



Р. П. Павлюк¹,
У. В. Тимошенко¹,
Г. А. Мироненко²,
Л. Н. Лавровська¹

¹ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», м. Київ,

²КНП «Київський міський центр крові»

© Колектив авторів

ЗНАЧЕННЯ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ СЛАБКИХ ФОРМ D АНТИГЕНУ ЕРИТРОЦИТАРНОЇ СИСТЕМИ RHESUS В КЛІНІЧНІЙ ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ Й АКУШЕРСТВІ

Резюме. Характеристики варіантів антигену Rhesus D мають важливе значення, оскільки саме від них залежить їх імуногенність і, відповідно, клінічне значення.

Мета. Ідентифікувати слабкі форми D антигену еритроцитарної системи Rhesus за допомогою доступних методів, дослідити їх частоту і визначити стратегію щодо інтерпретації резус-статусу індивіда.

Матеріали і методи. Визначена резус-належність 3501 донорів крові, уточнена — у 44 осіб. Дослідження проводили у реакціях гемаглютинації на площині, пробірках, непрямому тесті Кумбса, мікрометодом у гелі з анти-D IgM, анти-D IgG, анти-D/D^{VI} IgM/IgG, стандартним універсальним реагентом антирезус і стандартною сироваткою антирезус.

Результати та їх обговорення. Серед донорів D^{weak} склав 1 %, що не відрізняється від його частоти у європейців. 40 із 44 обстежених мали D^{weak} і віднесені до RhD+, 2 — D^{VI+} — до RhD-, з урахуванням світової практики скеровування особи з серологічно слабким D залежно від категорії обстежуваної особи.

Висновки. Через суттєві відмінності імунової відповіді осіб із D^{weak} та D^{partial} на D+ антигенний стимул доцільне поглиблене обстеження їх RhD-статусу для визначення трансфузійної й акушерської тактики.

Ключові слова: RhD група крові, серологічно слабкий D фенотип, трансфузія крові, резус-профілактика.

Вступ

Система Резус є найполіморфнішою із відомих на сьогодні 36 еритроцитарних систем груп крові і найімуногеннішою після системи АВО. Висока імуногенна активність антигену D визначає його клінічну значимість у трансфузіології та акушерстві, що пов'язано з ризиком розвитку гемолітичної хвороби новонароджених (ГХН) при вагітності резус-негативної (D-) жінки резус-позитивним (D+) плодом, а також із гемолітичними посттрансфузійними ускладненнями, які є наслідком алосенсibiliзації резус-негативних реципієнтів донорськими D+ еритроцитами [1].

Визначення резус-належності, зазвичай, визначають серологічними методами за допомогою моноклональних антитіл (МКА). Однак, результати не завжди однозначні через існування багаточисельних різновидів антигену D, серед яких виділяють слабкий антиген D — D^{weak} (відрізняється від нормального D антигену зниженою кількістю одиниць антигену D на еритроциті) і частковий (D^{partial}), який характеризується відсутністю одного або декількох епітопів антигену D [2].

Серологічні методи фенотипування еритроцитів, засновані на аглютинації еритроцитів

МКА, доступні, економічні, легко відтворювані і швидкі у виконанні. Вони специфічні і мають достатню чутливість, придатні для рутинних скринінгових досліджень, але не всі і не завжди виявляють варіанти антигену D.

Сучасні реагенти і методи дослідження дозволяють диференціювати варіанти D антигену і змінити політику щодо скеровування особи до D+ чи D-. Носіїв D^{weak} — і донорів і реципієнтів, відносять до резус-позитивних осіб, вони, в основному, не здатні виробляти анти-D антитіла і не потребують D- еритроцитів у разі необхідності трансфузії.

Носії D^{partial} — донори відносяться до резус-позитивних, тому що такі еритроцити є імуногенними і стимулюють синтез анти-D антитіл у D- реципієнтів, а реципієнти з D^{partial} — до резус-негативних, тому що при переливанні їм D+ еритроцитів вони здатні синтезувати анти-D антитіла до відсутніх епітопів антигену D. Це саме стосується і вагітних з D^{partial}, тому вони є кандидатами на введення анти-резус імуноглобуліну в разі належності еритроцитів плоду до D+ фенотипу [3].

Слабкі форми антигену D хоч і зустрічаються не так часто (від 0,2 до 1 % у європейській популяції) [4, 5], але їхня присутність на мембрані

еритроцита створює труднощі при визначенні резус-належності індивіда. Більшість серологічно слабких D-фенотипів виявляються, коли у вагітної жінки, потенційного реципієнта або донора при звичайному визначенні резус-належності ступінь аглютинації зразка еритроцитів слабкіша ($\leq 2+$), ніж очікувалося при типуванні RhD з використанням потужних анти-D реагентів (від 3+ до 4+). Крім того, серологічно слабкий фенотип D виявляється, коли клінічна лабораторія визначає зразок крові як D+, але в лабораторних даних про попереднє визначення RhD вказано D-.

Розбіжність може бути помилкою в ідентифікації пацієнта або зразка. Альтернативно, розбіжність може відображати підвищену активність нових моноклональних реагентів для встановлення RhD групи крові порівняно з анти-D-реагентами, які використовувалися раніше. Останні отримувалися із плазми та були менш ефективними для виявлення слабо експресованих D антигенів.

Метою досліджень

Ідентифікувати слабкі форми D антигену еритроцитарної системи Rhesus за допомогою доступних методів, дослідити їх частоту і визначити стратегію щодо інтерпретації резус-статусу індивіда.

Матеріали та методи досліджень

Нами обстежено 44 зразки еритроцитів осіб, різних за віком і діагнозом, спрямованих до лабораторії інституту для уточнення резус-належності через неоднозначність серологічних результатів, отриманих у різних імуногематологічних лабораторіях, що недало можливості остаточно визначити їх резус-належність (табл. 1).

Таблиця 1

Розподіл обстежених осіб

Група	Кількість	Вік
Вагітні	21	Від 21 до 38 років
Пацієнти із онкогематологічними захворюваннями	8	Від 3 міс. до 38 років
Інші	15	Від 16 до 59 років

Серед них майже половину склали вагітні жінки різних термінів вагітності — 21, онкогематологічні пацієнти — 8, інші (особи, які проходили обстеження для встановлення діагнозу або для внесення даних про групову і резус належність у документи) — 15 (табл. 2).

Також нами проаналізовано результати визначення резус-належності 3501 донорів крові Київського міського центру крові (дані групи апробації та паспортизації донорів квітень-травень 2018 р).

Для визначення резус-належності ми використовували МКА декількох фірм-виробників — діагностичний моноклональний реагент анти-D, анти-D/DVI IgM/IgG («Групотест», Україна), ЕРИПРОТЕСТ™-Цоліклони Анти-D Супер і Анти-D («Гематолог», Росія), стандартний універсальний реагент анти-D (в пробірках без підігріву) і стандартну сироватку анти-резус, що надходили до лабораторії на контроль якості із різних станцій переливання крові (Херсон, Кривий Ріг, Запоріжжя тощо). Дослідження здійснювали у реакції гемаглютинації на площині, у пробірках, у непрямому антиглобуліновому тесті (проба Кумбса), мікрометодом у гелевому тесті із застосуванням ID-карток з МКА DVI+, DVI-, LISS/Coombs (DiaMed-BioRad, Швейцарія).

Таблиця 2

Розподіл вагітних

Термін вагітності	Кількість
<10 тижнів	1
10-20 тижнів	10
21-25 тижнів	3
26-30 тижнів	5
> 30 тижнів	2

З огляду на накопичений нами досвід ідентифікації слабого D і диференціації його варіантів [6] визначення резус-належності здійснювали у наступній послідовності: на першому етапі зразки еритроцитів обстежували у реакції гемаглютинації на площині з використанням моноклонального реагенту з IgM анти-D антитілами або стандартного універсального реагенту. У разі отримання позитивної реакції зразок крові вважали резус-позитивним, у випадку негативної або нечіткої реакції, кров досліджували у реакції гемаглютинації із застосуванням МКА анти-D/D^{VI} IgM/IgG, у реакції конглоїнації з 10 % розчином желатину в пробірочному тесті та паралельно у пробі Кумбса із застосуванням цоліклону Анти-D (суміш МКА анти-D, специфічних до різних епітопів D, включаючи фенотип D^{VI}) та стандартних антирезус сироваток, що виготовляються із крові ізоімуних донорів і містять IgG антитіла, специфічні до більшості епітопів антигену D, тому за їх допомогою можна виявити слабкі варіанти D — (як D^{weak}, так і D^{partial}), і гелевим тестом із МКА D^{VI+} та D^{VI-}.

Зразки еритроцитів, що дали позитивний результат у непрямому антиглобуліновому тесті Кумбса, відносили до резус-позитивного типу, D^{weak} варіанту. При негативній реакції із МКА D^{VI-} і позитивній з D^{VI+} — зразок крові відносили до D^{partial} типу. Зразки крові також фенотипували за антигенами системи резус з використанням МКА анти-C, анти-c, анти-E та анти-e або ID-карток subgroups+K.



Результати досліджень та їх обговорення

Ми дослідили 44 зразки еритроцитів осіб, які були направлені до лабораторії через нечіткість або розходження результатів при первинному визначенні резус-належності в інших лабораторіях міста. В одному досліджуваному зразку виявлено дві популяції еритроцитів: D⁺ і D⁻, що свідчило про переливання несумісних за резус-фактором еритроцитів, і не дало змоги встановити резус-статус реципієнта на момент дослідження.

Більшість зразків еритроцитів при дослідженні з МКА анти-D IgG, анти-D/D^{VI} IgG/IgM дали позитивну реакцію (+) або сумнівну (+/-), 6 — негативну. При подальшому дослідженні у непрямому антиглобуліновому тесті у гелі з поліспецифічними IgG із 42 зразками еритроцитів отримано позитивний результат реакції (++)/(+++), крім того, із них, два зразки були позитивні з МКА D^{VI+} і негативні з D^{VI-}, один зразок еритроцитів показав негативний результат реакції зі всіма реагентами (табл. 3).

Таблиця 3

Результати реакції при диференціації серологічно слабкого D антигену

Фенотип еритроцитів/кількість зразків	Типи реагентів		
	Поліклональні антитіла	МКА анти-D ^{VI-}	МКА анти-D ^{VI+}
D ^{weak} / 40	++	++/+	++/+
D ^{partial} / 2	++	-	++
D ⁻ / 1	-	-	-

Отже, еритроцити 40 обстежених осіб мали слабкий варіант D антигену — D^{weak}, і їх резус-належність була визначена як резус-позитивна; два зразки еритроцитів вагітних віднесли до варіантного D фенотипу — D^{VI+}; один зразок еритроцитів кваліфікований як резус-негативний.

Із 43 зразків еритроцитів 34 були фенотиповані за системою резус. Дослідження показало, що 27 з них мали фенотип D^{weak} Csee, 1 — D^{weak} CCee, 1 — D^{weak} csee, 3 — D^{weak} CcEe, 1 — D^{partial} ccEe, 1 — D^{partial} Csee, тобто всі зразки еритроцитів із слабким D мали у своєму фенотипові антиген C або E.

Аналіз результатів визначення резус-належності 3501 донорів за допомогою МКА IgM показав, що 2901 з них мали D⁺ фенотип, 600 — D⁻, тобто 82,86 % були резус-позитивними, 17,14 % — резус-негативними. Далі зразки крові усіх резус-негативних донорів додатково були досліджені МКА реагентами анти-D/D^{VI} IgM/IgG у тесті на площині, анти-D IgG у реакції конглютинації з 10 % розчином желатину та у непрямому антиглобуліновому тесті мікрометодом у гелі, і визначений фенотип резус. У результаті встановлено: із 600 зразків еритроцитів 6 зразків, що складає 1 %, дали позитив-

ний результат у НАГТ. Це свідчить про наявність D^{weak} антигену на мембрані еритроцитів і, відповідно, належність цих донорів до резус-позитивних осіб. Фенотип за системою резус виявився таким: ccdEe — 8 осіб, Ccdee — 60, CcdEe — 1, CCdee — 3, тобто еритроцити 72 D-донорів мали у своєму фенотипові антигени C і E. Еритроцити з D^{weak} мали наступні фенотипи: D^{weak} Csee — 3, D^{weak} CCee — 2, D^{weak} CcEe — 1, тобто у 100 % випадків антиген D^{weak} асоціював з антигенами C і E.

Таким чином, резус-негативних донорів у дослідженій когорті із 3501 осіб було 522, що складає 14,91 %, але до цього числа не потрапили D-особи, які мають на поверхні еритроцитів ще C і/або E антиген, і тому зразки крові цих донорів були позначені для трансфузії як резус-позитивні.

Відсоток D-донорів у нашій вибірці дорівнював 16,97 % (594), що є дещо вищим за середній показник резус-негативних осіб в популяції (15 %), відсоток же слабких форм антигену D серед резус-негативних осіб склав 1 %, що не відрізняється від середньоєвропейського [7].

При невірно підібраних реагентах і методах дослідження резус-належність донорів із D^{weak} може бути врахована як резус-негативна та становити загрозу резус-сенсibilізації реципієнтів. Те ж саме стосується і еритроцитів D^{partial}, які можуть бути типовані як D⁻ і перелиті резус-негативним реципієнтам. Однак, імовірність такої ситуації дуже мала. По-перше, тому що самі слабкі форми D антигену зустрічаються відносно рідко. По-друге, донорів D⁻ завжди типують за антигенами C і E. У разі помилкового визначення парціального D або D^{weak} як D⁻, такі донори, швидше за все, будуть віднесені до резус-позитивних, оскільки антигени C і E супроводжують слабкий антиген D у 97 % випадків [8, 9].

По-третє, сучасні діагностичні реагенти анти-D виявляють слабкі і часткові D-антигени більшості категорій. Треба зазначити, що парціальні D-антигени так само імуногенні для резус-негативних реципієнтів, як еритроцити D⁺, що мають повний комплект епітопів, у цьому сенсі між звичайними і парціальними D-антигенами немає суттєвої різниці.

Таким чином, в результаті проведених досліджень в 42 із 43 зразків еритроцитів виявлений серологічно слабкий D антиген, що складає 97,7 %, на 40 зразках представлений D^{weak} і на двох — D^{partial}. Якби досліджені зразки еритроцитів були відібрані у донорів, то можна було б сказати, що резус-позитивний статус встановлений у всіх обстежених. Парціальний антиген D у донора не представляє ніякої загрози для реципієнта з нормальним D, на противагу парціальному D-антигену у реципієнта, пере-



ливання резус-позитивної крові якому може виявитися фатальним. Встановлено, що анти-D-антитіла, які виробляються до відсутніх епітопів у людей з частковим D, клінічно дуже важливі, вони виявлялись при аналізі причин посттрансфузійних ускладнень, у деяких випадках зі смертельними наслідками [10, 11].

Реципієнти з D^{weak}, як правило, не відповідають утворенням алоімуних антитіл на введення D⁺ еритроцитів, тому переливання їм D-еритроцитів не зовсім виправдане. А це дозволяє економити запаси резус-негативної крові, оскільки позбавляє від необгрунтованого переливання D- еритроцитів реципієнтам з D^{weak}, які являються фактично резус-позитивними.

Із 21 зразка еритроцитів вагітних, направлених до нас для уточнення резус-належності, 19 виявилися D^{weak}. Оскільки особи з D^{weak} практично не виробляють алоімуні анти-D антитіла, то і вагітні, як правило, не відповідають на антигенний стимул D⁺ плодом і не потребують резус-профілактики. Це не лише позбавляє їх непотрібної процедури, але і економить матеріальні кошти, тому що реагент для резус-профілактики недешевий. В разі потреби гемотрансфузії, їм можна переливати резус-позитивні еритроцити. У нашому дослідженні лише дві вагітні жінки з D^{VI} фенотипом віднесені нами до резус-негативних осіб, і відповідно, потребували резус-профілактики і переливання D- еритроцитів у разі необхідності.

Однозначна і швидка ідентифікація варіантів D антигену має важливе клінічне значення для визначення стратегії трансфузій. Політика щодо віднесення пацієнтів зі слабким D фенотипом до резус-позитивних застосовується в лабораторіях багатьох країн. Sandler S. і співавтори показали істотне зменшення (від 58,2 % до 19,8 %, P<001) кількості виконуваних трансфузій D-еритроцитів пацієнтам після тесту на слабкий D і скерування їх до резус-позитивних [12].

Приблизно 95 % кавказоїдів у Центральній Європі зі слабким фенотипом D мають D^{weak} тип 1, 2 або 3 і можуть бути безпечно скеровані як резус-позитивні. Цим особам безпечно пере-

ливати D⁺ еритроцити, так як вони не виробляють анти-D антитіл. Пояснюється це тим, що присутня кількість антигену D на еритроциті більше 400 копій є критичним значенням для виникнення імунних антитіл. Алоімунізація може спостерігатися у реципієнтів з деякими іншими слабкими типами D, в т.ч. слабким типом D 4.2, (DAR), тип 11, тип 15 тощо [3, 7, 13].

Не всі лабораторії у світі і в Україні на сьогодні обов'язково застосовують непрямий антиглобуліновий тест для виявлення слабого D фенотипу у реципієнтів, а деякі застосовують фенотипування еритроцитів на C антиген, враховуючи його високу позитивну асоціацію із D скеровують реципієнта, при його наявності, як резус-позитивного [9].

Остаточо встановити тип слабого D фенотипу можливо за допомогою полімеразноланцюгової реакції (ПЛР), що позбавляє необхідності у подальшому повторних досліджень резус-статусу особи та дозволяє економити час, людський ресурс та оперативно діяти у критичних ситуаціях [3].

Висновки

Сучасні уявлення про серологічно слабкий D фенотип і сучасні реагенти та методи дослідження майже завжди дозволяють диференціювати D^{weak} і D^{partial}, що має велике значення для визначення стратегії в трансфузіології і акушерській практиці.

2. Скерування осіб із слабким D до резус-позитивних дозволяє зберегти D- еритроцити від невиправданого їх застосування цієї категорії реципієнтів, а вагітних — від непотрібного введення анти-резус-імуноглобуліну під час вагітності і після пологів.

3. Дослідження D- осіб на присутність антигенів C та E може слугувати додатковим маркером можливої наявності серологічно слабких форм антигену D.

4. Застосування ПЛР є найбільш достовірним методом встановлення типу слабого D, що підвищує безпеку гемотрансфузійної терапії і профілактики ГХН.

REFERENCES

1. Pavlyuk RP, Isakova LM. Immunogenetic characteristic of the Rhesus-antigens and their clinical importance. Ukrainian Medical Journal. 2004 May;2(40):57-60. [In Ukrainian].
2. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Müller TH, et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. Blood. 2000 Apr;95(8):2699-708.
3. Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, Denomme GA, Delaney M, Keller MA, et al. It's time to phase-in RHD genotyping for patients with a serological weak D phenotype. Transfusion. 2015 Mar;55(3):680-9.
4. Müller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schünitzer D, et al. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. Transfusion. 2001 Jan;41(1):45-52.
5. Esteban R, Montero R, Flegel WA, Wagner FF, Subirana L, Parra R, et al. The D category VI type 4 allele is prevalent in the Spanish population. Transfusion. 2006 Apr;46(4):616-23.
6. Pavlyuk RP, Tymoshenko UV. Rhesus belonging identification at case of weak or partial forms of D antigen and their frequency among population of Central-Ukrainian



- genogeographical district. Hematology&Blood Transfusion. 2010 Dec;35:223-30.
7. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson M. The Blood Group Antigen Facts Book. 3 rd ed. San Diego: Academic Press; 2012. 758 p.
 8. Wagner FF, Gassner C, Мьллер TH, Schцnitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. Blood 1999 Jan; 93(1): 385-93.
 9. Scrinia I. Blood service of Latvia. Basic principles of immuno-hematological research of donors and recipients in Latvia. Hematology & blood transfusion: interdepartmental collection. 2019; 40: 251-60. [In Russian].
 10. Prasad MR, Krugh D, Rossi KQ, O'Shaughnessy RW. Anti-D in Rh positive pregnancies. Am J Obstet Gynecol. 2006 Oct; 195(4): 1158-62.
 11. Yazer MH, Triulzi DJ. Detection of anti-D in D— recipients transfused with D+ red blood cells. Transfusion. 2007 Dec; 47(12): 2197-201.
 12. Sandler SG, Roseff SD, Domen RE, Shaz B, Gottschall JL. Policies and procedures related to testing for weak D phenotypes and administration of Rh immune globulin: results and recommendations related to supplemental questions in the comprehensive transfusion medicine survey of the College of American Pathologists. Arch Pathol Lab Med 2014 May;138(5):620-5.
 13. Gu J, Sun A, Wang X, Shao C, Li Z, Huang L, et al. Analysis of density and epitopes of D antigen on the surface of erythrocytes from DEL phenotypic individuals carrying the RHD1227A allele. Blood Transfus. 2014 Apr;12(2):244-9.

**ЗНАЧЕНИЕ
ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
СЛАБЫХ ФОРМ
D АНТИГЕНА
ЭРИТРОЦИТАРНОЙ
СИСТЕМЫ RHESUS
В КЛИНИЧЕСКОЙ
ТРАНСФУЗИОЛОГИИ
И АКУШЕРСТВЕ**

**Р. П. Павлюк,
У. В. Тимошенко,
Г. А. Мироненко,
Л. Н. Лавровская**

Резюме. Характеристики вариантов антигена Rhesus D имеют важное значение, поскольку именно от них зависит их иммуногенность и, соответственно, клиническое значение.

Цель. Идентифицировать слабые формы D антигена эритроцитарной системы Rhesus с помощью доступных методов, исследовать их частоту и определить стратегию интерпретации резус-статуса индивида.

Материалы и методы. Определена резус-принадлежность 3501 доноров крови, уточнена — у человек. Исследования проводились в реакциях гемагглютинации на плоскости, пробирках, непрямом тесте Кумбса, микрометодом в геле с анти-D IgM, анти-D IgG, анти-D / DVI IgM / IgG, стандартным универсальным реагентом антирезус и стандартной сывороткой антирезус.

Результаты и их обсуждение. Среди доноров D^{weak} составил 1 %, что не отличается от его частоты у европейцев. 40 из 44 обследованных имели D^{weak} и отнесены к RhD⁺, 2 — D^{VI+} — к RhD[—], с учетом мировой практики учета лиц с серологически слабым D в зависимости от категории обследуемого.

Выводы. Через существенные различия иммунного ответа лиц с D^{weak} и D^{partial} на D⁺ антигенный стимул целесообразно проведение углубленного исследования их RhD статуса для определения трансфузионной и акушерской тактики.

Ключевые слова: RhD группа крови, серологически слабый D фенотип, трансфузия крови, резус-профилактика

THE VALUE OF
DIFFERENTIATION
OF WEAK FORMS OF
D ANTIGEN OF THE
ERYTHROCYTE SYSTEM
RHESUS IN CLINICAL
TRANSFUSIOLOGY AND
OBSTETRICS

*R. P. Pavlyuk,
H. A. Myronenko,
U. V. Tymoshenko*

Summary. The characteristics of variants of antigen D are important because their immunogenicity and, consequently, clinical value depend on them.

Objective. To identify weak forms of D antigen of the Rhesus erythrocyte system using available methods, to investigate their frequency and to determine a strategy for interpreting the rhesus status of the individual.

Materials and methods. Rhesus affiliation of 3501 blood donors was determined, RhD affiliation of 44 people was specified. The studies were performed in hemagglutination reactions on a plane, test tubes, indirect Coombs' test, micromethod in gel with MCA anti-D IgM, anti-D IgG, anti-D/DVI IgM/IgG, standard universal reagent anti-rhesus and standard serum antirhesus.

Results and discussion. D^{weak} was defined 1 % among donors, which is no different from its frequency among Europeans. 40 of the 44 subjects had D^{weak} and were classified as RhD +, 2 – D^{VI+} – as RhD–, taking into account the world practice of referring an individual with serologically weak D depending on the category of the subject.

Conclusions. Due to significant differences in the immune response of individuals with D^{weak} and D^{partial} to D + antigenic stimulus, in-depth examination of their RhD status is appropriate to determine transfusion and obstetric tactics.

Key words: RhD blood group, serologically weak D phenotype, blood transfusion, rhesus prophylaxis.