestions on the antenatal diagnosis of haemolysis due to antibodies against rare antigens

Alvaro Ringressi¹, Laura Falchi², Alessandra Magrini², Enrico Periti², Gabriele Graziani¹

¹Dipartimento di Medicina di Laboratorio, SIMT, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi-Firenze

²Dipartimento di Ginecologia, Perinatologia e Riproduzione Umana, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi-Firenze, Italia

The case described below shows that anti-Js^a antibodies can be responsible for severe foetal anaemia, just as can the other antibodies to the Kell system.

The Js^a antigen is extremely rare among Caucasians (0.01%), while it is present on the red blood cells of 20% of Blacks. Only two other cases of alloimmunisation caused by anti-Js^a have been reported in the literature, one in 1973¹ and the other in 1979²; in both these cases the only problem was delayed neonatal anaemia requiring, in the first case, two transfusions to the neonate and, in the second, only phototherapy. We present here the first ever case of foetal hydrops caused by anti-Js^a and describe the consequent *in utero* transfusion therapy.

This case also shows that when there is a clinical suspicion of haemolytic disease of the newborn (HDN) or an additional risk of HDN for ethnic reasons, meticulous immunohaematological investigations are needed even if the indirect antiglobulin test (IAT) on the maternal serum is negative.

Case report

T.S., a 32-year old Caucasian woman (gravidia 4, para 2) was referred to us in the 20th week of pregnancy because of a decrease in foetal movements. Ultrasonography of the foetus revealed ascites, bilateral pleural effusions and a pericardial effusion. The patient had no current or past general medical conditions of note. The obstetric and immunohaematological history was as follows: the woman

Il caso, che viene descritto di seguito, dimostra che anche gli anticorpi anti-Js^a possono essere responsabili di gravi sindromi anemiche fetali come gli altri anticorpi del sistema Kell.

L'antigene Js^a è estremamente raro nei soggetti caucasici (0,01%), mentre è presente sulle emazie del 20% dei soggetti di razza negra. In letteratura sono stati riportati solo altri due casi di isoimmunizzazione da anti-Js^a, nel 1973¹ e nel 1979²; in entrambi, si è avuta solo anemia neonatale tardiva che ha richiesto, nel primo caso, due trasfusioni neonatali e nel secondo soltanto fototerapia. Non è mai stato descritto alcun caso di idrope fetale da anti-Js^a e di conseguente terapia trasfusionale *in utero*, prima della presente segnalazione.

Questo caso mette in evidenza anche come, in situazioni di sospetta MEN clinica o di rischio aggiuntivo di MEN per motivi etnici, sia necessario approfondire l'indagine immunoematologica anche se il test indiretto all'antiglobulina (TIA) sul siero materno risulta negativo.

Descrizione del caso

T.S. caucasica, di 32 anni (gravidia 4, para 2), giunge alla nostra osservazione alla ventesima settimana di gestazione per una riduzione dei movimenti fetali. All'indagine ecografica fetale si riscontra la presenza di ascite con versamento pleurico bilaterale e pericardico.

L'anamnesi della paziente è negativa per patologie prossime e remote.

Dall'anamnesi ostetrica e immunoematologica emergono i seguenti dati: nessuna terapia trasfusionale o episodio potenzialmente immunizzante verso antigeni eritrocitari, a parte le gravidanze. La prima gravidanza fu interrotta volontariamente. Il feto era stato concepito da

Received: 29 November 2004 - Accepted: 31 January 2005

Correspondence:

Dott. Alvaro Ringressi

Via G. Barbera 31

50134 Firenze - Italia

E-mail: a.ringressi@virgilio.it

had never received transfusion therapy and had had no episodes of potential immunisation against red blood cell antigens except for her pregnancies. Her first pregnancy was terminated voluntarily. The father of this foetus was a Caucasian and was different from and not consanguineous with the patient's current partner. The second pregnancy, conceived with the current partner, a Caucasian, was carried until the 31st week when the foetus was delivered by Caesarean section because of the presence of hydrops foetalis. The neonate died a month later from a *Candida* infection. The aetiology of the hydrops was not identified. The third pregnancy, again conceived with the current partner, was brought to term without complications and the neonate was delivered by Caesarean section.

The patient reported that this fourth pregnancy had proceeded normally; haematological and blood chemistry tests and ultrasound examinations had been within the norm; amniocentesis carried out in the 16th had shown a normal male karyotype; the level of alpha-fetoprotein was within the norm, the IAT was negative and the maternal blood group was B, D+, kk.

Materials and methods

Immunohaematological investigations

The procedures involving the use of Coombs' serum were carried out with BioVue, LISS and red blood cell resuspension solution from the Ortho company (Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA). The red blood cell tests used were Surgiscreen, Panel B and Panel C from Ortho and Panel Twenty from Gamma (Gamma Biologicals, Houston, TX, USA).

The diagnostic sera employed for typing the red cells and the ficin solution were from the Ortho company. We used Elukit II from Gamma Biologicals for the elution and Elu-Ega, from the same company, for treating the red blood cells with glycine acid³. In all cases, we followed the manufacturers' instructions when performing the investigations. Aminoethylsothiouraneium bromide (AET; Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) powder was used for the treatment with AET, according to the procedure described by Advani *et al.*⁴.

Other investigations

The serological tests were carried out as described by the manufacturers. The ultrasound examinations were performed with an ATL 5000 with a multifrequency convex

un partner di razza caucasica, diverso e non consanguineo rispetto all'attuale. La seconda gravidanza, concepita dal partner attuale, caucasico, fu portata avanti fino alla 31[°] settimana quando, per la presenza di idrope fetale, fu eseguito un taglio cesareo.

Il neonato morì dopo un mese per infezione da candida. Non fu identificata l'eziologia dell'idrope. La terza gravidanza, sempre dall'attuale partner, fu portata a termine senza complicazioni e il parto si espletò, anche questo, mediante taglio cesareo.

Per questa quarta gravidanza la paziente riferisce decorso regolare della gestazione; gli esami ematochimici ed ecografici eseguiti risultano nella norma; l'amniocentesi eseguita alla 16[°] settimana mostra un cariotipo normale maschile; l'alfafetoproteina è regolare, il TIA è negativo, il gruppo sanguigno risulta B, D+, kk.

Materiali e metodi

Indagini immunoematologiche

Le procedure che prevedono l'utilizzo del siero di Coombs sono state eseguite con BioVue, LISS e soluzione di risospensione delle emazie della ditta Ortho (Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA). Le emazie test utilizzate sono state Surgiscreen, Panel B e Panel C della ditta Ortho e Panel Twenty della Gamma (Gamma Biologicals, Houston, TX, USA).

I sieri diagnostici utilizzati per le tipizzazioni eritrocitarie e la soluzione di ficina erano della ditta Ortho. Per l'eluizione abbiamo utilizzato Elukit II della ditta Gamma Biologicals e della stessa ditta abbiamo utilizzato Elu-Ega per il trattamento delle emazie con glicina acida³. Per tutte le procedure, abbiamo utilizzato le istruzioni della ditta produttrice. Per il trattamento con AET, abbiamo utilizzato la polvere AET (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA), secondo la procedura descritta da Advani ed altri⁴.

Altre indagini

I test sierologici sono stati eseguiti secondo le procedure descritte dalla ditta produttrice. Le indagini ecografiche sono state effettuate con ATL 5000 con sonda convex multifrequenza. La determinazione non invasiva dell'anemia fetale è stata eseguita mediante esame flussimetrico doppler su MCA (*Middle Cerebral Artery*), secondo il protocollo proposto da Mari *et al.*⁵. Il volume di sangue trasfuso in utero al feto è stato calcolato secondo la formula definita da Plecas *et al.*⁶.

Table I - Diagnostic investigations in the mother

- Blood group: B Rh(D) positive; kk
- Indirect antiglobulin test (IAT): negative
- Blood and biochemistry tests: within the norm
- Alpha-fetoprotein: within the norm
- Glucose challenge test: negative
- Kleihauer-Betke test: negative
- Serological tests (EBV, Rosolia, Toxoplasma, CMV, Syphilis, Parvovirus B19, HSV and Coxsackie virus): negative

probe. Foetal anaemia was non-invasively determined by Doppler flow measurements of the middle cerebral artery (MCA), using the protocol proposed by Mari *et al.*⁵. The volume of blood transfused *in utero* to the foetus was calculated using the formula described by Plecas *et al.*⁶.

Results

Antenatal diagnosis

Diagnostic procedures were performed in the mother (Table I) and the foetus, in order to determine the cause of the hydrops. The ultrasound examination of the foetus was repeated.

The findings were ascites, bilateral pleural effusion, pericardial effusion and hydrocoele; the foetal anatomy was apparently normal as was the echocardiographic examination. Flow studies of the middle cerebral artery showed a notable increase in the peak systolic velocity (MCA-PV = 47.6), a finding suggestive of foetal anaemia.

Cordocentesis was therefore planned and confirmed the marked foetal anaemia with erythroblastosis and reticulocytosis; markers of infection and enzyme tests to exclude metabolic disorders gave negative results (Table II). The foetal blood group was O, CcDee, kk; the direct antiglobulin test (DAT) was positive (3+ intensity for IgG). This set of data suggested a diagnosis of Haemolytic Foetal Disease.

Immunohaematological diagnosis

Having determined that there was not an ABO group incompatibility between the maternal serum and the foetal red blood cells, the antibodies demonstrated by the DAT were transferred by acid elution into solution. Using the LISS-Coombs procedure both the mother's serum and the eluate of the foetal red blood cells were tested with red blood cells from the father (group O, ccdee, kk), to determine whether they contained antibodies against antigens on

Table II - Cordocentesis

- Blood count: RBC 5.3×10^5 Hb 2.9g/dL Hct 6.9% MCV 130.2 Plt 241×10^3 WBC 9.98×10^3
- Erythroblasts 600 μ L Reticulocytes 8%
- Blood group: O, CcDee; kk
- Infection tests (Toxoplasma, CMV, Parvovirus, HSV, HZV, Coxsackie virus): negative
- Enzyme tests: negative
- Arterial blood gases: pH = 7.34; pCO ₂ = 44.4mmHg; pO ₂ = 14.5mmHg; Base excess = -1.4mmol/L
- Direct antiglobulin test (DAT): IgG pos. 3+

Risultati

Diagnosi prenatale

Viene attuato il protocollo diagnostico materno (Tabella I) e fetale per accertare la causa dell' idrope.

Viene ripetuta un'ecografia sul feto. Vengono riscontrate ascite, versamento pleurico bilaterale, versamento pericardico e idrocele; l'anatomia fetale risulta regolare e così l'esame ecocardiografico. La flussimetria sull'arteria cerebrale media mostra un notevole incremento del picco di velocità sistolica (MCA-PV = 47,6) suggestivo di anemia fetale.

Viene, quindi, programmata una cordocentesi che conferma l'importante anemia fetale con eritroblastosi e reticulocitosi; i test infettivi e i test enzimatici per escludere malattie del metabolismo risultano negativi (Tabella II). Il gruppo sanguigno fetale risulta O, CcDee, kk; il test all'antiglobulina diretto (TAD) risulta positivo (intensità 3+ per IgG). L'insieme dei dati indirizza la diagnosi verso una Malattia Emolitica fetale.

Diagnosi immunoematologica

Verificata l'assenza di incompatibilità ABO tra il siero della madre e le emazie fetali, mediante eluizione con acidi sono stati trasferiti in soluzione gli anticorpi evidenziati con il TAD.

Sia il siero della madre sia l'eluato dalle emazie fetali (EEF) sono stati testati con le emazie paterne (gruppo O ccdee, kk), per verificare se contenevano anticorpi diretti contro antigeni presenti su di esse, mediante la procedura LISS-Coombs.

Il risultato della reazione è stato positivo con intensità 3+ per il siero ed intensità 1+ per l'EEF, confermando la presenza sulle emazie paterne dell'antigene verso cui era diretto l'anticorpo presente sia nel siero della madre sia sulle emazie fetali. Per identificare la specificità anticorpale, sono state selezionate dai nostri pannelli diagnostici alcune

Table III - Results of IAT with a Js(a-) diagnostic cell panel and two samples of Js(a+) cells

	Js(a-) RBC*	Js(a+) RBC 1 st sample	Js(a+) RBC, 2 nd sample
Foetal eluate	Neg	Pos 1+	Pos 1+
Maternal serum	Neg	Pos 3+	Pos 3+

* 40 sample, RBC: red blood cells

Table V - Family Js^a and Js^b phenotypes

	Mother	Father	1 st child	2 nd child
Anti-Js ^a	Neg	Pos	Neg	Pos
Anti-Js ^b	Pos	Pos	Pos	Pos

the paternal red cells. The result of the reaction was positive at an intensity of 3+ for the maternal serum and 1+ for the foetal eluate, confirming that the father's red blood cells did carry an antigen against which there was an antibody in both the mother's serum and on the foetal red blood cells.

In order to identify the antibody specificity we selected some test red cells carrying private antigens, which were not in the screening panel used to carry out the IAT, from our diagnostic panels. The antigen specificities on these cells were: Lu^{a+}, Co^{b+}, Di^{a+}, Kp^{a+}, Js^{a+}, He+.

The cells were tested by IAT with both the maternal serum and the foetal red blood cell eluate.

The cells carrying the Js^a antigen gave a positive test result both with the maternal serum (3+ intensity) and with the foetal eluate (1+ intensity), while the others cells all gave negative results. The tests were repeated with a second Js^{a+} cell, again giving a positive result and with the other 40 cells of panels without private antigens, giving negative results (Table III).

For further confirmation the behaviour of the reaction was studied after treating the red cells with ficin, AET and glycine acid.

The reactivity profile was typical of antigens of the Kell system⁷, supporting the diagnosis of anti-Js^a (Table IV). The immunohaematological investigations were completed by a family study for the Js^a and Js^b antigens; Js^a antigen was absent from both the maternal red blood cells and those of the first child but present on the cells from the father and the second child (Table V).

Our conclusion was that this was a case of HDN caused by anti-Js^a. Titration against O Js (a+b+) red blood cells, carried out using the technique of dilution by doubling the solution of physiological saline in which the serum was being tested, gave a titre of 1:32.

Table IV - Results of IAT after treatment of Js(a+) RBC

	Tests of Js(a+) RBC treated with		
	Ficin	AET	Glycine acid
Foetal eluate	Pos 1+	Neg	Neg
Maternal serum	Pos 3+	Neg	Neg

AET = aminoethylsithiuronium bromide

emazie test portatrici di specificità antigeniche private, assenti nel pannello di screening utilizzato per l'esecuzione del TIA. Le specificità antigeniche disponibili su queste cellule erano: Lu^{a+}, Co^{b+}, Di^{a+}, Kp^{a+}, Js^{a+}, He+. Le cellule sono state testate mediante TIA sia con il siero della madre sia con l'EEF. La cellula portatrice dell'antigene Js^a è risultata positiva sia con il siero (intensità 3+) sia con l'EEF (intensità 1+), mentre le altre sono risultate negative. I test sono stati ripetuti con una seconda cellula Js^{a+} dando esito positivo e con le altre 40 cellule dei pannelli prive di antigeni privati, dando esito negativo (Tabella III).

Per ulteriore conferma, è stato studiato il comportamento della reazione dopo trattamento delle emazie test con ficina, AET e glicina acida. Si è avuto il tipico quadro di reattività degli antigeni del sistema Kell⁷ a conforto della diagnosi di anti-Js^a (Tabella IV).

Lo studio familiare per l'antigene Js^a e Js^b ha completato le indagini immunoematologiche, mostrando l'assenza dell'antigene Js^a sia negli eritrociti materni che in quelli del primo figlio e, al contrario, la loro presenza sia in quelli del padre che in quelli del secondo figlio (Tabella V).

Abbiamo concluso che ci si trovava di fronte ad una MEN da anti-Js^a. La titolazione contro emazie O Js (a+b+), eseguita con la tecnica delle diluizioni per raddoppio in soluzione fisiologica del siero materno, ha dato un valore di 1:32.

Terapia

Il giorno successivo alla cordocentesi, viene eseguita la prima trasfusione in utero (TIU) (trasfusi 40mL di globuli rossi concentrati di gruppo O neg Js^a, con Htc 70%). In seguito a tale trasfusione l'ematocrito e l'emoglobina sono passati da 10,6% e 3,2g/dL rispettivamente a 22,5% e 7,2g/dL. Lo stesso giorno viene indotta la maturazione polmonare fetale con Betametasone.

Il monitoraggio fetale si basa (Tabella VI) su NST (Non Stress Test) computerizzato ogni giorno, flussimetria su MCA ogni 2 giorni ed ecografia ostetrica per valutare la regressione dell'idrope, ogni 5 giorni. Da questi emerge il

Table VI - Foetal monitoring

Days of IUT	Monitoring
3	MCA-PV = 25.1
5	MCA-PV = 28.4
	Doppler flow in other foetal districts normal
	Ultrasound: hydrops unaltered
7	MCA-PV = 56.3
10	MCA-PV = 43.6
	Doppler flow in other foetal districts normal
	Ultrasound: hydrops unaltered

MCA-PV = peak systolic velocity in middle cerebral artery

Management

The day after the cordocentesis, the first in utero transfusion (IUT) was performed (40mL of group O neg Js^a-packed red cells with a haematocrit of 70% were transfused). Following this transfusion, the haematocrit and haemoglobin concentration rose from 10.6% and 3.2 g/dL, respectively, to 22.5% and 7.2g/dL. On the same day, foetal pulmonary maturation was induced with betamethasone. The foetal monitoring (Table VI) was based on daily, computerised non-stress tests, Doppler flow studies of the MCA every 2 days and foetal ultrasound, to evaluate the regression of the hydrops every 5 days. This monitoring revealed that the hydrops persisted and that foetal anaemia developed again after one week. A second IUT was administered 10 days after the first. In this case the values of the haematocrit and haemoglobin, respectively 17% and 5.6g/dL, rose to reach the values of 27% and 8.7g/dL post-IUT. Doppler flow studies of the MCA confirmed the regression of the foetal anaemia (MCA-PV=38.9). Four days after this second IUT, labour commenced spontaneously, so the foetus was delivered by Caesarean section in the 29th week. The neonate was hydropic, but alive and showed vital signs, weighed 1,500g and had an Apgar score of 5 - 7 - 8 (The Apgar score measures the state of well-being and vitality of a neonate. A semiquantitative evaluation of 5 signs - heart rate, spontaneous breathing, muscle tone, reflex activity and colour - is made at 1, 5 and 8 minutes after birth, attributing each a value. The sum of the single values at each evaluation time is the Apgar score. Normal values are between 7 and 10); cord pH was 7.45; haematocrit 25.6%; haemoglobin 8.2g/dL. The placenta weighed 730g. The neonate required paracentesis to improve respiratory function. Delayed anaemia on the 14th day necessitated transfusions of red blood cells, phototherapy and administration of erythropoietin. The neonate was discharged from hospital on day 51 after birth, weighing 2,130g, with a haematocrit of 25.6% and a haemoglobin concentration of 8.7g/dL. The neurological outcome was within the norm.

perdurare dell'idrope e la ricomparsa dell'anemia fetale dopo una settimana.

Viene eseguita una seconda TIU a distanza di 10 giorni dalla prima. Si parte da valori di ematocrito ed emoglobina rispettivamente di 17% e 5,6g/dL per arrivare a valori di 27% e 8,7g/dL post-TIU.

La flussimetria su MCA ci conferma la regressione dell'anemia fetale (MCA-PV=38.9).

Dopo 4 giorni dall'ultima TIU, insorge spontaneamente travaglio di parto, per cui viene eseguito taglio cesareo alla 29^a settimana. Il neonato idropico, ma vivo e vitale, pesa 1.500g e presenta I.A. 5 - 7 - 8 (I - V - VIII min.) (I.A.: Indice di Apgar - misura lo stato di salute e vitalità del neonato. Si fa una valutazione semiquantitativa di 5 segni: frequenza cardiaca, attività respiratoria spontanea, tono muscolare, eccitabilità riflessa, colorito, a 1, 5 e 8 minuti dalla nascita dando un punteggio. Le somme dei singoli punteggi ai singoli minuti rappresentano l'indice. I valori normali sono tra 7 e 10); pH funicolare di 7,45; ematocrito di 25,6%; emoglobina di 8,2g/dL. La placenta pesa 730 g. Il neonato richiede paracentesi per migliorare la funzione respiratoria. Si presenta anemia tardiva in 14^a giornata che richiede trasfusioni di globuli rossi, fototerapia e la somministrazione di eritropoietina. La dimissione avviene in 51^a giornata con un peso di 2.130g e livelli di ematocrito ed emoglobina rispettivamente di 25,6% e 8,7g/dL. L'*outcome* neurologico risulta nella norma.

Discussione

L'anemia provocata da anticorpi diretti contro antigeni del sistema Kell ha una duplice patogenesi.

Da una parte si ha emolisi dei globuli rossi positivi per l'antigene, dall'altra inibizione dei precursori eritroidi e mieloidi^{8,9}. Il monitoraggio di questo tipo di isoimmunizzazione è, di conseguenza, controverso, sia per il titolo critico, sia per la lettura del ΔOD (densità ottica delta del liquido amniotico), non più correlabile con il grado di anemia fetale.

Bowman *et al.*, nel 1992, hanno suggerito di utilizzare nella gestione delle isoimmunizzazioni da anticorpi diretti verso antigeni Kell un titolo critico di 1:8¹⁰; Mc Kenna *et al.*, nel 1999, hanno, invece, proposto, nella loro Rassegna, di comportarsi come nelle isoimmunizzazioni da anti-D (titolo critico di 1:32 e lettura del ΔOD)¹¹. In questo caso, il dato riguardante la titolazione dell'anticorpo, pur essendo ampiamente nell'ambito della significatività clinica per quanto riguarda gli anticorpi diretti contro antigeni del sistema Kell, non ci è stato utile per valutare la gravità della

Discussion

Anaemia caused by antibodies against antigens of the Kell system has a dual pathogenesis. On the one hand there is haemolysis of red cells carrying the antigen and, on the other hand, erythroid and myeloid precursors are inhibited^{8,9}. The monitoring of this type of alloimmunisation is therefore controversial, both as far as concerns the critical titre and the ΔOD (optical density of the amniotic fluid), which cannot be correlated to the degree of foetal anaemia. In 1992, Bowman *et al.* suggested managing alloimmunisation against Kell antigens in a similar way as for anti-D, but with a critical titre of 1:8¹⁰. In 1999, McKenna and colleagues made a different proposal in their review: they suggested exactly the same management as that for alloimmunisation by anti-D (i.e. a critical titre of 1:32 and ΔOD reading)¹¹. In our case the information about the antibody titre, although being well within the range of clinical significance as far as concerns antibodies against Kell system antigens, was not useful for appreciating the severity of the situation because it only became available after the diagnosis of HDN-induced hydrops foetalis had already been made by ultrasound, Doppler flow and cordocentesis investigations. In fact, the diagnosis of anaemia was made by Doppler flow studies of the middle cerebral artery, following the indications of Vaughan *et al.*⁸.

The mother had a obstetric history of a previous pregnancy complicated by hydrops foetalis, although the aetiopathogenesis of this had not been identified. It can be hypothesised that in this case too the cause was antibodies against Js^a. The presence of these antibodies in the fourth pregnancy and, more particularly, their titre and the virulence with which the HDN presented in a pregnancy apparently without complications that could have caused foeto-maternal haemorrhage, add support to this hypothesis. On the other hand, while it is understandable that the IAT in the second pregnancy was negative even if anti-Js^a was present, it seems improbable that a DAT at birth had not revealed the immune aetiopathogenesis of the hydrops. However, in our opinion, the very history of a previous case of hydrops of unknown aetiology should raise suspicion of an underlying HDN, even if the IAT is negative, given the possibility that the trigger could be antibodies against private antigens. This case shows that the demonstration of clinically significant antibodies, adhering to the foetal red blood cells themselves, is decisive for the diagnosis of HDN. A DAT must be carried out on the foetal cells and then the antibodies eluted and identified. In the case that both the maternal serum and the eluate of the foetal red blood cells are negative with the three cell tests used for antibody screening, it is advisable

situazione, perché è giunto solo quando la diagnosi di idrope fetale da MEN era stata fatta mediante ecografia, flussimetria e cordocentesi.

In effetti, la diagnosi di anemia è stata fatta tramite indagine flussimetrica sull'arteria cerebrale media, secondo le indicazioni di Vaughan *et al.*⁸. Dall'anamnesi risulta una precedente gravidanza complicata da idrope fetale, la cui eziopatogenesi non è stata chiarita. Si può ipotizzare che anche in questo caso gli agenti responsabili fossero gli anticorpi anti-Js^a.

La loro presenza in questa quarta gravidanza sono a favore di questa ipotesi, e soprattutto il loro titolo e la virulenza con cui la MEN si è presentata, in una gestazione apparentemente priva di complicanze favorevoli un'emorragia fetto-materna.

D'altro canto, se è comprensibile che nella seconda gravidanza il TIA, pur presente l'anti-Js^a, fosse risultato negativo, sembra improbabile che il TDA alla nascita, non abbia rivelato l'eziopatogenesi immune dell'idrope. Il dato anamnestico di una pregressa idrope di eziologia non chiara deve, comunque, a nostro avviso, dirigere il sospetto verso una sottostante MEN, anche quando il TIA risulti negativo, vista la possibilità che a scatenarla siano anticorpi diretti verso antigeni privati.

Questo caso porta in evidenza come, per la diagnosi di MEN, sia decisiva la dimostrazione di anticorpi clinicamente significativi, adesi alle emazie del feto stesso, sottoponendole a TDA e proseguendo successivamente con la loro eluizione ed identificazione.

Nel caso di negatività del siero materno e dell'eluato da emazie fetali, con le tre cellule test utilizzate per lo screening anticorpale, è consigliabile, in primo luogo escludere un coinvolgimento del sistema ABO, se c'è incompatibilità nell'ambito di questo sistema tra madre e neonato.

Poiché gli anticorpi del sistema ABO, che siano o meno identificati nell'eluato, potrebbero interferire con ulteriori accertamenti, dovrebbero essere rimossi dal siero e dall'eluato attraverso assorbimenti selettivi¹².

Successivamente il siero della madre e l'eluato dovrebbero essere cimentati con emazie paterne risospese al 3% in soluzione fisiologica, incubate a 37°C e con aggiunta di antiglobulina specifica anti-IgG.

La positività di questo test dimostra chiaramente la presenza di anticorpi diretti contro antigeni paterni e la necessità di ulteriori approfondimenti. Allo scopo, si potranno selezionare tra quelle dei pannelli di identificazione a disposizione, le cellule portatrici di antigeni rari. Potranno anche essere utilizzate, se disponibili, emazie rare conservate congelate per simili eventualità.

Tale approccio, può essere limitato in un primo momento, quando non sia possibile o ancora giudicato inopportuno

to exclude involvement of the ABO system, if there is incompatibility in this system between mother and neonate. Since antibodies to the ABO system can cause unwanted interference in further investigations, whether they are identified or not in the eluate, they must be selectively absorbed¹² and using a specific anti-IgG antiglobulin, at 37°C, the serum of the mother and the eluate must be tested against the paternal red blood cells resuspended in 3% physiological solution. Positivity of this test clearly demonstrates the presence of antibodies against paternal antigens and the necessity for further investigations. Cells carrying rare antigens can be selected from among identification panels or red blood cells with rare antigens, frozen for this purpose, can be used if available.

Initially, when it is still not possible or it is considered inappropriate to carry out cordocentesis, this approach may be limited to studies of maternal serum. This diagnostic strategy is not recommended routinely, but for selected cases, in which there is a high risk that the IAT will not detect maternal immunisation. Besides progressive hydrops, such cases include couples belonging to non-Caucasian ethnic groups and couples formed of people of different ethnic groups. In fact, it is known that ethnic diversity is also manifested at the level of the red cell antigen mosaic with non-Caucasians carrying antigens that are absent in other non-Caucasians and in the Italian population (and vice versa)¹³. This raises the problem of immunisation against red cell antigens that are not only absent from our screening test cells, but also from more extensive identification panels. Again in this case, in the absence of results from using identification panels, the test between maternal serum and paternal red blood cells can resolve the conundrum. As clearly shown by this case, HDN caused by antibodies against private red cell antigens is particularly serious and dangerous for the foetus. In fact, since the maternal IAT remains negative even at high titres of antibody, the diagnosis is made by routine ultrasound investigations or, when the pathological process has reached an advanced stage, by signs of foetal distress due to severe anaemia or overt hydrops.

As far as concerns the treatment of hydrops foetalis, we can confirm that, if this occurs in a period of gestation in which *in utero* transfusion can be performed, transfusions should definitely be given to alleviate the foetal anaemia, with the aims of allowing the pregnancy to proceed and preventing serious neurological sequelae¹⁴.

procedere ad una cordocentesi, al solo studio del siero della madre. Questo percorso diagnostico, non è proponibile di routine, ma in casi selezionati, in cui maggiore è il rischio che il TIA non risulti rivelatore di un'immunizzazione materna. Tra questi, oltre alla pregressa idrope, citiamo sia le coppie appartenenti a gruppi etnici diversi dal caucasico, sia le coppie formate da persone di diverso gruppo etnico.

È noto, infatti, che la diversità etnica ha un riscontro anche a livello del mosaico antigenico eritrocitario, con la presenza nei non caucasici di antigeni assenti in altri non caucasici e nelle nostre popolazioni (e viceversa)¹³. Ciò pone problemi di immunizzazione verso antigeni eritrocitari assenti, non solo sulle nostre cellule test di screening, ma anche nei più ampi pannelli di identificazione. Anche in questo caso, il test fra il siero della madre e le emazie del padre, se non si hanno risultati con l'utilizzo dei pannelli di identificazione, può essere risolutore.

Come dimostra chiaramente questo caso, le MEN da anticorpi diretti verso antigeni eritrocitari privati, sono particolarmente gravi e rischiose per il feto. Infatti, anche a fronte di alti titoli dell'anticorpo in gioco, rimanendo negativo il TIA materno, si arriva alla diagnosi, o per un routinario controllo ecografico o, a processo patologico ormai avanzato, per segni di sofferenza fetale da grave anemia o da idrope franca.

Per quanto riguarda la terapia, possiamo dire, in accordo con i dati della letteratura, che in presenza di idrope fetale, a un'epoca in cui è possibile effettuare la trasfusione in utero, questo è sicuramente il trattamento da attuare, nel tentativo di far regredire l'anemia fetale con l'intento sia di far proseguire la gravidanza che di evitare reliquati neurologici gravi¹⁴.

References

- 1) Donovan LM, Tripp KL, Zuckerman JE, Konugres AA. Hemolytic disease of the newborn due to anti-Js^a. *Transfusion* 1973; **13**: 153.
- 2) Levene C, Rudolphson Y, Shechter Y. A second case of hemolytic disease of the newborn due to anti-Js^a. *Transfusion* 1980; **20**: 714-5.
- 3) Louie J, Jiang A, Zaroulis C. Preparation of intact antibody free red blood cells in autoimmune hemolytic anemia (abstract). *Transfusion* 1986; **26**: 550.
- 4) Advani H, Zamor J, Judd WJ et al. Inactivation of Kell blood group antigens by 2-aminoethylsulfonium bromide. *Br J Haematol* 1982; **51**: 107-15.
- 5) Mari G, Deter RL, Carpenter RL et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *N Engl J Med* 2000; **342**: 9-14.
- 6) Plecas DV, Chtkara U, Berkowitz GS et al. Intrauterine intravascular transfusion for severe erythroblastosis fetalis: how much to transfuse. *Obstet Gynecol* 1990; **75**: 965-9.
- 7) Reid ME, Lomas-Francis C. *The Blood Group Antigen Facts Book*. New York, NY, Academic Press; 1997.
- 8) Vaughan JI, Manning M, Warwick RM et al. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. *N Engl J Med* 1998; **338**: 798-803.
- 9) Wagner T, Berer A, Lanzer G, Geissler K. Kell is not restricted to the erythropoietic lineage but is also expressed on myeloid progenitor cells. *Br J Haematol* 2000; **110**: 409-11.
- 10) Bowman JM, Pollock JM, Manning FA et al. Maternal Kell blood group alloimmunization. *Obstet Gynecol* 1992; **79**: 239-44.
- 11) McKenna DS, Nagaraja HN, O'Shaughnessy R. Management of pregnancies complicated by anti-Kell isoimmunization. *Obstet Gynecol* 1999; **93**: 667-73.
- 12) Judd WJ. *Methods in Immunohematology*. Durham, NC. Montgomery Scientific Publications; 1988.
- 13) Daniels G. *Human Blood Groups*. 2nd ed, Oxford. UK, Blackwell Science; 2002.
- 14) Collinet P, Subtil D, Puech F, Vaast P. Successful treatment of extremely severe fetal anemia due to Kell alloimmunization. *Obstet Gynecol* 2002; **100** : 1102-5.