

# Utvrđivanje varijanti RhD antigena u opstetričkoj populaciji

---

**Lukačević Krstić, Jelena**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:274157>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**JELENA LUKAČEVIĆ KRSTIĆ**

**UTVRĐIVANJE VARIJANTI RHD ANTIGENA  
U OPSTETRIČKOJ POPULACIJI**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2019.**

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Split.

**Mentorica:** doc.dr.sc. Slavica Dajak, dr.med.

*Posvećeno mojoj djeci, bez kojih bi ovaj rad bio gotov još pred dvije godine,*

*Koja su mi pokazala da nije nužno spavati da bi živio,*

*I bez kojih ništa ne bi imalo smisla.*

*Voli vas mama.*

*Zahvaljujem svojoj mentorici Slavici Dajak na nesebično pruženom vodstvu, uloženom trudu,  
prijateljstvu i ogromnom strpljenju.*

*Zahvaljujem svim kolegicama, kolegama i suradnicima bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.*

*Hvala cijeloj mojoj strpljivoj obitelji; trebalo je ovo dočekati.*

## SADRŽAJ

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>1.</b> | <b>UVOD .....</b>  | <b>5</b>  |
| 1.1.      | RhD antigen.....   | 5         |
| 1.2.      | RhD imunizacija i hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta.....         | 6         |
| 1.2.1.    | Patofiziologija HBFN .....   | 6         |
| 1.2.2.    | Klinička slika HBFN.....   | 7         |
| 1.2.3.    | Prenatalne dijagnostičke metode primjenjive kod sumnje na HBFN .....     | 8         |
| 1.2.3.1.  | Neinvazivne prenatalne metode .....                                      | 8         |
| 1.2.3.2.  | Invazivne prenatalne metode.....   | 8         |
| 1.2.4.    | Procjena težine HBN.....   | 9         |
| 1.2.5.    | Liječenje HBFN .....   | 9         |
| 1.3.      | Imunoprofilaksa RhD imunizacije .....                                    | 10        |
| 1.3.1.    | Postnatalna imunoprofilaksa .....  | 11        |
| 1.3.2.    | Antenatalna imunoprofilaksa .....  | 11        |
| 1.4.      | Varijante RhD antigena .....   | 11        |
| 1.5.      | Određivanje RhD antigena serološkim metodama.....                        | 13        |
| 1.6.      | Određivanje RhD antigena kod D varijanti .....                           | 15        |
| <b>2.</b> | <b>CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....</b>                             | <b>19</b> |
| 2.1.      | Ciljevi.....   | 19        |
| 2.1.1.    | Studija 1:.....  | 19        |
| 2.1.2.    | Studija 2: .....   | 19        |
| 2.2.      | Hipoteze .....   | 19        |
| <b>3.</b> | <b>ISPITANICI I POSTUPCI.....</b>  | <b>20</b> |
| 3.1.      | Studija 1: Anti-D protutijela kod trudnica koje nisu RhD negativne ..... | 20        |
| 3.1.1.    | Izvori podataka.....   | 20        |
| 3.1.2.    | Serološko ispitivanje RhD antigena.....                                  | 21        |
| 3.1.2.1.  | Algoritam ispitivanja RhD antigena od 1993. do 2008. godine.....         | 21        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.1.2.2.  | Algoritam ispitivanja RhD antigena od 2008. do 2012. godine.....   | 21        |
| 3.1.3.    | <i>RHD</i> genotipizacija.....   | 21        |
| 3.1.4.    | Imunoprofilaksa u razdoblju 1993.-2012. godine.....  | 22        |
| 3.2.      | Studija 2: Odabir monoklonskih reagensa kod prepoznavanja varijanti RhD antigena.....  | 22        |
| 3.2.1.    | Rutinsko određivanje RhD antigena u mikrometodi .....  | 25        |
| 3.2.2.    | Prošireno serološko ispitivanje RhD antigena .....   | 25        |
| 3.2.3.    | <i>RHD</i> genotipizacija.....   | 26        |
| 3.2.3.1.  | Izolacija DNA .....  | 26        |
| 3.2.3.2.  | Lančana reakcija polimerazom (PCR) .....   | 26        |
| 3.2.3.3.  | PCR-SSP (engl. polymerase chain reaction with sequence-specific primers).....  | 26        |
| 3.2.3.4.  | <i>RHD</i> genotipizacija pomoću PCR-SSP metode.....   | 27        |
| 3.2.4.    | Imunoprofilaksa u razdoblju 2008.-2016. godine.....  | 27        |
| 3.3.      | Statistika.....  | 27        |
| 3.3.1.    | Studija 1: veličina uzorka.....  | 28        |
| 3.3.2.    | Studija 2: veličina uzorka.....  | 28        |
| <b>4.</b> | <b>REZULTATI .....</b>   | <b>29</b> |
| 4.1.      | Studija 1: RhD imunizacije kod trudnica koje nisu RhD negativne .....  | 29        |
| 4.1.1.    | Varijante RhD antigena koje su razvile anti-D protutijela.....   | 29        |
| 4.1.2.    | HBFN zbog RhD imunizacije kod majki s D varijantom .....   | 31        |
| 4.2.      | Studija 2: Reaktivnost monoklonskih reagensa kod prepoznavanja varijanti RhD antigena .....  | 33        |
| 4.2.1.    | Rezultati <i>RHD</i> genotipizacije .....  | 34        |
| 4.2.2.    | Rezultati proširenog serološkog ispitivanja slabih D varijanti .....   | 35        |
| 4.2.2.1.  | Rezultati serološkog ispitivanja slabih D antigena s monoklonskim reagensima IgM klase metodom direktne aglutinacije u epruveti.....       | 36        |
| 4.2.2.2.  | Rezultati serološkog ispitivanja slabih D antigena s monoklonskim reagensima IgG klase metodom indirektno aglutinacije u mikrometodi ..... | 38        |
| 4.2.3.    | Rezultati proširenog serološkog ispitivanja parcijalnih D varijanti.....   | 38        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 4.2.3.1.   | Rezultati serološkog ispitivanja parcijalnih D antigena s monoklonskim reagensima IgM klase metodom direktne aglutinacije u epruveti .....      | 38        |
| 4.2.3.2.   | Rezultati serološkog ispitivanja parcijalnih D antigena s monoklonskim reagensima IgG klase metodom indirektna aglutinacije u mikrometodi ..... | 39        |
| 4.2.4.     | Rh fenotip D varijanti .....  | 41        |
| <b>5.</b>  | <b>RASPRAVA .....</b>   | <b>43</b> |
| 5.1.       | RhD imunizacije kod trudnica koje nisu RhD negativne .....  | 43        |
| 5.2.       | Prevalencija varijanti RhD antigena i odabir monoklonskih reagensa kod njihovog prepoznavanja.....  | 44        |
| <b>6.</b>  | <b>ZAKLJUČAK.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>7.</b>  | <b>SAŽETAK.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>8.</b>  | <b>SUMMARY.....</b>   | <b>51</b> |
| <b>9.</b>  | <b>LITERATURA .....</b>   | <b>53</b> |
| <b>10.</b> | <b>ŽIVOTOPIS .....</b>  | <b>57</b> |

## **POPIS OZNAKA I KRATICA**

**AABB** -Američko udruženje banaka krvi (engl. *American Association of Blood Banks*)

**ACOG**–Američko društvo opstetričara i ginekologa (engl.*American College of Obstetricians and Gynecologists*)

**CAP**- Društvo američkih patologa (engl. *College of American Pathologists*)

**DAT**- direktni antiglobulinski test

**EDTA**- etilendiamintetraoctena kiselina

**GVHD**- bolest presatka protiv primatelja (engl. *graft versus host disease*)

**HBFN**- hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta

**IAT**- indirektni antiglobulinski test

**ISBT**- međunarodno udruženje za transfuziju krvi (engl. *International Society of Blood Transfusion*)

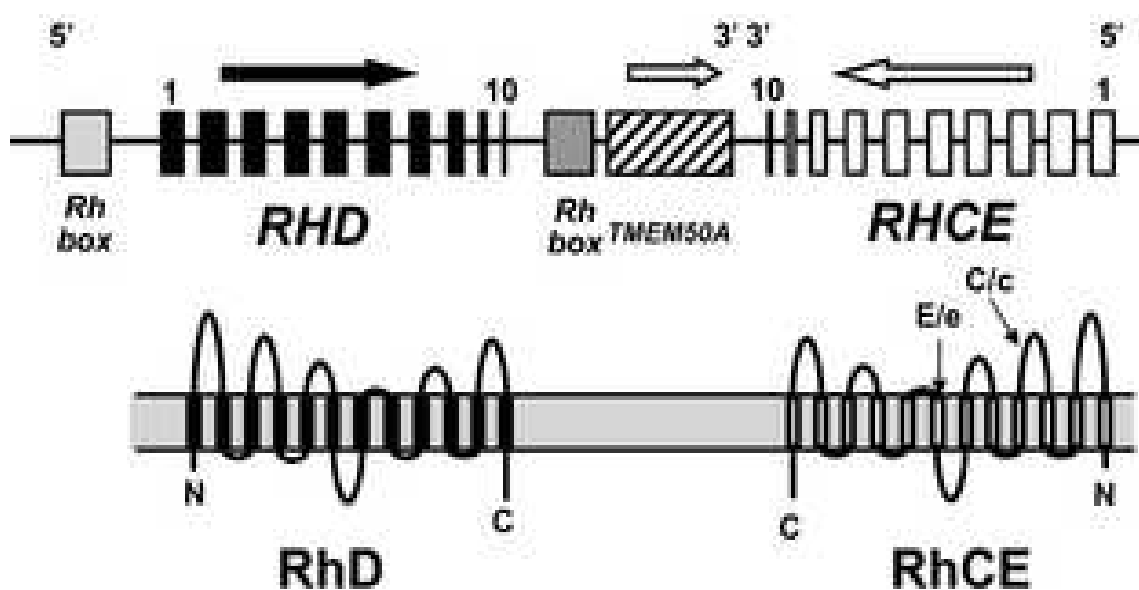
**PCR-SSP**- reakcija lančane polimeraze s početnicama specifičnima za sekvencu (engl. *polymerase chain reaction with sequence-specific primers*)



## 1. UVOD

### 1.1. RhD antigen

RhD je proteinski antigen eritrocitne membrane, kojeg na svojoj membrane ima 80-85% bijelaca, te se njihov RhD status naziva "RhD pozitivnim". Oko 15-20% bijelaca je RhD negativno. Antigen sačinjava 416 aminokiselina koje tvore polipeptid s 12 transmembranskih domena s amino i karboksilnim krajem u citoplazmi (Slika 1). Kod RhD pozitivnih osoba broj D antigenih mjesta na membrani iznosi do 33000 (1).



Slika 1. Shematski prikaz *RHD* i *RHCE* gena, te antigena koje kodiraju. Preuzeto iz (1)

RhD antigen je dio većeg antigenskog sustava koji se naziva Rh sustav. Antigeni Rh sustava su kodirani dvama genima, *RHD* (za RhD antigen) i *RHCE* (za antigene RhC, Rhc, RhE i Rhe). Geni su smješteni na kratkom kraku prvog kromosoma (1p34.1-1p36) (2, 3). Oba gena sadrže deset egzona, suprotnih su orijentacija i struktura im je vrlo homologna (Slika 1).

Kod osoba europskog porijekla, RhD negativni status najčešće nastaje uslijed delecije *RHD* gena (2). Oko 80% RhD negativnih osoba će stvoriti anti-D protutijela ukoliko su izloženi RhD pozitivnim eritrocitima transfuzijom eritrocitnih krvnih pripravaka ili kontaktom s fetalnim eritrocitima u trudnoći, što RhD antigen čini najimunogenijim poznatim antigenom eritrocitne membrane (4).

## 1.2. RhD imunizacija i hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta

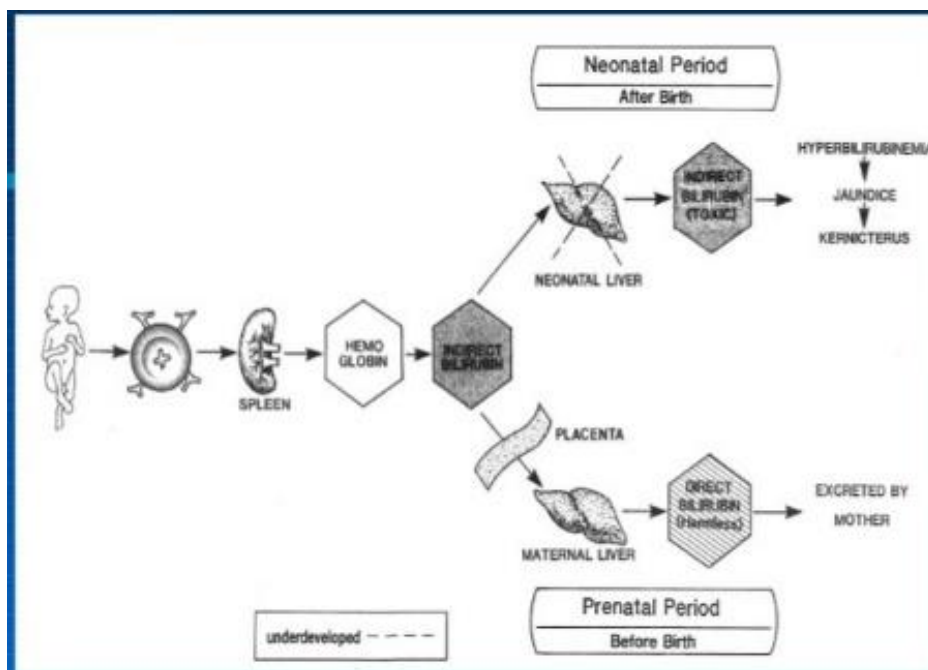
Zbog visokog udjela RhD negativnih osoba u populaciji, imunogenosti i činjenice da je anti-D protutijelo i dalje vodeći uzrok hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta (HBFN), RhD antigen je klinički najznačajniji eritrocitni antigen za opstetričku populaciju. HBFN je stanje u kojem je vijek djetetovih eritrocita skraćen zbog prijelaza majčinih protutijela kroz posteljicu te njihovog vezanja na eritrocite djeteta, zbog čega može doći do ekstravaskularne hemolize, anemije i hiperbilirubinemije. Navedeno može kod fetusa i novorođenčeta dovesti do žutice, hepatosplenomegalije, kernikterusa, edema (*hydrops fetalis*) i smrti (5) (Slika 2).

### 1.2.1. Patofiziologija HBFN

Nakon što protutijela prijeđu placentarnu membranu, vežu se za eritrocitne antigene. U slučaju HBFN uzrokovane RhD imunizacijom, majčina anti-D protutijela se vežu za RhD antigene na eritrocitima djeteta. Tako obloženi eritrociti podliježu mehanizmu fagocitoze te dolazi do ekstravaskularne hemolize u slezeni djeteta. Pritom je životni vijek eritrocita skraćen sa 120 dana na svega 2 do 3 dana (4). Rezultat tih zbivanja je anemija, čija težina ovisi o različitim čimbenicima, od kojih se neki odnose na protutijela (avidnost, klasa, subklasa, koncentracija u krvi) a drugi na dijete (zrelost hematopoetskog sustava da kompenzira anemiju) (4, 5). Uslijed hemolize, dolazi do oslobađanja hemoglobina i njegovog metaboličkog produkta bilirubina. Za vrijeme trajanja trudnoće, indirektni (nekonjugirani) bilirubin prelazi preko posteljice u majčinu cirkulaciju, te se u majčinoj jetri konjugira, pri čemu nastaje direktni (konjugirani) bilirubin, koji se izlučuje putem žuči. Zahvaljujući tome, vrijednosti ukupnog bilirubina u fetalnoj cirkulaciji i amnionskoj tekućini se ne penju do toksičnih vrijednosti (>18 mg/dl) (4-6). Nakon poroda, novorođenčetova jetra uslijed nezrelosti nije u stanju konjugirati bilirubin u visokoj koncentraciji, zbog čega indirektni bilirubin doseže toksične vrijednosti. Može doći do odlaganja bilirubina u bazalne ganglije i posljedične pojave sindroma zvanog kernikterus- sindrom obilježen letargijom, spazmima i nepravilnostima disanja koji je letalan kod 70% zahvaćene novorođenčadi, a kod preživjelih rezultira trajnim neurološkim oštećenjima (4). Pojava kernikterusa je izravno povezana s razinom bilirubina. Kernikterus se neće razviti pri vrijednostima bilirubina manjim od 18 mg/dl (306 mmol/l) kod donesene novorođenčadi, dok su kod nedonoščadi i niže vrijednosti bilirubina rizične (4, 5).

Fetalna jetra i slezena uslijed anemije povećavaju proizvodnju eritrocita, zbog čega dolazi do otpuštanja nezrelih eritrocitnih prekursora. Stoga ovo stanje nosi naziv „fetalna eritroblastoz“ (4).

Patofiziologija HBFN je shematski prikazana na Slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz patofizioloških zbivanja kod hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta. Preuzeto iz (5).

### 1.2.2. Klinička slika HBFN

HBFN se može prikazati u rasponu od blage (samo laboratorijskim pokazateljima prepoznatljiva hemoliza) do vrlo teške (trajna oštećenja, smrtni ishod). Blagi su slučajevi obilježeni patološkom žuticom i padom razine hemoglobina u prvim danima života djeteta (4). Teži oblik je obilježen naglašenom anemijom prepoznatljivom već pri rođenju, brzim rastom koncentracije bilirubina u krvi te potrebom za transfuzijskim liječenjem. U teškim oblicima HBFN, uobičajeno transfuzijsko liječenje koncentratima eritrocita nije dovoljno, već se primjenjuje izmjena krvi (eksangvino transfuzija).

U fetalnom razdoblju, teški oblik bolesti se ispoljava slikom fetalne anemije, a u vrlo teškim slučajevima slikom fetalnog hidropsa (*hydrops fetalis*), sindromom obilježenim generaliziranim edemima uslijed hipoalbuminemije s hepatosplenomegalijom, te visokim rizikom od smrtnog ishoda zbog intravaskularne tromboze. Intrauterine transfuzije povećavaju vjerojatnost povoljnog ishoda (4).

### **1.2.3. Prenatalne dijagnostičke metode primjenjive kod sumnje na HBFN**

U prenatalnom razdoblju se koriste neinvazivne i invazivne metode za dijagnosticiranje i procjenu težine HBFN. Prednost se daje neinvazivnima zbog rizika koje invazivne metode predstavljaju za fetus. Navedene su pretrage koje se kod sumnje na HBFN najčešće koriste u Hrvatskoj.

#### **1.2.3.1. Neinvazivne prenatalne metode**

##### **a) Titar protutijela u majčinom serumu**

Riječ je o dobro poznatoj i lako dostupnoj semikvantitativnoj metodi titracije seruma, gdje reaktivnost protutijela u epruveti s najvećom dilucijom označavamo kao titar protutijela. Kritična vrijednost semikvantitativnog titra protutijela označava vrijednost kod koje su mogući teški oblici HBFN. Kritična vrijednost titra za anti-D je 1:16 do 1:32, ovisno o stavu laboratorija koji izvodi pretragu (4). Nedostatak metode je subjektivnost procjene jačine reakcije te upotreba različitih reagensa i metoda rada u različitim laboratorijima.

##### **b) Ultrazvučni pregled**

Zbog nedovoljne osjetljivosti, u procjeni fetalne anemije se ne koristi obični ultrazvučni pregled, budući da znakove HBFN otkriva tek kada je prisutna klinička slika fetalnog hidropsa. Međutim, budući da anemija mijenja reološka svojstva krvi, mjerenjem protoka krvi kroz srednju cerebralnu arteriju Doppler ultrazvukom može se otkriti fetalna anemija. Ovom pretragom se mogu otkriti umjerene i teške HBFN (7).

#### **1.2.3.2. Invazivne prenatalne metode**

##### **a) Amniocenteza**

Nakon 18.-20. tjedna trudnoće, moguće je amniocentezom dobiti uzorak amnionske tekućine, iz koje se određuje vrijednost bilirubina u plodovoj vodi. Bilirubin se određuje indirektno, mjerenjem optičke gustoće amnionske tekućine pri svjetlu valne duljine 450 nm. Rezultati testa se interpretiraju prema Lileyevoj krivulji, odnosno procjenjuje se težina HBFN. S obzirom da se optička gustoća amnionske tekućine smanjuje nakon 27. gestacijskog tjedna, izostanak smanjenja gustoće ili njeno povećavanje kako trudnoća napreduje upućuje na pogoršanje fetalne hemolize. Analiza amnionske tekućine je indirektan pokazatelj težine fetalne anemije (5).

## **b) Kordocenteza**

Kordocenteza je postupak kojim se pod kontrolom ultrazvuka preko trbuha majke igla uvodi u umbilikalnu venu te se iz uzorka krvi fetusa određuju hemoglobin i hematokrit, a moguće je odrediti i DAT te RhD status. To je najpouzdaniji postupak za procjenjivanje težine fetalne anemije. Određivanje hemoglobina i hematokrita iz umbilikalne krvi je rutinski postupak prije intrauterinih transfuzija (4, 5, 7).

### **1.2.4. Procjena težine HBN**

Laboratorijski znakovi imunološke hemolize kod novorođenčeta uključuju pozitivan direktni antiglobulinski test (DAT) zbog obloženosti djetetovih eritrocita majčinim anti-D protutijelima, anemiju i porast koncentracije bilirubina (4).

Hemoglobin i bilirubin iz djetetove krvi su najvažniji pokazatelji u procjeni težine HBN. Serumski bilirubin veći od 17 mg/dl i bilirubin u porastu više od 0,5 mg/dl u prva 24 h označavaju patološko stanje (7).

DAT s djetetovim eritrocitima će u pravilu biti jako pozitivan, iako jačina DAT-a ne korelira s težinom HBFN (5).

### **1.2.5. Liječenje HBFN**

Terapijski postupci se mogu provesti u prenatalnom i postnatalnom razdoblju. Prenatalno je moguće izvesti intrauterine transfuzije fetusu te planiranje ranijeg poroda u svrhu prekida prijenosa majčinih protutijela fetusu, a postoji i mogućnost plazmafereze kod majke. Postnatalno se uobičajeno primjenjuju fototerapija, transfuzije koncentrata eritrocita te izmjena krvi novorođenčeta (eksangvinotransfuzija).

#### **a) Intrauterina transfuzija**

Intrauterina transfuzija se može primijeniti intraperitonealno ili intravaskularno, u umbilikalnu venu. Indicirana je ukoliko postoji jedno od sljedećih stanja: optička gustoća amnionske tekućine u visokoj II ili III zoni Lileyevog grafa, u uzorku fetalne krvi otkriven hemoglobin koncentracije manje od 100 g/L ili je ultrazvučno uočen fetalni hidrops. Cilj intrauterine transfuzije je postići koncentraciju fetalnog hemoglobina višu od 100 g/L. Postupak se može ponavljati svaka 2-4 tjedna do 34. tjedna trudnoće, odnosno do sazrijevanja fetalnih pluća i poroda. Za intrauterine transfuzije se koriste oprani koncentрати eritrocita sa

smanjenim brojem leukocita krvne grupe "O", podudarni sa serumom majke, ne stariji od 3 dana. Zbog imunološke nezrelosti fetusa, leukociti preostali nakon filtracije iz koncentrata eritrocita mogu kod fetusa dovesti do reakcije presatka protiv primatelja, odnosno „*graft – versus – host disease*“ (GVHD), zbog čega eritrocitni koncentraciji trebaju biti ozračeni. Ozračivanje smanjuje vjerojatnost prijenosa infekcije citomegalovirusom (5).

#### **b) Transfuzije koncentrata eritrocita novorođenčetu**

U uobičajenim okolnostima, vrijednosti hemoglobina kod novorođenčeta se kreću u rasponu od oko 140-200 g/L. Vrijednosti već ispod 120 g/L se smatraju anemijom te mogu upućivati na potrebu za transfuzijskim liječenjem. Vrijednosti niže od 80g/L predstavljaju tešku anemiju (5). Primjenjuju se koncentraciji eritrocita podudarni s protutijelima majke, sa smanjenim brojem leukocita, ozračeni, u dozi od 20 ml/kg tjelesne težine (4).

#### **b) Izmjena krvi novorođenčeta (eksangvinotransfuzija)**

Eksangvinotransfuzija je postupak kod kojeg se krv kroz umbilikalnu venu naizmjenično aspirira i injicira. Potreban volumen krvi je dva puta veći od volumena krvi novorođenčeta. Krv treba biti krvne grupe novorođenčeta ili krvne grupe "O", podudarna sa serumom majke, sa smanjenim brojem leukocita, ozračena i ne starija od 7 dana (4). Učinci eksangvinotransfuzije su uklanjanje bilirubina i anti-D protutijela iz djetetove krvi, uklanjanje eritrocita obloženih majčinim anti-D protutijelima, te zamjena djetetovih RhD pozitivnih eritrocita RhD negativnima (5). Indikacije za eksangvinotransfuziju su bilirubin veći od 20 mg/dl i porast bilirubina veći od 5 mg/dl na dan ili vrijednost hemoglobina iz pupkovine manja od 100 g/L (7). Kod teških HBN je obično potrebno više od jednog postupka za smanjenje koncentracije bilirubina (4).

#### **c) Fototerapija**

Ultraljubičasto svjetlo (valne duljine 420 do 480 nm) konvertira bilirubin u biliverdin, netoksični pigment topljiv u vodi (4). Kod blagih i umjereno teških oblika HBN, fototerapija može smanjiti potrebu za transfuzijskim liječenjem (5).

### **1.3. Imunoprofilaksa RhD imunizacije**

RhD imunizacija se može spriječiti primjenom anti-D IgG imunoglobulina (RhIG). Prije uvođenja imunoprofilakse, incidencija RhD imunizacije kod RhD negativnih žena tijekom prve trudnoće s RhD pozitivnim djetetom bila je oko 1%, a 6 mjeseci nakon poroda prvog RhD pozitivnog djeteta 4,3-9%

(4). Nakon dva poroda RhD pozitivne, ABO kompatibilne djece incidencija RhD imunizacije bila je 16-17% (4, 8).

### **1.3.1. Postnatalna imunoprofilaksa**

Postnatalna imunoprofilaksa je bio prvi uvedeni oblik imunoprofilakse, a označava davanje RhIG RhD negativnim ženama nakon poroda RhD pozitivnog djeteta. Program postnatalne imunoprofilakse uveden je u Velikoj Britaniji 1969. godine, te je stopa incidencije RhD imunizacije pala na 2%, a stopa smrtnosti novorođenčadi zbog RhD imunizacije pala sa 46/100.000 poroda prije 1969. na 1,6/100.000 u 1990. godini (4).

### **1.3.2. Antenatalna imunoprofilaksa**

Antenatalna primjena imunoprofilakse podrazumijeva davanje RhIG tijekom trudnoće. Ona može biti neselektivna, kada se RhIG daje svim RhD negativnim trudnicama u jednom (u 28.-30. tjednu trudnoće) ili dvaput (u 28. i 34. tjednu trudnoće), ovisno o smjernicama zemlje u kojoj se provodi, ili može biti selektivna, kada se daje samo trudnicama kod kojih je fetalnom genotipizacijom dokazano da nose *RHD* pozitivan plod.

Antenatalna imunoprofilaksa podrazumijeva i davanje RhIG nakon potencijalno imunizirajućih događaja kao što su krvarenja u trudnoći, amniocenteza ili trauma te nakon pobačaja.

Uvođenje antenatalne (selektivne i neselektivne) uz postnatalnu profilaksu smanjuje incidenciju RhD imunizacije na 0,17-0,28% (8).

Dok se u mnogim zemljama primjenjuju antenatalna i postnatalna imunoprofilaksa (4), u Hrvatskoj se antenatalna imunoprofilaksa ne daje rutinski, već samo u slučaju potencijalno imunizirajućih događaja i postnatalno, te je stopa imunizacije u Splitsko-dalmatinskoj županiji 1,3% (9).

## **1.4. Varijante RhD antigena**

Postoje nasljedne razlike u ekspresiji RhD antigena na eritrocitnoj membrani. Nazivamo ih D varijantama. Varijante koje se klasificiraju kao “slabi D antigen” rezultat su manjeg broja antigena čiji je ekstracelularni dio normalan, s brojem antigenskih mjesta od 70-4000 po stanici (4). One nastaju kao rezultat *missense* mutacija *RHD* gena uslijed kojih dolazi do supstitucija aminokiselina u unutarstaničnom ili transmembranskom dijelu RhD proteina (Slika 3) (10).

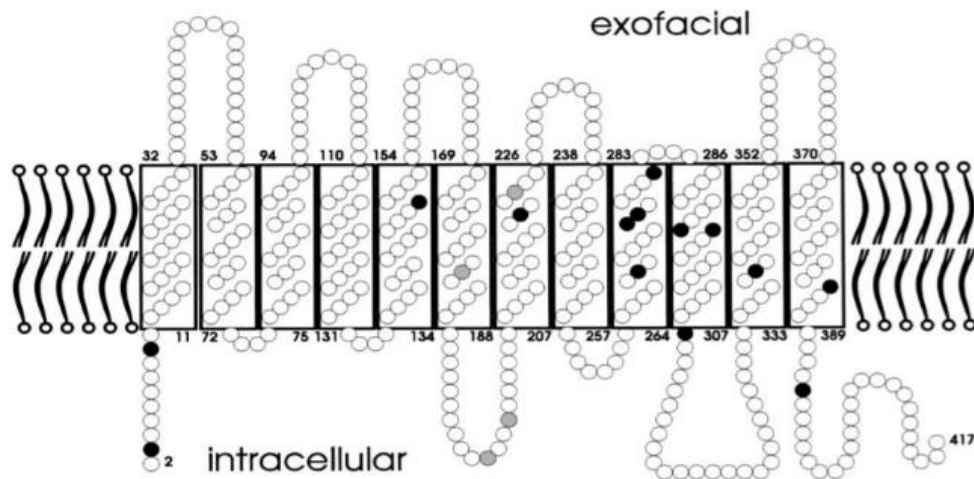


Fig 3. Localization of the amino acid substitutions of the weak D types. A predicted topology of the RhD protein with respect to the plane of the red blood cells' membrane is presented. Amino acid substitutions are shown for single events (black circles) and multiple events (gray circles). The amino acid substitutions of all weak D types were located in intracellular and transmembraneous protein segments.

### Slika 3. Smještaj aminokiselinskih supstitucija kod slabih D varijanti. Preuzeto iz (10).

“Parcijalnim D antigenom” se nazivaju varijante u kojima nedostaju određeni polipeptidi D antigena na vanjskoj strani eritrocitne membrane. Do tih promjena dolazi najčešće uslijed višestrukih nukleotidnih razmjena između egzona na *RHD* i *RHCE* alelima, čime nastaju hibridni *RHD/RHCE* aleli, a time izmijenjena primarna, sekundarna i tercijarna struktura RhD antigena, s naglašenim kvalitativnim efektom, dok broj antigena po stanici može varirati od svega 190 pa do 33.000 (normalna gustoća RhD antigena) (4, 10-12)

Do danas je otkriveno više od 200 D varijanti s prevalencijom slabog D antigena od 0.2-1% među bijelcima (11-13). Među njima prevladavaju slabi D tipovi 1, 2 i 3 (4, 13, 14) dok su među parcijalnim D antigenima najčešći DNB (1:292-1:1644) (15) i DVII (1:900) (15-18). Razlikovanje slabog i parcijalnog D u određivanju RhD antigena važno je zbog činjenice da većina slabih D varijanti nije podložna imunizaciji na D antigen u kontaktu s D pozitivnim eritrocitima, dok nositelji parcijalnog D antigena mogu stvoriti anti-D protutijelo koje može uzrokovati poslijetransfuzijske reakcije i HBFN. Zato ih je potrebno smatrati RhD negativnima u smislu transfuzijskog liječenja. To znači da primateljima krvi treba transfundirati RhD negativne eritrocitne pripravke, a trudnicama i roditeljama dati imunoprofilaksu hiperimunim anti-D gamaglobulinom (RhIG) u situacijama kada je to indicirano (4). Unatoč većoj učestalosti DNB i DVII kategorija, klinički se najznačajnijim parcijalnim D antigenom u populacijama europskog porijekla smatra kategorija DVI, čija je učestalost 0,02-0,05% (16, 18), odnosno 1:6214 (19) jer je najčešće od svih D varijanti povezan s poslijetransfuzijskim hemolitičkim reakcijama i HBFN uslijed RhD imunizacije (4).



U većini zabilježenih slučajeva, HBFN kod djece majki s anti-D protutijelom koje su nositelji parcijalnog D antigena ishod je bio povoljan, ali zabilježeni su i fatalni ishodi (20-22).

Podaci o incidenciji imunizacije osoba s D varijantama su vrlo oskudni. Prasad i sur. su naveli prevalenciju od 0,47% D varijanti među trudnicama s RhD imunizacijom (20). Wang i sur. su u istraživanoj populaciji trudnica otkrili 2,2% nositelja D varijanti (23). Hyland i sur. su u svojoj studiji opisali da je prevalencija D varijanti među RhD imuniziranim trudnicama 5,5%, dok je među trudnicama koje nisu imunizirane 1% (24). Yazer i sur. su u studiji na bolesnicima sa serološki (ne i genotipizacijom) utvrđenim slabim D utvrdili da je mjesec dana nakon primanja D+ krvnih pripravaka incidencija anti-D protutijela bila 0,15%, odnosno 5,1% među bolesnicima afričkog porijekla (25).

Smjernice za prevenciju anti-D imunizacije se razlikuju. Kanadske smjernice navode da trudnice koje su nositelji slabog D ne zahtijevaju imunoprofilaksu (26), dok nove smjernice ACOG-a svim trudnicama sa serološki slabim D antigenom savjetuju davanje imunoprofilakse i RhD negativnih krvnih pripravaka (27). Preporuke Velike Britanije i Italije ističu važnost razjašnjavanja nejasnog RhD statusa, te savjetuju da se sve D varijante osim slabog D tip 1, 2 i 3 tretiraju kao D negativne (1, 8, 28). Preporuke za prijetransfuzijsko ispitivanje Velike Britanije naglašavaju da se bolesnici sa serološki slabim D antigenom mogu smatrati RhD pozitivnima osim ako se ne radi o ženskim osobama generativne dobi ili mlađim te bolesnicima koji će zahtijevati dugotrajno transfuzijsko liječenje (1). Nekoliko autora ističu problem nepostojanja usklađenosti u pristupu trudnicama s nejasnim RhD antigenom i naglašavaju važnost razjašnjavanja pomoću genotipizacije te primjenu imunoprofilakse sukladno genotipu, pri čemu se samo slabim D 1, 2 i 3 treba pristupati kao RhD pozitivnima, dok svi ostali zahtijevaju RhD negativan pristup transfuzijskom liječenju i imunoprofilaksi (29, 30).

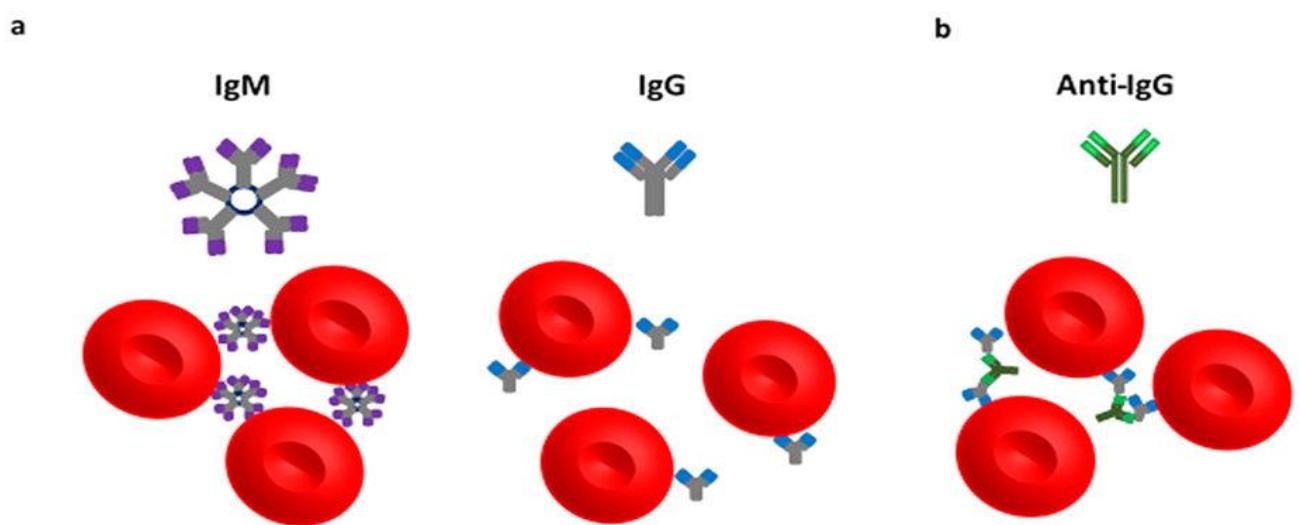
### **1.5. Određivanje RhD antigena serološkim metodama**

Testiranje RhD antigena se rutinski izvodi serološkim metodama koristeći kao reagense monoklonska anti-D protutijela (6). Monoklonska protutijela su proizvod jednog jedinog klona limfocita, visoke specifičnosti za pojedine epitope (31).

Testiranje se osniva na principu direktne i indirektne aglutinacije. Monoklonska IgM protutijela su pentameri promjera 35 nm, s 10 antigenskih veznih mjesta, te stoga jedna molekula anti-D protutijela može izravno premostiti antigenska mjesta na dvama eritrocitima (Slika 4). Aglutinaciju postižu na

sobnoj temperaturi, ne zahtijevaju period inkubacije, te su zbog svega navedenog pogodni za rutinsko ispitivanje RhD antigenskog statusa.

Monoklonska IgG protutijela imaju dva vezna mjesta za određeni epitop RhD antigena, te im je potrebno IgG protutijelo na ljudski IgG (anti-IgG), najčešće mišjeg ili kozjeg porijekla, koje će se vezati na Fc regiju anti-D protutijela (Slika 4). Aglutinaciju postižu nakon perioda inkubacije od približno 20-30 min, te se stoga koriste u proširenom imunohematološkom ispitivanju RhD antigena kada rutinskim testiranjem nije dobiven jasan rezultat o RhD statusu bolesnika ili trudnice.



**Slika 4. Direktna (a) i indirektna (b) aglutinacija. Preuzeto iz (32).**

Bilo da se radi o direktnoj ili indirektnoj aglutinaciji, imunološka reakcija koje se zbiva prilikom određivanja RhD antigena odvija se u dvije faze: u prvoj fazi anti-D protutijelo se veže za određeni epitop RhD antigena na eritrocitnoj membrani, dok se u drugoj fazi stvara aglutinat koji se sastoji od eritrocita povezanih anti-D protutijelima, te postaje vidljiv.

Određivanje RhD antigena može se izvoditi metodom u epruveti ili u mikrometodi. Metoda u mikrometodi je posljednjih godina osnova kod određivanja ABO i RhD statusa. Izvodi se pomoću monoklonskih reagensa inkorporiranih u komercijalne plastične kartice, gdje svaka kartica sadrži reakcijske jažice s protutijelima na antigene ABO sustava krvnih grupa (anti-A, anti-B, anti-AB) i dva različita monoklonska anti-D protutijela. Nakon što se u reakcijske jažice stavi suspenzija ispitanikovih eritrocita, kartica se centrifugira, prilikom čega se nastali aglutinanti zaustavljaju u gelom ispunjenoj koloni ispod reakcijske jažice. Ukoliko do aglutinacije nije došlo, eritrociti prolaze kroz

gel i talože se na dnu kolone (Slike 5 i 6). Jačina se reakcije ocjenjuje na način da „4+“ ili *score* 12 označava najjaču moguću reakciju kada su svi eritrociti zadržani na vrhu kolone, „3+“ (*score* 10) označava zadržavanje većine eritrocita na vrhu kolone dok se manji dio osipa prema dnu, „2+“ (*score* 8) označava jednaku količinu eritrocita na vrhu i na dnu jažice a „1+“ (*score* 5) većinu eritrocita na dnu jažice uz provlačenje eritrocita do vrha (Slika 5).

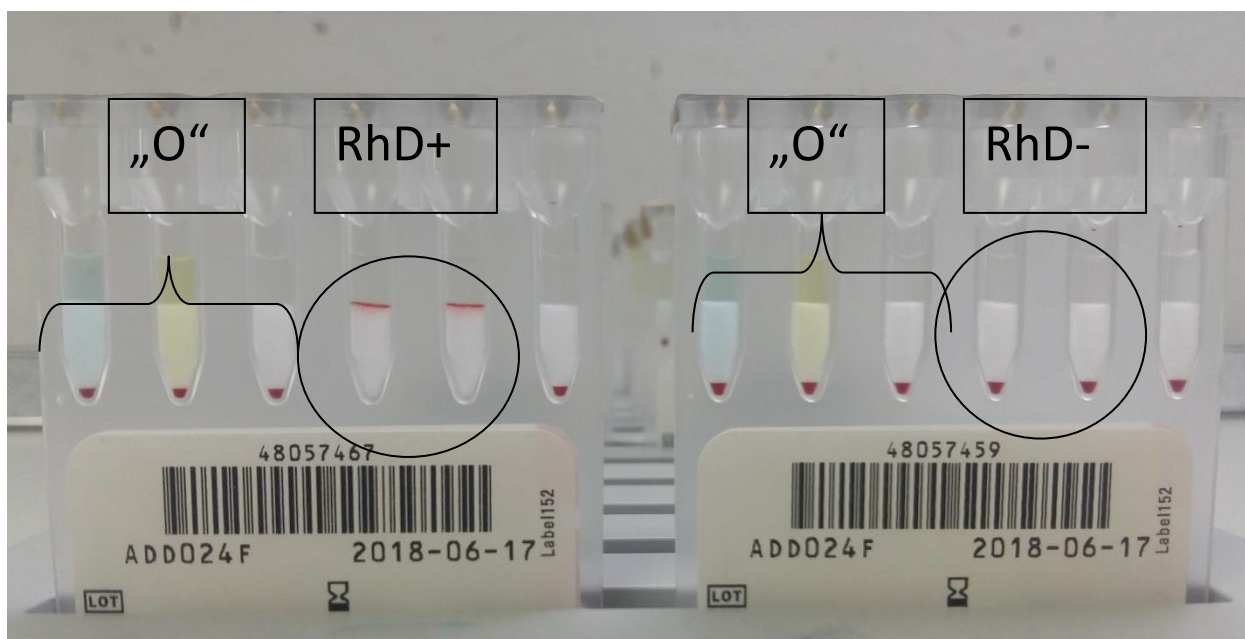


**Slika 5. Ocjena jačine reakcije hemaglutinacije u mikrometodi. Uz zahvalnost: Micro Typing Systems, Inc., Pompano Beach, SAD, 2008.**

Imunohematološko ispitivanje antigena krvnih grupa u mikrometodi može se vršiti ručno ili u automatiziranom sustavu (Slika 7).

### **1.6. Određivanje RhD antigena kod D varijanti**

Varijante RhD antigena se u rutinskom laboratorijskom ispitivanju očituju kao slabija reaktivnost anti-D reagensa s ispitivanim eritrocitima, ili je reaktivnost prisutna s nekim reagensima dok s drugima u potpunosti izostaje (Slika 8). Razlikovanje slabog D od parcijalnog D antigena serološkim metodama je problematično zbog neujednačenih reakcija s različitim anti-D reagensima, od jakih do nepostojećih. To se događa zbog velike genetske varijabilnosti D varijanti i zbog toga što se reagensi razlikuju po staničnoj liniji monoklonskih anti-D protutijela, njihovoj koncentraciji i sastavu adjuvansa (33, 34).



**Slika 6. Određivanje krvne grupe i RhD antigena u mikrometodi. Uzorak na lijevoj strani pripada osobi krvne grupe „O“, RhD pozitivnoj, dok je uzorak na desnoj strani također krvne grupe „O“, ali RhD negativan. Izvor: Zavod za transfuzijsku medicinu KBC-a Split.**



**Slika 7. Automatizirani sustav za imunohematološko ispitivanje u transfuzijskoj medicini. Izvor: Zavod za transfuzijsku medicinu KBC-a Split.**

Prevalencija D varijanti je karakteristična za određenu populaciju, a o odabiru reagensa u rutinskoj praksi ovisi hoće li biti prepoznati (35-38). Nemoguće je razlikovati parcijalni D od RhD pozitivnog antigena ako se radi o parcijalnoj D kategoriji koja ima normalan broj antigenskih mjesta na membrani, a korišteni su monoklonski reagensi koji prepoznaju sve epitope tog parcijalnog D antigena. Stoga se događa da ove osobe budu proglašene RhD pozitivnim (13). S obzirom na kliničku značajnost parcijalnog D antigena kategorije DVI, u Europi se anti-D reagensi za testiranje trudnica i bolesnika biraju na način da osobe s DVI kategorijom budu prepoznate kao D negativne, kako bi se osiguralo da će, u slučaju potrebe, primiti D negativne stanične krvne pripravke, a trudnice i roditelje dobiti profilaksu RhIG-om (38). Međutim, istraživanje na dobrovoljnim davateljima krvi u Splitsko-dalmatinskoj županiji nije otkrilo nijednog nositelja parcijalnog DVI kategorije (39).



**Slika 8. Različite reaktivnosti D varijanti s dva monoklonska anti-D reagensa. S lijeve strane parcijalni D antigen kategorije DVa; s desne strane slabi D antigen tip 1. Izvor: Zavod za transfuzijsku medicinu KBC-a Split.**

Do sada nije ispitana prevalencija parcijalnog D antigena kod bolesnika i trudnica u Splitsko-dalmatinskoj županiji. Jedno istraživanje je provedeno u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu (HZTM) gdje su analizirane D varijante sa slabim D antigenom kod pacijenata s područja središnje Hrvatske i Splitsko-dalmatinske županije. Utvrđeno je da su u mediteranskom dijelu Hrvatske najčešći uzrok nejasnoća u rutinskom serološkom ispitivanju D antigena slabi D tip 1, slabi D tip 2 i slabi D tip 3, dok je u središnjoj Hrvatskoj najčešći slabi D tip 3, potom slabi D tip 1 i slabi D tip 14 (40).

Iako postoje istraživanja koja su pokazala da je serološkim metodama moguće s velikom sigurnošću detektirati D varijante koje su u riziku za imunizaciju (41, 42), istraživanja na drugim populacijama

su pokazala suprotno (43) te je općenita preporuka da se kod nejasnih seroloških rezultata uradi *RHD* genotipizacija kod god je to moguće (44, 45). S obzirom da su imunizacije kod D varijanti rijetke, rađena su istraživanja o financijskoj isplativosti takvih postupaka. Dva istraživanja na populaciji trudnica su pokazala da bi *RHD* genotipizacija svih žena s nejasnim rezultatima bila dugoročno isplativije rješenje nego da ih se tretira kao RhD negativne kod transfuzijskog liječenja i davanja imunopofilakse (46, 47). American Association of Blood Banks (AABB) i College of American Pathologists (CAP) u svojim preporukama navode da bi genotipizaciju trebalo uraditi kod serološki nejasnog rezultata žena generativne dobi kako bi se smanjio broj nepotrebno danih injekcija RhIG i povećao broj dostupnih D negativnih krvnih pripravaka (29, 30).

U konačnici, ispravnost testiranja RhD antigena u određenoj populaciji se najbolje može procijeniti kombinacijom poznavanja prevalencije pojedinih D varijanti u populaciji te analizom RhD imunizacija kod osoba koje nisu označene kao RhD negativne (12). Analizom D varijanti možemo zaključiti koji su tipovi parcijalnog D prisutni u našoj populaciji te u skladu s tim odrediti reagense za određivanje D antigena. Do sada nije istraživana prevalencija D varijanti kod trudnica Splitsko-dalmatinske županije, niti koliko često se događaju RhD imunizacije među našim trudnicama koje nisu bile proglašene RhD negativnima.

## 2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je podijeljeno u dvije studije.

- Studija 1 istražuje pojavu RhD imunizacije kod trudnica koje u rutinskom serološkom ispitivanju nisu bile RhD negativne, te kliničke posljedice kod njihove RhD pozitivne djece, odnosno pojavu HBFN.
- Studija 2 istražuje mogućnosti ispitivanja varijanti RhD antigena monoklonskim anti-D reagensima, te prevalenciju D varijanti među trudnicama Splitsko-dalmatinske županije.

### 2.1. Ciljevi

#### 2.1.1. Studija 1:

1. Ispitati pojavnost RhD imunizacija kod trudnica koje nisu označene kao RhD negativne te analizirati serološku reaktivnost i *RHD* genotip ovih trudnica.
2. Ispitati je li RhD imunizacija u ovih trudnica uzrokovala HBFN.

#### 2.1.2. Studija 2:

1. Analizirati serološku reaktivnost D varijanti s različitim monoklonskim protutijelima
2. Odrediti *RHD* genotip D varijanti koje su otkrivene serološkim testiranjem.
3. Glavni cilj istraživanja je utvrditi je li moguće rutinskim serološkim testiranjem identificirati nositelje D varijanti koji su u riziku za RhD imunizaciju i tako spriječiti pojavu HBFN kod tih trudnica.

### 2.2. Hipoteze

1. Do RhD imunizacije je došlo kod nekih trudnica s D varijantom.
2. Analizom D varijanti u populaciji i analizom RhD imunizacija kod D varijanti može se zaključiti koje su D varijante s parcijalnim D antigenom najučestalije u toj populaciji te u skladu s tim odabrati monoklonske reagense za testiranje. Ove trudnice će biti obilježene kao RhD negativne, te će se u imunizacijskim događajima prevenirati RhD imunizacija.

### 3. ISPITANICI I POSTUPCI

#### 3.1. Studija 1: Anti-D protutijela kod trudnica koje nisu RhD negativne

Studija je provedena na Zavodu za transfuzijsku medicinu (ZTM) Kliničkog bolničkog centra Split Splitsko-dalmatinske županije. Sve trudnice Splitsko-dalmatinske županije upućuju se tijekom prvog tromjesečja na ZTM u svrhu određivanja ABO i RhD statusa, te ispitivanja postojanja iregularnih antieritrocitnih protutijela. Kod narednih dolazaka (u drugom i/ili trećem tromjesečju) radi se samo ispitivanje na iregularna antieritrocitna protutijela. U slučaju dokazanih klinički značajnih antieritrocitnih protutijela kao što je anti-D, trudnicama je otvoren „Karton za praćenje imunizacije“. Svi podaci o trudnicama (redni broj trudnoće, ishodi prethodnih trudnoća, ABO/Rh status trudnice i oca djeteta) i protutijelima (specifičnost, titar, klasa) su upisani u Kartone.

##### 3.1.1. Izvori podataka

Retrospektivno smo prikupili podatke o RhD imunizacijama trudnica u razdoblju od 01. siječnja 1993. do 31. prosinca 2012. godine.

Broj poroda živorođene djece je prikupljen iz Ljetopisa nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije.

Broj urađenih ispitivanja RhD antigena i broj serološki prepoznatih D varijanti je za period od 1993. do 2001. godine prikupljen na ZTM iz ručno pisanih „Protokola za testiranje trudnica“, a za period od 2002. do 2012. godine iz informatičke baze podataka.

„Karton za praćenje imunizacije“ je korišten za praćenje trudnica s iregularnim antieritrocitnim protutijelima. Iz tih kartona su prikupljeni podaci o ukupnom broju trudnica s RhD imunizacijom, te o broju trudnica s RhD imunizacijom koje nisu bile RhD negativne. Za trudnice koje nisu bile RhD negativne, a stvorile su anti-D protutijela, analizirali smo podatke o mogućem načinu imunizacije (transfuzija ili trudnoća), RhD imunopofilaksi, transfuzijskom liječenju, *RHD* genotipu majke, titru anti-D protutijela, novorođenčevom RhD statusu i DAT-u.

Iz povijesti bolesti Klinike za dječje bolesti prikupljeni su podaci o RhD pozitivnoj novorođenčadi trudnica koje nisu bile RhD negativne, a stvorile su anti-D protutijela: postojanje HbN, vrijednosti hemoglobina i bilirubina, transfuzijskom liječenju, fototerapiji i neonatalnom ishodu.



### **3.1.2. Serološko ispitivanje RhD antigena**

#### **3.1.2.1. Algoritam ispitivanja RhD antigena od 1993. do 2008. godine**

U periodu od 01. siječnja 1993. do 10. travnja 2008. godine, rutinsko serološko RhD ispitivanje se izvodilo direktnom aglutinacijom dvama od sljedećih monoklonskih reagensa: Anti-D M MonoGnost® (MS-201, BioGnost, Hrvatska); NovaClone® Anti-D IgM+IgG Monoclonal Blend (CI 175-2, D415, 1E4, Immucor Gamma, Kanada); Anti-D MG MonoGnost® (RUM-1 IgM, MS-26 IgG, BioGnost, Hrvatska). Ako je RhD antigen u direktnoj aglutinaciji određen kao negativan, rađeno je određivanje RhD antigena metodom indirektna aglutinacije (IAT). Korišten je monoklonski reagens Anti-D BioClone® human monoclonal-polyclonal blend (Ortho Clinical Diagnostics®, SAD). *RHD* genotipizacija je rađena isključivo kada se pojavila RhD imunizacija kod trudnice koja nije inicijalno određena kao RhD negativna.

#### **3.1.2.2. Algoritam ispitivanja RhD antigena od 2008. do 2012. godine**

U periodu od 10. travnja 2008. do 31.12.2012. godine, rutinsko serološko ispitivanje RhD antigena izvodilo se u automatiziranom sustavu pomoću mikrokartica ABO-DD Grouping Cassette (Ortho Clinical Diagnostics®, SAD) koje sadrže dva monoklonska IgM reagensa za određivanje RhD antigena (klonovi D7B8 i RUM-1). Korišten je uređaj za imunohematološko testiranje Ortho AutoVue® Innova System (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey, SAD). Nakon uvođenja mikrometode, testiranje u indirektnoj aglutinaciji je napušteno. Slučajevi s nejasnim serološkim rezultatima su bili poslani na *RHD* genotipizaciju.

### **3.1.3. *RHD* genotipizacija**

Genotipizacija izabranih uzoraka je bila provedena u Odjelu za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM) u Zagrebu. Ispitanicima je uzet uzorak periferne krvi (6 ml) u epruvetu s antikoagulansom K2EDTA. Nakon toga je slijedila izolacija DNA i određivanje genotipova *RHD* i *RHCE* gena, metodom polimerazne lančane reakcije pomoću ishodnica specifičnih za sekvencu (PCR-SSP). Korištena je ručna metoda pomoću komercijalnog seta QIAamp DNA Blood Mini kit® (Qiaqen, Njemačka) ili Qiacube analyser® (Qiaqen, Njemačka). Genotipizacija D varijanti rađena je pomoću setova za PCR-SSP (Ready GeneWeak D® i Ready GeneCDE®, Inno-Train, Njemačka). Detaljnije o *RHD* genotipizaciji u poglavlju 3.2.3.

#### **3.1.4. Imunoprofilaksa u razdoblju 1993.-2012. godine**

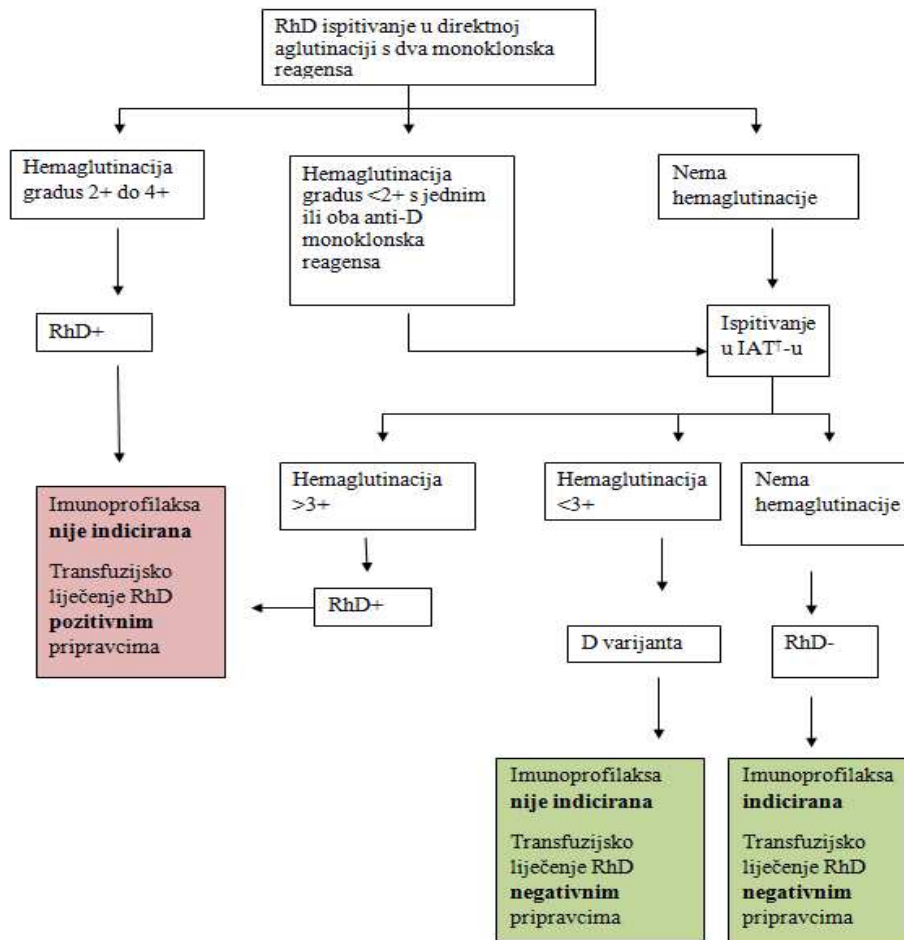
Od 1993. godine do 10. travnja 2008. godine RhD imunoprofilaksa je rutinski indicirana za RhD negativne trudnice nakon poroda RhD pozitivnog djeteta i tijekom trudnoće nakon potencijalno imunizirajućih događaja (amniocenteza, kordocenteza), te su u slučaju transfuzijskog liječenja primale RhD negativne pripravke. Trudnice s D varijantama, tada označavane kao „D<sup>u</sup>“, nisu primale imunoprofilaksu tijekom trudnoće i nakon poroda, ali su dobivale RhD negativne krvne pripravke u slučaju transfuzijskog liječenja (Slika 9).

Od 2008. do 2012. godine je anti-D profilaksa rutinski indicirana RhD negativnim trudnicama i trudnicama s D varijantom koje nisu bile slabi D tip 1, 2 ili 3 nakon poroda RhD pozitivnog djeteta i potencijalno imunizirajućih događaja (amniocenteza, kordocenteza). Te su trudnice primale RhD negativne eritrocitne krvne pripravke. Trudnice sa slabim D antigenom tip 1, tip 2 i tip 3 nisu dobivale imunoprofilaksu i liječene su RhD pozitivnim krvnim pripravcima (Slika 10).

#### **3.2. Studija 2: Odabir monoklonskih reagensa kod prepoznavanja varijanti RhD antigena**

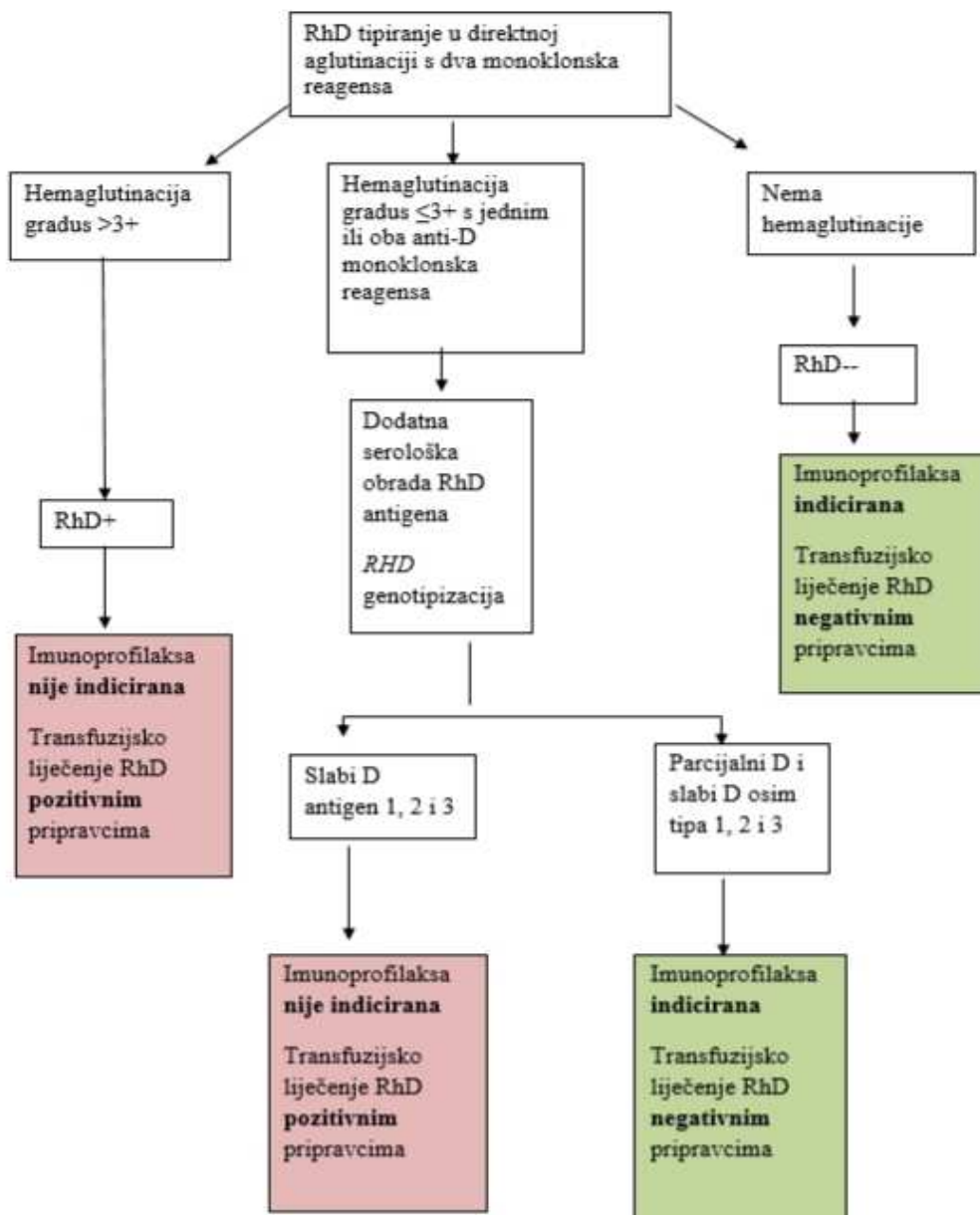
Studija je provedena na Zavodu za transfuzijsku medicinu (ZTM) Kliničkog bolničkog centra Split Splitsko-dalmatinske županije u petogodišnjem razdoblju od 10. travnja 2008. do 31. prosinca 2016. godine.

Sve trudnice u Splitsko-dalmatinskoj županiji su u tom razdoblju upućene u ZTM na određivanje statusa ABO i RhD antigena te na testiranje na iregularna antieritrocitna protutijela. U studiju su uključene sve prvorotke.



Slika 9. Algoritam ispitivanja RhD antigena metodom u epruveti, imunoprofilaksa anti-D IgG-om i transfuzijsko liječenje u razdoblju 1993.-2008. godine.

† IAT= indirektni antiglobulinski test.



Slika 10. Algoritam ispitivanja RhD antigena u mikrohemaglutinacijskoj metodi, imunoprofilaksa anti-D IgG-om i transfuzijsko liječenje trudnica u razdoblju nakon travnja 2008. godine.

### 3.2.1. Rutinsko određivanje RhD antigena u mikrometodi

Uzorci venske krvi su uzeti u epruvete s EDTA antikoagulansom. Određivanje RhD antigena rađeno je mikrometodom u automatiziranom sustavu Ortho AutoVue® Innova System (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey, SAD). Korištene su mikrokartice ABO-DD Grouping Cassette® (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey, SAD) koje sadrže dva monoklonalna reagensa IgM klase (klonovi D7B8 i RUM-1). Svi rezultati su upisani u Protokol za dodatnu imunohematološku obradu.

Uzorci trudnica koji nisu dali jaku pozitivnu reakciju aglutinacije (4+) nego su označeni kao gradus 3+ ili manje su smatrani nejasnima i podvrgnuti su proširenom serološkom ispitivanju RhD antigena u direktnoj i indirektnoj aglutinaciji (Slika 10) te su upućene na genotipizaciju *RHD* antigena.

### 3.2.2. Prošireno serološko ispitivanje RhD antigena

Korišteno je pet monoklonskih reagensa metodom direktne aglutinacije u epruveti:

- Ortho Anti-D® (P3x61 monoclonal IgM, Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey, SAD)
- DiaClon® Anti-D Monoclonal IgG i IgM (MS-26, TH28, DiaMed GmbH, Cressier, Švicarska);
- Anti-DM MonoGnost® (MS-201, BioGnost, Zagreb, Hrvatska);
- NovaClone® Anti-D IgM+IgG Monoclonal Blend (CI 175-2, D415, 1E4, Immucor Gamma, Dartmouth, Kanada);
- Anti-D MG MonoGnost® (RUM-1 IgM, MS-26 IgG, BioGnost, Zagreb, Croatia).

Također je korišten komercijalni set za serološku identifikaciju parcijalnih D varijanti metodom indirektno aglutinacije u mikrokartici koji sadrži 6 monoklonskih reagensa koji omogućavaju prepoznavanje parcijalnih D kategorija II, IV, V, VI, VII, DFR, DBT and RoHar (ID-Partial RhD Typing Set®, DiaMed AG, Morat, Švicarska). Klonovi koje set sadrži su:

- LHM76/55 (IgG)
- LHM77/64 (IgG)
- LHM70/45 (IgG)
- LHM59/19 (IgG)
- LHM169/80 (IgG)
- LDM1 (IgM)

U sklopu proširenog ispitivanja je određen i Rh fenotip antigena C, c, E i e (Rh/K Cassette®, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey, SAD).

### **3.2.3. RHD genotipizacija**

Genotipizacija je bila provedena u Odjelu za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM) u Zagrebu. Svim ispitanicima, bio je uzet uzorak periferne krvi (6 ml) u epruvetu s antikoagulansom K2EDTA. Nakon toga je slijedila izolacija DNA, i određivanje genotipova *RHD* i *RHCE* gena, metodom polimerazne lančane reakcije pomoću ishodnica specifičnih za sekvencu (PCR-SSP).

#### **3.2.3.1. Izolacija DNA**

DNA visokog stupnja čistoće izolirana je iz pune krvi na QIAcube® uređaju. QIAcube® uređaj je radna stanica za izolaciju nukleinskih kiselina koja koristi već gotove kitove za izolaciju nukleinskih kiselina na kolonama (silika-gel membrane). U ovom istraživanju korišten je QIAamp® DNA Blood Mini Kit (tvrtka Qiagen, Njemačka).

#### **3.2.3.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)**

Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. polymerase chain reaction) je metoda umnažanja molekule DNA in vitro. Metoda omogućava detekciju ekstremno niskih koncentracija ciljne DNA sekvence uz visoku specifičnost.

Puferiranu reakcijsku smjesu za PCR čini kalup DNA, magnezijevi ioni, smjesa deoksiribonukleotida -dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), enzim Taq polimeraza i specifične ishodnice koje omeđuju regiju koju želimo umnožiti. Nakon vezanja početne ishodnice, odnosno oligonukleotida na DNA (po principu komplementarnosti), oni se produljuju (prema postojećem kalupu) ugradnjom slobodnih nukleotida djelovanjem DNA (Taq) polimeraze.

#### **3.2.3.3. PCR-SSP (engl. polymerase chain reaction with sequence-specific primers)**

Inačica PCR reakcije, PCR-SSP metoda ili alel specifični PCR omogućava određivanje i razlikovanje pojedinih alela. Metoda se sastoji od lančane reakcije polimeraze pomoću ishodnica koje su specifične za određenu sekvencu u kojoj se nalazi promjena u genomu koju želimo analizirati, elektroforeze i vizualne interpretacije rezultata.

Princip PCR-SSP se temelji na činjenici da za uspješnu reakciju, obje početnice (*primeri*) posebno one na 3' kraju, nemaju neslaganje (*mismatch*), odnosno da je sekvenca oligonukleotidnih početnica i sekvenca ciljne ispitivane DNA komplementarna. U tom slučaju dolazi do vezanja početnica za DNA i umnožavanja u PCR reakciji. Detekcija PCR produkata nakon umnožavanja vrši se pomoću elektroforeze na agaroznom gelu uz dodatak etidijevog bromida koji interkalira u dvolančanu DNA i obasjavanjem gela UV svjetlom valne duljine 254 nm fluorescira, pri čemu se specifični produkti umnožavanja vide kao svijetle vrpce.

#### **3.2.3.4. RHD genotipizacija pomoću PCR-SSP metode**

U svim uzorcima krvi ispitanika, koji su izabrani za određivanje *RHD* i *RHCE* genotipa napravljena je *RHD* genotipizacija pomoću komercijalnih kitova: Ready Gene weak D, Ready Gene CDE (Inno-Train®, Kronberg, Njemačka) na uređajima AB PCR 2720 i 2700, 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, SAD).

Provjera PCR-SSP produkata na gelu vrši se pomoću elektroforeze na 1,5% agaroznom gelu u 0,5x TBE puferu ili gotovim Clearose BG gelovima. Nakon završene elektroforeze, gel je obasjan svjetlošću pod UV transiluminatorom i PCR produkti su fotografirani digitalnom kamerom.

Specifičnost svake pojedine amplifikacije provjerava se pomoću tablica za interpretaciju, koje se nalaze priložene u svakom komercijalnom kitu.

#### **3.2.4. Imunoprofilaksa u razdoblju 2008.-2016. godine**

U ovom razdoblju je anti-D profilaksa rutinski indicirana RhD negativnim trudnicama i trudnicama koje nisu bile slabi D tip 1, 2 ili 3, nakon poroda RhD pozitivnog djeteta i potencijalno imunizirajućih događaja (amniocenteza, kordocenteza). Te su trudnice primale RhD negativne eritrocitne krvne pripravke. Trudnice sa slabim D antigenom tip 1, tip 2 i tip 3 nisu dobivale imunoprofilaksu i liječene su RhD pozitivnim krvnim pripravcima (Slika 10).

### **3.3. Statistika**

U analizi podataka korištene su deskriptivne i inferencijalne statističke metode. Razdioba kategorijskih varijabli uključujući razdiobu RhD imunizacije prikazana je preko apsolutnih frekvencija i postotaka. Kod kategorijskih varijabli korištena je intervalna procjena proporcije u populaciji uz razinu pouzdanosti od 95%. Pri zaključivanju se koristi razina statističke značajnosti od 0,05. Za računanje minimalne potrebne veličine uzorka pri kojoj je procjena proporcije statistički

značajna i intervalne procjene proporcije korišten je programski paket StatSoft Statistica 10 i MS Excel.

### **3.3.1. Studija 1: veličina uzorka**

Od 01. siječnja 1993.-31. prosinca 2012. godine je rutinsko ispitivanje krvne grupe, RhD antigena i iregularnih antieritrocitnih protutijela u Zavodu za transfuzijsku medicinu urađeno kod 102,982 trudnoća. U tom periodu je u Splitsko-dalmatinskoj županiji zabilježeno 104,884 poroda živorođene djece, što znači da je istraživanjem obuhvaćeno 98% ciljne populacije. Navedena veličina uzorka je dostatna za postizanje visoke točnosti i preciznost procjene prevalencije RhD imunizacije i HBFN kod trudnica koje su nositelji D varijanti i osigurava zaključivanje na razini raspona pouzdanosti od 99% uz grešku procjene od 0,055% (nužno s obzirom na očekivanu nisku prevalenciju RhD imunizacije od 0,3% i RhD varijanti od 0,2 do 1%).

### **3.3.2. Studija 2: veličina uzorka**

Uz pretpostavku o prevalenciji D varijanti od 0,2% do 1% u populaciji, da bi procijenjena stopa prevalencije bila statistički značajna na razini pouzdanosti od 95%, odnosno signifikantnosti od 5%, minimalna potrebna veličina uzorka je 2345 trudnice.



## 4. REZULTATI

Pojava RhD imunizacije kod trudnica koje u rutinskom serološkom ispitivanju nisu bile RhD negativne, te kliničke posljedice kod njihove RhD pozitivne djece, ispitivane su u Studiji 1.

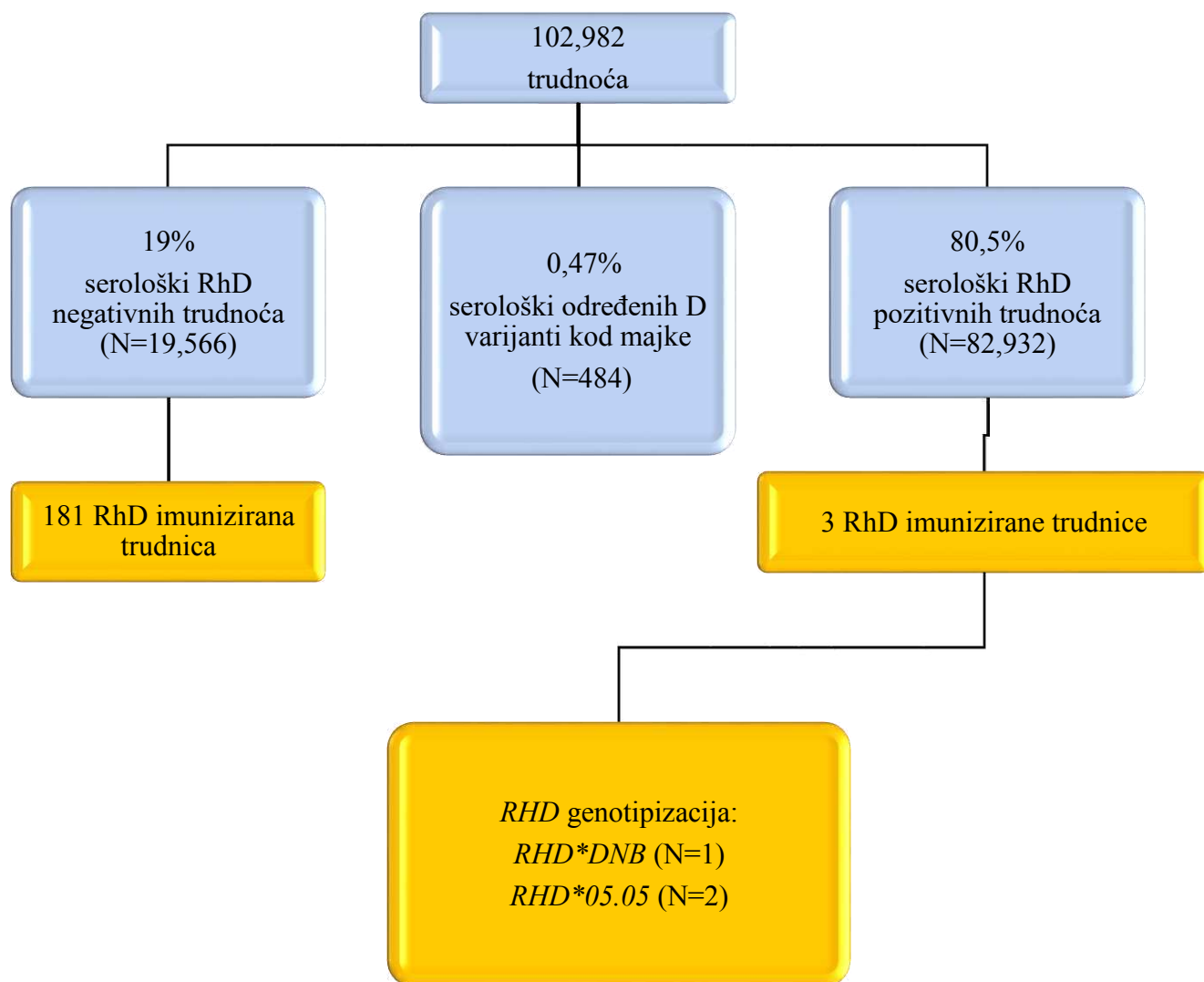
Prevalencija D varijanti među trudnicama Splitsko-dalmatinske županije te mogućnosti ispitivanja varijanti RhD antigena monoklonskim anti-D reagensima su istraživane u Studiji 2.

### 4.1. Studija 1: RhD imunizacije kod trudnica koje nisu RhD negativne

U razdoblju od 01. siječnja 1993. do 31. prosinca 2012. su u Splitsko-dalmatinskoj županiji registrirana 104,884 poroda živorođene djece. U Zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Split je ispitivanje RhD antigena i iregularnih antieritrocitnih protutijela izvršeno kod 102,982 trudnoća. Od toga, u 484 slučaja, odnosno 0,47% trudnoća (CI 0,43;0,51) su trudnice bile serološkim metodama određene kao D varijante. U 19% (N=19,566) slučajeva su trudnice bile RhD negativne, a u 80,5% (N=82,932) su bile RhD pozitivne (Slika 11).

#### 4.1.1. Varijante RhD antigena koje su razvile anti-D protutijela

Od 184 trudnice s RhD imunizacijom, 181 je bila serološki određena kao RhD negativna. Preostale tri RhD imunizacije (1,63% RhD imunizacija; CI 0,34;4,69) su se dogodile kod trudnica koje su inicijalno određene kao RhD pozitivne, a bile su nositelji RhD varijanti. Genotipizacija *RHD* gena je pokazala da su dvije trudnice bile nositelji parcijalnog D antigena tip DVa (ISBT naziv alela *RHD\*05.05*), a jedna nositelj parcijalnog D tip DNB (ISBT naziv alela *RHD\*DNB*) (Slika 11). Razlog zašto su na inicijalnom određivanju RhD antigena bile proglašene RhD pozitivnima je taj što su anti-D reagensi korišteni u tom razdoblju (klonovi MS-201, 175-2, D415, 1E4) prepoznavali sve epitope tih tipova parcijalnih D antigena, te su davali jaku reakciju aglutinacije u rutinskom određivanju RhD antigena. Nijedna od ovih trudnica zbog toga nije primila anti-D imunoprofilaksu, a dvije su zahtijevale transfuzijsko liječenje tijekom kojeg su primijenjeni RhD pozitivni eritrocitni krvni pripravci. Jedna od trudnica (parcijalni D tip DVa) je imunizirana isključivo trudnoćom, dok je za ostale dvije trudnice bilo nemoguće odrediti je li razlog imunizacije bila trudnoća ili transfuzija (Tablica 1).



**Slika 11. Rezultati RhD tipiranja i RhD imunizacijski događaji kod trudnica u razdoblju od 1993. do 2012. godine**

Za vrijeme ispitivanog razdoblja, kod 0,47% trudnoća je serološkim metodama majka bila određena kao D varijanta (tada korišten naziv „D<sup>u</sup>“). One nisu dobivale imunoprofilaksu, ali su primale RhD negativne krvne pripravke u slučaju potrebe za transfuzijskim liječenjem. Među njima nije bilo slučajeva RhD imunizacije (Slika 11).

**Tablica 1. Uzroci RhD imunizacija kod trudnica s parcijalnim D antigenom**

| <b>Trudnice (N=3)</b>                            |   |                  |   |
|--|---|------------------|---|
|  | <b>1</b>                                    | <b>2</b>         | <b>3</b>                                |
| <b>Genotip</b>                                   | <i>RHD*DNB</i>                              | <i>RHD*05.05</i> | <i>RHD*05.05</i>                        |
| <b>Trudnoće koje su prethodile imunizaciji</b>   | 1. pobačaj<br>2. uredna (RhD?)              | 1.pobačaj        | 1. uredna<br>2. dijete RhD-, DAT-       |
| <b>Transfuzije</b>                               | Da,<br>nakon druge<br>trudnoće <sup>†</sup> | Ne               | Da,<br>Nakon prve trudnoće <sup>†</sup> |
| <b>Trudnoća u kojoj je imunizacija otkrivena</b> | treća                                       | druga            | treća                                   |
| <b>Uzrok imunizacije</b>                         | Nejasan<br>(trudnoća ili<br>transfuzija)    | Trudnoća         | Nejasan<br>(trudnoća ili transfuzija)   |

<sup>†</sup> transfuzije RhD pozitivnih eritrocitnih krvnih pripravaka

#### **4.1.2. HBFN zbog RhD imunizacije kod majki s D varijantom**

Tablica 2 pokazuje podatke o anti-D titru imuniziranih majki na kraju trudnoće, te serološke, biokemijske i hematološke pokazatelje HBFN njihove novorođenčadi.

**Tablica 2. Ishodi RhD pozitivne novorođenčadi kod RhD imuniziranih majki s D varijantama**

|          | Majka               |               | Novorođenče      |                               |                                 |               |             |                 |
|----------|---------------------|---------------|------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------|-------------|-----------------|
|          | Redni broj trudnoće | Titar anti-D* | DAT <sup>†</sup> | Hemoglobin (g/L) <sup>±</sup> | Bilirubin (μmol/L) <sup>‡</sup> | Foto-terapija | Transfuzija |                 |
| <b>1</b> | DNB                 | 3             | <1               | 1+                            | 180 (dan 1)                     | 179 (dan 5)   | da          | ne              |
|          |                     | 4             | 1:2              | 4+                            | 177 (dan 8)                     | 234 (dan 7)   | ne          | da <sup>§</sup> |
| <b>2</b> | Va                  | 2             | <1               | neg                           | 196                             | 98            | ne          | ne              |
|          |                     | 4             | <1               | neg                           | 162 (dan 2)                     | 258 (dan 1)   | da          | ne              |
| <b>3</b> | Va                  | 3             | 1:16             | 1+                            | 186                             | 100           | ne          | ne              |
|          |                     | 6             | 1:1              | 1+                            | 192                             | 105           | ne          | ne              |

\*Titar na kraju trudnoće rađen metodom u epruveti (6).

<sup>†</sup>DAT novorođenčadi rađen mikrometodom u karticama s polispecifičnim AHG-om (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey, SAD).

<sup>±</sup>Najniža razina hemoglobina tijekom boravka u bolnici, mjerena iz venske krvi. Referentni raspon: 145-225 g/L.

<sup>‡</sup> Najviši ukupni bilirubin tijekom boravka u bolnici. Referentni raspon za novorođenčad: 0-1 dan <103 μmol/L; 1-2 dan < 137 μmol/L; 2-5 dan <205 μmol/L; starija novorođenčad 3.4-17.1 μmol/L.

<sup>§</sup>Transfuzija je bila potrebna zbog kirurškog zahvata.

Trudnici s DNB varijantom je imunizacija otkrivena tijekom istraživanja razloga pozitivnog DAT-a novorođenčeta. Kako je trudnica bila državljanka Bosne i Hercegovine koje je u Hrvatsku stigla nedugo prije poroda, nije bilo dostupnih podataka o njenom imunohematološkom testiranju. Međutim, doznali smo da je to bila njena treća trudnoća te da je nakon prethodnog poroda primila dozu RhD pozitivnih koncentrata eritrocita. Sadašnje novorođenče je zbog patološke žutice liječeno fototerapijom (Tablica 1). Njena sljedeća trudnoća je završila porodom djeteta čiji je DAT bio jako

pozitivan i koje je primilo transfuziju koncentrata eritrocita u osmom danu života, s tim da je transfuzijsko liječenje bilo pripisano kirurškom zahvatu zbog uklještene hernije (Tablica 2).

Drugoj trudnici (varijanta parcijalni DVa) RhD imunizacija je otkrivena na rutinskom kontrolnom testiranju na iregularna antieritrocitna protutijela u 34. tjednu druge trudnoće. Nije nikada primala transfuziju (Tablica 1). Iako je plod bio RhD pozitivan, njen anti-D titar je ostao nizak kroz cijelu trudnoću. Djetetov DAT je bio negativan, a bilirubin i hemoglobin unutar referentnog raspona. Njeno sljedeće RhD pozitivno dijete imalo je patološku žuticu i liječeno je fototerapijom (Tablica 2).

Trećoj trudnici (parcijalni D tip Va) imunizacija je otkrivena na rutinskom testiranju ABO i RhD antigena i iregularnih antieritrocitnih protutijela u prvom tromjesečju treće trudnoće. Ona je nakon prvog poroda primila dvije doze RhD pozitivnih koncentrata eritrocita. Druga trudnoća je završila porodom RhD negativnog djeteta (Tablica 1). Djeca iz treće i šeste trudnoće su bila RhD pozitivna. Njihov DAT je bio pozitivan, a njen titar anti-D najviši od svih triju trudnica, ali djeca nisu imala nikakvih drugih laboratorijskih ni kliničkih znakova HBFN (Tablica 2).

Ukupno, trudnice s D varijantama i RhD imunizacijom su imale šest trudnoća s RhD pozitivnom djecom (ostala djeca su bila RhD negativna ili D varijante). Od tih šest, dvoje djece je bilo liječeno fototerapijom, a jedno je primilo transfuziju koncentrata eritrocita, ali nije bilo slučajeva teške HBFN ni potrebe za eksangvinotransfuzijom.

#### **4.2. Studija 2: Reaktivnost monoklonskih reagensa kod prepoznavanja varijanti RhD antigena**

Od 08. travnja 2008. do 31. prosinca 2016. godine je u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Splitu prvom rutinskom prenatalnom ispitivanju krvne grupe, RhD antigena i iregularnih antieritrocitnih protutijela pristupila 20,851 prvorotka. Takvim se uzorkom obuhvaća 98% trudničke populacije.

Status RhD antigena je bio jasan (RhD pozitivan ili RhD negativan) za 20,755 (99,53%) trudnica, dok je 96 trudnica (0,46%) dalo slabe reakcije aglutinacije u rutinskom serološkom ispitivanju (Tablica 3).

**Tablica 3. Prevalencija RhD varijanti kod prvorođani**

| Broj uzoraka N=20,851                  | N      | Prevalencija (95% CI) |
|--|--------|-----------------------|
| Sukladni serološki rezultati           | 20,755 | 99,53% (99,43; 99,62) |
| <i>RhD+</i>                            | 17,020 | 81,62% (81,09; 82,15) |
| <i>RhD-</i>                            | 3735   | 17,91% (17,39; 18,44) |
| Nejasni serološki rezultati            | 96     | 0,46% (0,37; 0,56)    |
| razriješeni <i>RHD</i> genotipizacijom |        |                       |
| <i>RHD* slabi D tip 1</i>              | 44     | 0,21% (0,15; 0,28)    |
| <i>RHD* slabi D tip 3</i>              | 27     | 0,12% (0,08; 0,18)    |
| <i>RHD*05.05</i>                       | 14     | 0,06% (0,03; 0,11)    |
| D+ <sup>†</sup>                        | 7      | 0,03% (0,01; 0,06)    |
| <i>Ostali±</i>                         | 4      | 0,01% (0,00; 0,03)    |

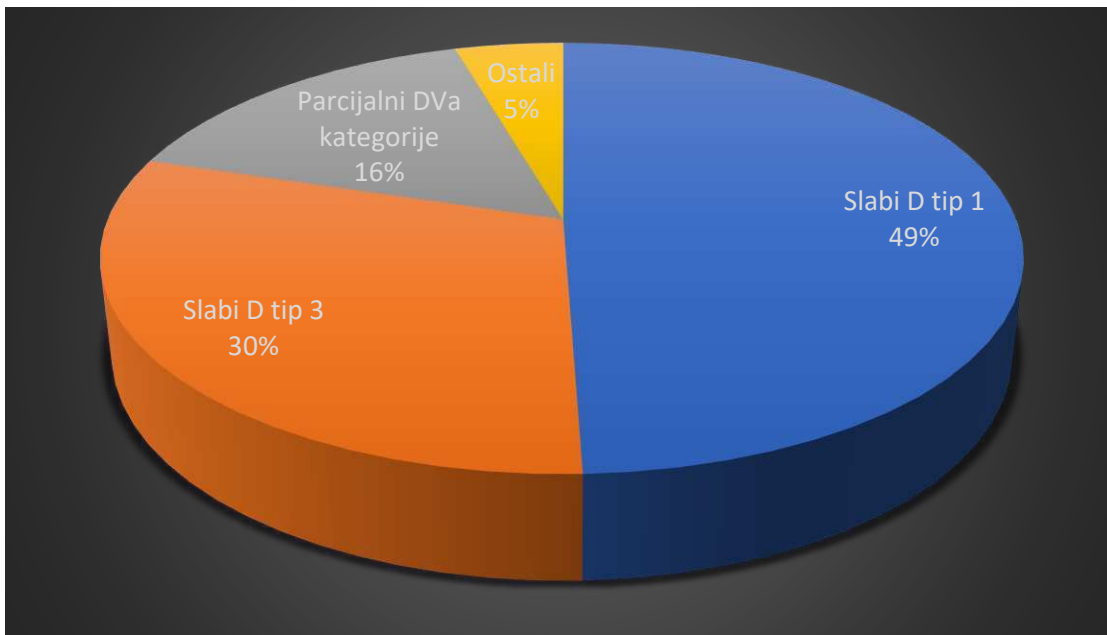
<sup>†</sup> Ovim uzorcima bi trebalo uraditi sekvenciranje kako bi se odredila moguća D varijanta i nisu uzeti u izračun prevalencije.

± Jedan uzorak je razriješen kao *RHD\* slabi D tip 1/3* heterozigotni status, a jedan kao *slabi D tip 29*. Za dva uzorka nije bilo moguće odrediti o kojem tipu D varijante se radi.

#### 4.2.1. Rezultati *RHD* genotipizacije

Na genotipizaciju *RHD* antigena je poslano 96 trudnica s nejasnim RhD statusom. Genotipizacija je pokazala je da je 89 trudnica bilo nositelj D varijanti (Tablica 3). Od toga, 73 trudnice, odnosno 0,35% (95% CI 0,27;0,44) su bile slabi D, i to slabi D tip 1 (10,21%, CI 0,15; 0,28) i slabi D tip 3 (0,12%, CI 0,08; 0,18), a 14 trudnica, odnosno 0,06% (95% CI 0,03; 0,11) su bile parcijalni D kategorije DVa (ISBT klasifikacija *RHD\*05.05*) (Tablica 3).

Prevalencija D varijanti otkrivenih serološkim metodama u našoj populaciji prvorođani je 0,42% (95% CI 0,34;0,52). Udio pojedinih D varijanti je pokazan na Slici 12.



**Slika 12. Udio pojedinih D varijanti među trudnicama koje su *RHD* genotipizacijom potvrđene kao nositeljice D varijanti.**

#### **4.2.2. Rezultati proširenog serološkog ispitivanja slabih D varijanti**

Na inicijalnom rutinskom određivanju RhD antigena, sve trudnice koje su kasnije definirane kao nositelji slabog D antigena su dale približno jednako slabe reakcije aglutinacije (gradus 3+ ili manje) u mikrokartici s oba monoklonska reagensa (Slika 13).

Svih sedam uzoraka koji su pokazali slabiju reaktivnost u rutinskom RhD ispitivanju, ali su na genotipizaciji određeni kao uredan *RHD*, pokazali su slabiju aglutinaciju sa svih pet monoklonskih reagensa u epruveti, s jačinom aglutinacije od vrlo slabo pozitivnih do 3+. Postoji vjerojatnost da se radilo o D varijantama čija detekcija nije bila obuhvaćena raspoloživim početnicama u korištenim setovima za *RHD* genotipizaciju. Od dva uzorka čiji *RHD* status ni pomoću genotipizacije nije mogao biti određen, jedan je u rutinskom tipiranju D antigena dao identične reakcije (2/3+) s oba monoklonska reagensa, a u proširenim imunohematološkim ispitivanju je dao pozitivne reakcije sa svim monoklonskim reagensima u epruveti i mikrometodi. Drugi uzorak je u rutinskom ispitivanju pokazao vrlo slabu reaktivnost s klonom D7B8, u epruveti je pokazao jaku reaktivnost (3/4+) s klonom 175-2, a s ostala četiri klona je dao negativan rezultat. U mikrometodi je negativan rezultat dao jedino s klonom LDM1, a s ostalih pet je pokazao reaktivnost 3+.



**Slika 13. Reaktivnost slabog D antigena tip 1 u mikrometodi.**

#### **4.2.2.1. Rezultati serološkog ispitivanja slabih D antigena s monoklonskim reagensima IgM klase metodom direktne aglutinacije u epruveti**

Korištenje pet monoklonskih reagensa metodom direktne aglutinacije u epruveti pokazalo je da su klonovi 175-2 i RUM-1 najosjetljiviji, s reaktivnošću od 97,7% odnosno 100% s uzorcima slabog D tip 1, odnosno 100% i 92,5% s uzorcima slabog D tip 3. U prosjeku su klonovi 175-2 i RUM-1 sa slabim D varijantama dali pozitivnu reakciju u 98,6%, odnosno 97,2% slučajeva. Reaktivnosti slabih D antigena su s ostalim klonovima bile varijabilne i kretale su se od 59% za klon P3x61 do 84% za klon MS-20. (Tablica 3).



**Tablica 3. Rezultati serološkog ispitivanja slabih D antigena s monoklonskim reagensima IgM klase metodom direktne aglutinacije u epruveti**

| D varijante                        | Trudnice         | Monoklonski reagensi† |                  |                  |                  |                  |   |
|------------------------------------|------------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---|
|                                    |                  | a                     | b                | c                | d                | e                |   |
| <i>RHD*slabi</i><br><i>D tip 1</i> | N=24             | 1                     | 1                | 1                | 1                | 1                |   |
|                                    | N=9              | 0                     | 1                | 1                | 1                | 1                |   |
|                                    | N=2              | 0                     | 0                | 1                | 1                | 1                |   |
|                                    | N=6              | 0                     | 0                | 0                | 1                | 1                |   |
|                                    | N=2              | 1                     | 0                | 1                | 1                | 1                |   |
|                                    | N=1              | 0                     | 0                | 0                | 0                | 1                |   |
| <b>Ukupno</b><br>N(%)              | <b>44 (100)</b>  | <b>26 (59)</b>        | <b>33 (75)</b>   | <b>37 (84)</b>   | <b>43 (97,7)</b> | <b>44 (100)</b>  |   |
| <i>RHD*slabi</i><br><i>D tip 3</i> | N=19             | 1                     | 1                | 1                | 1                | 1                |   |
|                                    | N=1              | 1                     | 1                | 0                | 1                | 1                |   |
|                                    | N=1              | 0                     | 1                | 1                | 1                | 1                |   |
|                                    | N=2              | 0                     | 0                | 1                | 1                | 1                |   |
|                                    | <b>Ukupno</b>    | N=2                   | 0                | 0                | 0                | 1                | 1 |
|                                    | <b>N (%)</b>     | N=2                   | 0                | 0                | 0                | 1                | 0 |
|                                    | <b>N=27(100)</b> | <b>20 (74)</b>        | <b>21 (77,7)</b> | <b>22 (81,4)</b> | <b>27 (100)</b>  | <b>25 (92,5)</b> |   |
| <b>Ostali‡</b>                     | N=2              | 0                     | 0                | 1                | 1                | 1                |   |
| <b>Ukupno slabih D</b>             | <b>N=73(100)</b> | <b>46(63)</b>         | <b>54(74)</b>    | <b>61(83,5)</b>  | <b>72(98,6)</b>  | <b>71(97,2)</b>  |   |

1 aglutinacija prisutna; 0 nema aglutinacije

†<sup>a</sup>Ortho IgM P3x61; <sup>b</sup>DiaMed IgM+IgG MS-26, TH28; <sup>c</sup>BioGnost MS-20; <sup>d</sup>NovaClone IgM+IgG CI 175-2, D415, 1E4; <sup>e</sup>MonoGnost IgM+IgG RUM-1 MS-26

‡jedan uzorak *RHD\* slabi D tip 1/3* heterozigot i jedan uzorak *RHD\*slabi D tip 29*

#### **4.2.2.2. Rezultati serološkog ispitivanja slabih D antigena s monoklonskim reagensima IgG klase metodom indirektne aglutinacije u mikrometodi**

Rezultati indirektne aglutinacije sa šest monoklonskih reagensa u mikrometodi su pokazani u Tablici 4. Nažalost, zbog tehničkih razloga ova metoda nije bila dostupna tijekom dvije godine u ispitivanom razdoblju (godine 2013 i 2014), te za 19 ispitanica (19,7% trudnica upućenih na genotipizaciju) ovo testiranje nije urađeno. U Tablici 4 se prikazuju rezultati ispitanica (80,3% trudnica upućenih na genotipizaciju) kojima je testiranje urađeno.

Svi su monoklonski reagensi IgG klase dali pozitivne reakcije s gotovo svim uzorcima slabih D antigena, u postotku od 96,8% do 100%. Jedan slab D tip 1 je dao negativan rezultat s klonovima LHM76/55 i LHM59/19.

Najviše negativnih rezultata s LDM1 monoklonskim reagensom (jedini IgM reagens u setu) su dali uzorci slabog D tip 1 (78,1% reaktivnosti), dok su uzorci slabog D tip 3 reagirali s njim u 90,4% slučajeva (Tablica 4).

#### **4.2.3. Rezultati proširenog serološkog ispitivanja parcijalnih D varijanti**

Sve trudnice koje su genotipizacijom definirane kao parcijalni D kategorije DVa (ISBT klasifikacija *RHD\*05.05*) (N=14) su na rutinskom ispitivanju s dva monoklonska reagensa u mikrometodi bile ispravno prepoznate kao vjerojatni parcijalni D antigen zahvaljujući jako pozitivnim reakcijama aglutinacije s klonom D7B8, a slabim reaktivnostima (2+ ili manje) s klonom RUM-1 (Slika 14).

##### **4.2.3.1. Rezultati serološkog ispitivanja parcijalnih D antigena s monoklonskim reagensima IgM klase metodom direktne aglutinacije u epruveti**

Direktna aglutinacija s pet monoklonskih reagensa u epruveti je kod svih DVa uzoraka izostala s klonom RUM-1. S klonom P3x61 je aglutinaciju pokazalo 50% uzoraka. Jedini uzorak Rh fenotipa CCee, za razliku od svih ostalih, nije pokazao aglutinaciju s klonom MS-20. Klonovi MS-26 i 175-2 su reagirali sa svim uzorcima DVa varijante (Tablica 5).

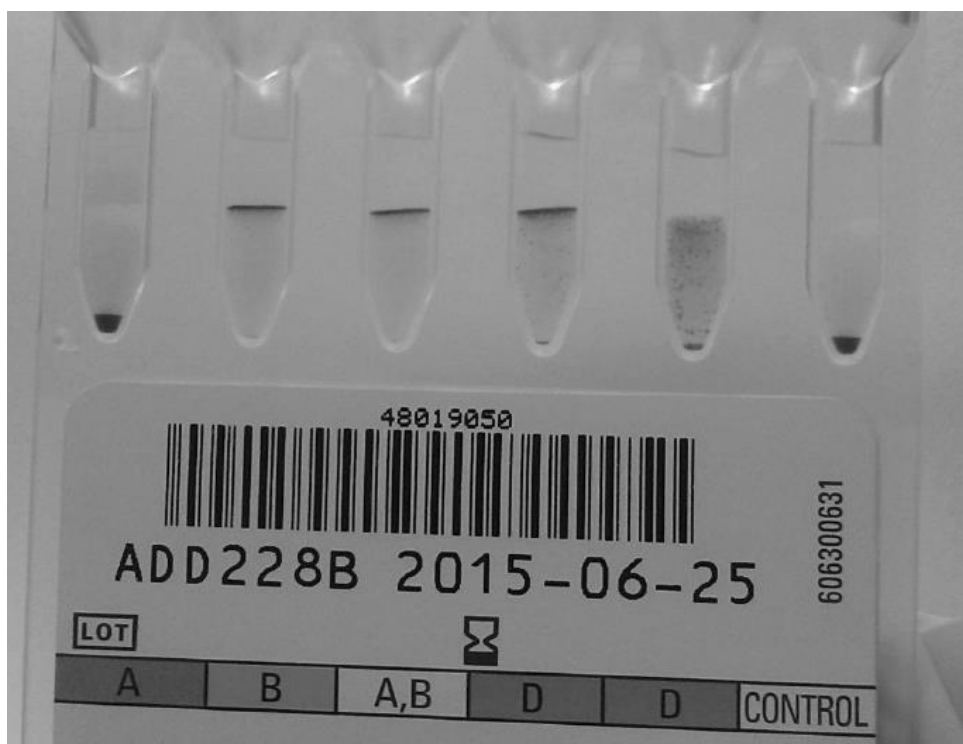
**Tablica 4. Rezultati serološkog ispitivanja slabih D antigena s monoklonskim reagensima IgG klase metodom indirektna aglutinacije u mikrometodi**

| D varijante        | Trudnice         | Reagensi <sup>†</sup> |                |                |                 |                |                 |
|--------------------|------------------|-----------------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
|                    |                  | A                     | B              | C              | D               | E              | F               |
| <i>RHD*slabi</i>   | N=24             | 1                     | 1              | 1              | 1               | 1              | 1               |
|                    | N=7              | 1                     | 1              | 1              | 1               | 1              | 0               |
| <i>D tip 1</i>     | N=1              | 0                     | 1              | 1              | 0               | 1              | 1               |
| <b>Ukupno</b>      | <b>N=32(100)</b> | <b>31(96,8)</b>       | <b>32(100)</b> | <b>32(100)</b> | <b>31(96,8)</b> | <b>32(100)</b> | <b>25(78,1)</b> |
| <b>N(%)</b>        |                  |                       |                |                |                 |                |                 |
| <i>RHD*slabi</i>   | N=19             | 1                     | 1              | 1              | 1               | 1              | 1               |
|                    | N=2              | 1                     | 1              | 1              | 1               | 1              | 0               |
| <i>D tip 3</i>     |                  |                       |                |                |                 |                |                 |
| <b>Ukupno</b>      |                  |                       |                |                |                 |                |                 |
| <b>N(%)</b>        | <b>N=21(100)</b> | <b>21(100)</b>        | <b>21(100)</b> | <b>21(100)</b> | <b>21(100)</b>  | <b>21(100)</b> | <b>19(90,4)</b> |
| <i>RHD*slabi</i>   | N=1              | 1                     | 1              | 1              | 1               | 1              | 1               |
| <i>D tip 1/3</i>   |                  |                       |                |                |                 |                |                 |
| <b>heterozigot</b> |                  |                       |                |                |                 |                |                 |
| <b>Ukupno</b>      | <b>N=54(100)</b> | <b>53(98,1)</b>       | <b>54(100)</b> | <b>54(100)</b> | <b>53(98,1)</b> | <b>54(100)</b> | <b>45(83,3)</b> |
| <b>slabih D</b>    |                  |                       |                |                |                 |                |                 |
| <b>N(%)</b>        |                  |                       |                |                |                 |                |                 |

† <sup>A</sup> LHM76/55 (IgG); <sup>B</sup> LHM77/64 (IgG); <sup>C</sup> LHM70/45 (IgG); <sup>D</sup> LHM59/19 (IgG); <sup>E</sup> LHM169/80 (IgG); <sup>F</sup> LDM1 (IgM)

#### **4.2.3.2. Rezultati serološkog ispitivanja parcijalnih D antigena s monoklonskim reagensima IgG klase metodom indirektna aglutinacije u mikrometodi**

Indirektna aglutinacija u mikrometodi sa šest monoklonskih reagensa zbog spomenutih tehničkih ograničenja nije urađena jednoj ispitanici. Reaktivnost je bila negativna s klonovima LHM70/45 I LHM196/80, a pozitivna s klonovima LHM76/55, LHM77/64 I LHM 59/19 (Tablica 6).



Slika 14. Reaktivnost parcijalnog D antigena kategorija DVa u mikrometodi.

Tablica 5. Rezultati serološkog ispitivanja parcijalnih D antigena s monoklonskim reagensima IgM klase metodom direktne aglutinacije u epruveti

| D varijante                 | Trudnice         | Monoklonski reagensi† |                |                 |                |          |
|-----------------------------|------------------|-----------------------|----------------|-----------------|----------------|----------|
|                             |                  | a                     | b              | c               | d              | e        |
| DVa                         | N=7              | 1                     | 1              | 1               | 1              | 0        |
|                             | N=6              | 0                     | 1              | 1               | 1              | 0        |
|                             | N=1              | 0                     | 1              | 0               | 1              | 0        |
| <b>Ukupno parcijalnih D</b> | <b>N=14(100)</b> | <b>7(50)</b>          | <b>14(100)</b> | <b>13(92,8)</b> | <b>14(100)</b> | <b>0</b> |
| <b>N (%)</b>                |                  |                       |                |                 |                |          |

1 aglutinacija prisutna; 0 nema aglutinacije

†<sup>a</sup>Ortho IgM P3x61; <sup>b</sup>DiaMed IgM+IgG MS-26, TH28; <sup>c</sup>BioGnost MS-20; <sup>d</sup>NovaClone IgM+IgG CI 175-2, D415, 1E4; <sup>e</sup>MonoGnost IgM+IgG RUM-1 MS-26

‡jedan uzorak *RHD\* slabi D tip 1/3* heterozigot i jedan uzorak *RHD\*slabi D tip 29*

Reaktivnost s klonom LDM1 je bila varijabilna. Jedini uzorak Rh fenotipa CCee neočekivano nije dao pozitivnu reakciju s klonom LHM77/64 (Tablica 6).

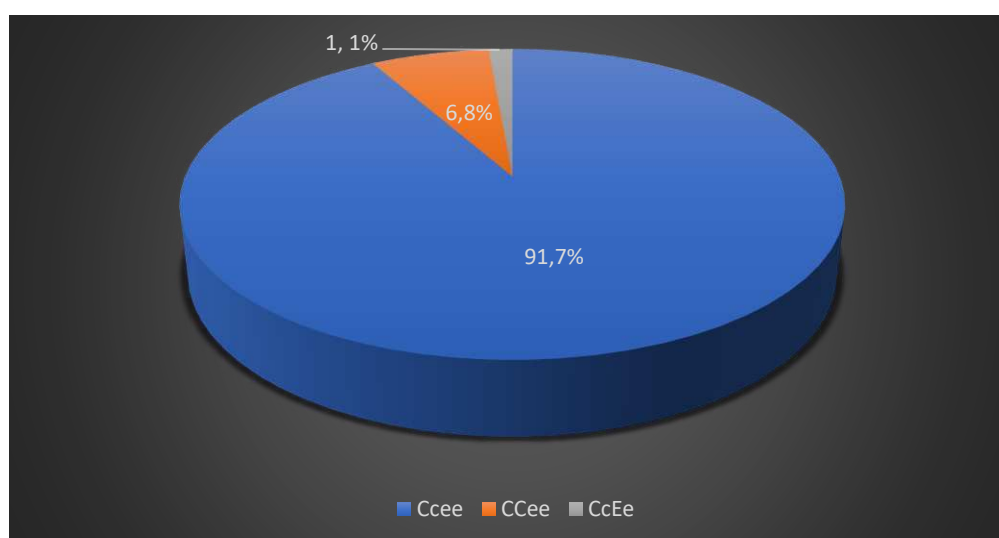
**Tablica 6. Rezultati serološkog ispitivanja parcijalnih D antigena s monoklonskim reagensima IgG klase metodom indirektna aglutinacije u mikrometodi**

| D varijante                     | Trudnice | Reagensi <sup>†</sup> |                |                 |          |                |          |                |
|---------------------------------|----------|-----------------------|----------------|-----------------|----------|----------------|----------|----------------|
|                                 |          | A                     | B              | C               | D        | E              | F        |                |
| D Va                            | N=7      | 1                     | 1              | 0               | 1        | 0              | 1        |                |
|                                 | N=1      | 1                     | 0              | 0               | 1        | 0              | 0        |                |
|                                 | N=5      | 1                     | 1              | 0               | 1        | 0              | 0        |                |
| <b>Ukupnopar<br/>cijalnih D</b> |          | <b>N=13(100)</b>      | <b>13(100)</b> | <b>12(92,3)</b> | <b>0</b> | <b>13(100)</b> | <b>0</b> | <b>7(53,8)</b> |
|                                 |          | <b>N(%)</b>           |                |                 |          |                |          |                |

† <sup>A</sup> LHM76/55 (IgG); <sup>B</sup> LHM77/64 (IgG); <sup>C</sup> LHM70/45 (IgG); <sup>D</sup> LHM59/19 (IgG); <sup>E</sup> LHM169/80 (IgG); <sup>F</sup> LDM1 (IgM)

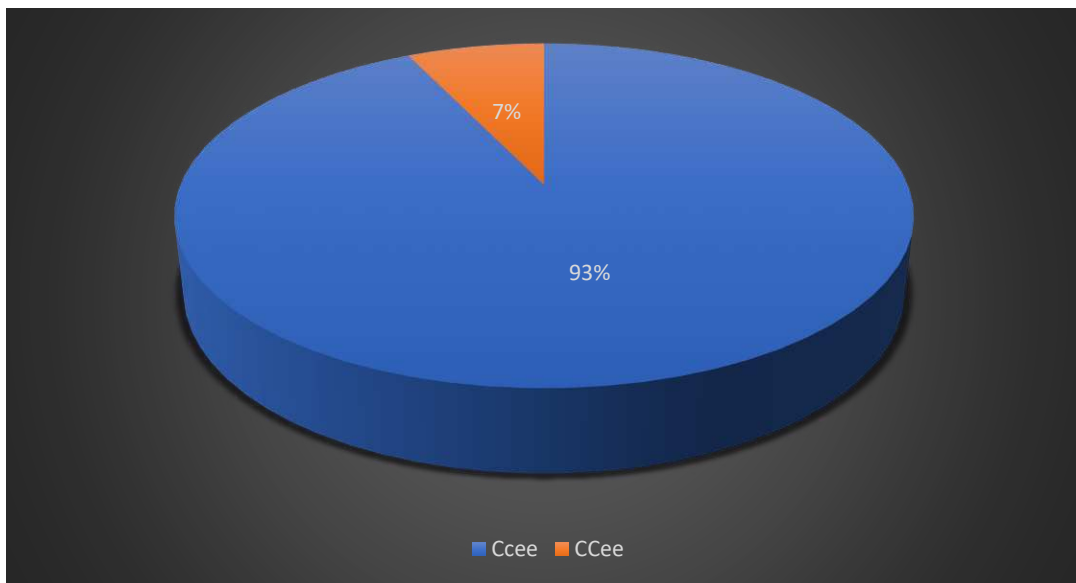
#### 4.2.4. Rh fenotip D varijanti

Među nositeljima slabih D varijanti, 67 (91,7% svih slabih D) je imalo Rh fenotip Ccee, a 5 (6,8%) fenotip CCee (Slika 15). Jedini CcEe fenotip je pripadao nositelju varijante slabi D tip 3.



**Slika 15. Distribucija Rh fenotipova kod slabih D antigena. Izvor: Zavod za transfuzijsku medicinu KBC-a Split.**

Među nositeljima parcijalne DVa varijante, 13 (92,8%) ih je imalo Rh fenotip Ccee, a jedna je osoba bila CCee fenotipa (Slika 16).



**Slika 16. Distribucija Rh fenotipova kod parcijalnih D antigena. Izvor: Zavod za transfuzijsku medicinu KBC-a Split.**

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju retrospektivno su analizirane učestalost RhD imunizacije kod trudnica koje nisu bile RhD negativne, te kliničke posljedice kod njihove RhD pozitivne djece. Nađeno je da se imunizacija dogodila kod tri trudnice, što čini 1,63% svih RhD imunizacija. Genotip dviju trudnica je bio DVa (*RHD\*05.05*), a jedne DNB (*RHD\*DNB*). Od šestero RhD pozitivne novorođenčadi, četvero je imalo pozitivan DAT, a nijedno nije imalo teži oblik HBFN.

U drugom dijelu ovog istraživanja, presječna populacijska studija je pokazala da je najčešća varijanta parcijalnog D antigena u našoj populaciji DVa (*RHD\*05.05*), s prevalencijom od 0,06%.

### 5.1. RhD imunizacije kod trudnica koje nisu RhD negativne

Naša je studija pokazala da su RhD imunizacije trudnica s parcijalnim D antigenom kod djece uzrokovale serološke i biokemijske parametre HBFN ali bez ozbiljnih kliničkih posljedica, što je sukladno s nalazima većine ranijih studija (20, 21), iako su zabilježeni i fatalni ishodi (22). Prasad i sur. su zabilježili slučajeve pet trudnica koje su bile nositelji D varijanti i imale su RhD pozitivnu djecu. Kod djece je pronađen pozitivan DAT, ali bez znakova HBFN, te nisu bili liječeni zbog novorođenačke žutice (20). Gardener je opisao slučaj majke s DEL varijantom, čije je RhD pozitivno dijete razvilo blagi oblik HBFN te je liječeno fototerapijom (21). Cannon i sur. su opisali slučaj RhD imunizacije kod nositeljice parcijalne DVI varijante s anti-D titrom jačine 1:64, čije je dijete umrlo šesti dan nakon poroda zbog teške HBFN (22). Zanimljivo je da su u našoj studiji djeca trudnice s najvišim titrom anti-D protutijela (1:16) imala DAT jačine svega 1+, dok su djeca trudnice s titrom 1:2 bila serološki značajno upadljivija, s DAT-om jačine 4+. Čimbenici koji određuju težinu HBFN i dalje nisu u potpunosti istraženi (48, 49).

Naša ranija istraživanja u populaciji trudnica Splitsko-dalmatinske županije su pokazala da je incidencija RhD imunizacije 1,3% (9, 50). Takav postotak je rezultat činjenice da u Hrvatskoj nije uvedena antenatalna imunoprofilaksa, čijim bi se uvođenjem taj postotak smanjio. U zemljama koje provode antenatalnu imunoprofilaksu broj imuniziranih RhD negativnih trudnica kreće se od 0,17-0,28% (8).

Ova studija je pokazala da se od svih RhD imunizacija 1,63% dogodilo kod trudnica koje su bile nositelji D varijanti. U usporedbi s tim, Prasad i sur. su u desetgodišnjem razdoblju pronašli pet

trudnica s D varijantom koje su razvile RhD imunizaciju, što je činilo 0,47% svih RhD imunizacija (20), dok su Hyland i sur. pronašli 5.5% D varijanti među imuniziranim trudnicama (24).

Do 2008. godine, određivanje RhD antigena u našoj ustanovi se oslanjalo isključivo na serološke metode. Trudnice koje su određene kao RhD negativne metodom direktne aglutinaciju u epruveti, ali pozitivne u indirektnoj aglutinaciji, bile su definirane kao „D varijante“ i nisu primale imunoprofilaksu; međutim, u slučaju potrebe za transfuzijskim liječenjem primale su RhD negativne krvne pripravke. Takvim pristupom su prevenirane RhD imunizacije transfuzijama RhD pozitivne krvi, ali ne i imunizacije nastale uslijed trudnoće s RhD pozitivnim djetetom. Sve tri nositeljice D varijanti koje su stvorile anti-D protutijela su inicijalno bile proglašene RhD pozitivnima uslijed tadašnjeg odabira monoklonskih reagensa, te nijedna nije primila imunoprofilaksu, a dvije su primile RhD pozitivne koncentrate eritrocita. Sve tri su pripadale kategorijama parcijalnih, a ne slabih D antigena, što je bilo očekivano, s obzirom da su u mediteranskom dijelu Hrvatske najčešće otkrivene slabe D varijante tip 1, 3 i 2, tim redom učestalosti (40). Za te je varijante dobro utvrđeno da ne stvaraju anti-D protutijela (1, 4), za razliku od distribucije slabih D antigena u nekim populacijama ne-europskog podrijetla, u kojima su najučestalije slabe D varijante koje se mogu imunizirati, kao što je slabi D tip 4.2 koji je visoko zastupljen u Egiptu (43).

Naše istraživanje je prikazalo promjene u rutinskom određivanju RhD antigena na način da se od 2008. godine obavezno koristi klon RUM-1 i D7B8. Klon RUM-1 daje slabo pozitivne reakcije s kategorijom DVa, a svi slučajevi s nejasnim rezultatom serološkog određivanja RhD antigena upućuju se na *RHD* genotipizaciju, te se imunoprofilaksa daje svim trudnicama koje su u riziku za imunizaciju. Navedeni razlozi mogu objasniti zašto se niti jedna trudnica s parcijalnim DVa kategorije nije imunizirala nakon 2008. godine.

Duže vremensko razdoblje praćenja RhD imunizacija kod D varijanti je neophodno, obzirom da su RhD imunizacije vrlo rijetke kod ove skupine trudnica. To je istovremeno i ograničenja Studije 1 jer u razdoblju od 20 godina je došlo do promjene u metodama, reagensima i algoritmu testiranja RhD antigena koji su se koristili kroz ispitivani period.

## **5.2. Prevalencija varijanti RhD antigena i odabir monoklonskih reagensa kod njihovog prepoznavanja**

U presječnom populacijskom istraživanju ispitivali smo prevalencije pojedinih D varijanti među prvotkama te mogućnosti detekcije najčešćih D varijanti dostupnim monoklonskim reagensima. Kriterij za dodatno ispitivanje RhD antigena je bila reakcija aglutinacije jačine 3+ ili manje (*score*



$\leq 10$ ) u mikrometodi s jednim ili oba monoklonska anti-D reagensa u inicijalnom rutinskom testiranju. Od 96 trudnica koje su ispunile taj kriterij, 89 su genotipizacijom potvrđene kao slaba ili parcijalna D varijanta. Iako su druge studije preporučile da granica za dodjeljivanje RhD negativnog statusa za imunoprofilaksu i transfuzijsko liječenje bude aglutinacija jačine  $\leq 2+$  (*score* 8) u mikrometodi (44), rezultati naše studije pokazuju da je kriterij aglutinacije jačine  $\leq 3+$  prihvatljiv kao granična vrijednost.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je najčešća varijanta parcijalnog D antigena u našoj populaciji DVa (*RHD\*05.05*), s prevalencijom od 0,06%. Uobičajene preporuke o odabiru monoklonskih reagensa su usmjerene na isključivanje mogućnosti da se pozitivnom proglaši varijanta DVI koja je smatrana klinički najznačajnijom u populacijama europskog porijekla (38) za koja se navodi učestalost DVI kategorije 0,02-0,05% (16, 18). Međutim, nalaz našeg sadašnjeg istraživanja je sukladan s rezultatima nedavne studije na dobrovoljnim davateljima krvi u Splitsko-dalmatinskoj županiji koja je pokazala da ni korištenjem reagensa koji s DVI kategorijom daju pozitivan rezultat nije pronađena nijedan nositelj te varijante (39). Prilagođavanje izbora reagensa bi bilo u skladu s preporukama drugih istraživanja koja savjetuju da odabir monoklonskih reagensa za ispitivanje RhD statusa treba biti prilagođen individualno, uzimajući u obzir specifičnosti populacije koju se ispituje (23, 33).

Za devet uzoraka koji nisu genotipizacijom prepoznati kao do sada poznata D varijanta, već ih je sedam proglašeno RhD pozitivnima, a dva D varijantom čiji se tip ne može odrediti, moguće je da se radilo o varijantama za koje ne raspolažemo odgovarajućim specifičnim početnicama. Sekvenciranje bi možda pružilo odgovor o njihovom tipu D varijante.

Prevalencija D varijanti i distribucija Rh fenotipova u našoj studiji su bile u skladu s rezultatima ranijih istraživanja (10, 12, 14, 18). Zanimljivo je da su Rh fenotip CCee, s potencijalom stvaranja klinički značajnog anti-c protutijela koje također uzrokuje HBFN, imale tri nositeljice slabog D tip 3 i jedna nositeljica parcijalnog DVa. Nositelji slabog D tip 1, 2, i 3 se označavaju RhD pozitivnima te nije problem pronaći odgovarajuću RhD pozitivnu krv fenotipa CCee, čime se izbjegava stvaranje anti-c protutijela. To je problem kod osoba koje su D varijanta kojoj se pristupa kao RhD negativnoj, kao što je to parcijalni DVa, jer je RhD negativna krv tog fenotipa iznimno rijetka. Zbog toga bi nositeljice parcijalne DVa kategorije trebale primiti RhD pozitivnu krv fenotipa CCee uz profilaksu RhIG-om. Na taj način bi se spriječilo stvaranje anti-c protutijela, te značajno smanjila vjerojatnost stvaranja anti-D.

*RHD* genotipizacija se navodi kao nezaobilazna metoda u ispravnom određivanju D varijanti koje zahtijevaju zaštitu imunoprofilaksom (8, 29, 30). Preporuke iz 2015. godine koje su dali AABB i CAP (29) kao i Britanski komitet za standarde u hematologiji (1, 51) navode da bi *RHD* genotipizaciju trebalo uraditi kod nejasnih seroloških rezultata kod žena generativne dobi, djevojčica i potencijalnih kroničnih primatelja transfuzije krvi jer većinu RhD varijanti zastupaju slabi D tip 1,2 i 3, koji se neće imunizirati te se stoga tretiraju kao RhD pozitivni. Korist bi bila u manjem broju nepotrebno danih RhIG i povećane dostupnosti RhD negativnih krvnih pripravaka.

U našem istraživanju (Studija 2), uzorci DVa kategorije su se već u rutinskom serološkom ispitivanju mogli jasno razlikovati od uzoraka slabih D antigena, budući da je DVa kategorija davala vrlo slabe ili negativne reakcije s klonom RUM-1, a pozitivne s klonom D7B8. Metodom u epruveti su svi uzorci DVa kategorije dali negativne rezultate s klonom RUM-1. Izvedeci dodatno serološko ispitivanje metodom indirektna aglutinacije pomoću seta ID-partial (Diamed®) sa šest monoklonskih reagensa, uočili smo da reakcije DVa kategorije nisu bile u potpunosti u skladu s uputama proizvođača. Reaktivnost je očekivano izostala s klonom LHM70/45, ali i s klonom LHM169/80, koji prema uputama proizvođača treba biti pozitivan s DVa kategorijom. To upućuje kako ti klonovi ne bi smjeli biti korišteni za određivanje RhD antigena dobrovoljnih davatelja krvi i novorođenčadi RhD negativnih majki, jer bi mogli biti proglašeni RhD negativnima. Na taj način bi doze krvi takvih davatelja bile označene kao RhD negativne, a majke takve novorođenčadi ne bi primile imunoprofilaksu, te bi u oba slučaja moglo doći do imunizacija kod bolesnika, odnosno roditelja. Drugi autori (Denomme i sur, Kulkarni i sur.) su prijavili pozitivan rezultat DVa varijante s klonom LHM169/80 (33, 44).

Slabi D tip 1 i tip 3 nije bilo moguće međusobno razlučiti korištenjem seroloških metoda. Međutim, uzorci slabog D tip 3 su u većem postotku dali pozitivne reakcije u direktnoj i indirektnoj aglutinaciji. Takav rezultat je bio očekivan, s obzirom kako se slabi D tip 3 smatra jednim od D varijanti s najvećom gustoćom D antigena na eritrocitu, sa srednjom vrijednosti od 1900 antigena po stanici, dok je za slabi D tip 1 i 2 ta vrijednost 700 odnosno 600 antigena po stanici (12). Drugi autori navode da je gustoća D antigena za slabi D tip 1 1000, a za slabi D tip 3 2000 antigena po stanici (52)

Iako su se parcijalni DVa antigeni mogli razlučiti od slabih već u rutinskom ispitivanju, moramo naglasiti da slabi D tipovi kao što su slabi D tip 4.0 (*RHD\*09.03.01*), tip 4.2.1 (*RHD\*09.01.01*) i tip 15 (*RHD\*15*) nisu nađeni u ispitivanoj populaciji trudnica. Istraživanje na drugačijoj populaciji, u kojoj se takve varijante nalaze sa značajnom učestalošću, pokazale su da nije moguće osloniti se samo na serologiju u prevenciji imunizacije kod nositelja slabih D varijanti, jer se nisu mogli razlučiti od

slabih D tipova 1, 2 i 3 koji nisu podložni RhD imunizaciji (43). Za našu populaciju je, međutim, ovo istraživanje potvrdilo tvrdnje koje navode kako pažljivi odabir monoklonskih anti-D reagensa, prilagođen populaciji za koju se koristi, može pružiti visoki stupanj sigurnosti u otkrivanju parcijalnih D varijanti, odnosno prevenciji imunizacije (41).

Nedostatak Studije 2 je taj što genotipizacija nije rađena svim RhD negativnim i RhD pozitivnim trudnicama. Schmidt i sur. su otkrili da su neki slučajevi različitih varijanti D antigena (slabi D tip 1, 2 i 3, *RHD\*DAR*, *RHD\*DIIIa*) dali pozitivnu reakciju aglutinacije samo s jednim od nekoliko monoklonskih reagensa čak i u indirektnoj hemaglutinacijskoj metodi (53), tako da moramo uzeti u obzir da su neke RhD varijante možda mogle biti propuštene korištenjem naših seroloških metoda. S druge strane, većina parcijalnih D antigena se rutinskim testiranjem proglašuje RhD pozitivnima, jer broj RhD antigena na eritrocitu može biti manji, veći ili jednak broju kao i kod D pozitivnih osoba (36). Stoga, ovim načinom testiranja ne možemo znati učestalost svih D varijanti u populaciji.

Možemo zaključiti da je najčešća prepoznata varijanta parcijalnog D antigena u našoj populaciji DVa (*RHD\*05.05*), s prevalencijom od 0,06%. Stoga savjetujemo da se za određivanje RhD antigena kod trudnica i bolesnika u našoj populaciji koriste monoklonski anti-D reagensi nereaktivni s DVI i DVa kategorijama. Na taj način će se postići da takve trudnice budu sa velikom sigurnošću određene kao RhD negativne, te će primiti imunoprofilaksu i biti liječene RhD negativnim krvnim pripravcima.

## 6. ZAKLJUČAK

Nije došlo do klinički značajne HBFN kod djece čije su majke imunizirane nositeljice parcijalnih D varijanti. Znakovi HBN su uključivali pozitivan DAT i hiperbilirubinemiju, a liječenje je uključivalo fototerapiju. Jedno je dijete primilo transfuziju koncentrata eritrocita, ali vezano za kirurški zahvat.

Klinički najznačajnija varijanta RhD antigena u našoj populaciji je parcijalni DVa, koji je ujedno i najčešći parcijalni D antigen u ispitivanoj populaciji. Monoklonski anti-D reagensi za ispitivanje trudnica i primatelja transfuzije bi trebali biti odabrani tako da s DVa varijantom daju negativne ili slabe reakcije kao što je stanična linija RUM-1, kako bi tim osobama bio dodijeljen RhD negativan status.

Odabir reagensa za serološko ispitivanje je ključan, jer potreba za *RHD* genotipizacijom neće biti uočena ukoliko D varijante nisu već na rutinskom ispitivanju prepoznate kao diskrepantan rezultat, već im je dodijeljen RhD pozitivan status. To će se dogoditi ukoliko su monoklonski reagensi za rutinsko ispitivanje odabrani tako da prepoznaju sve epitope tih D varijanti u populaciji. Pokazali smo kako je promjena algoritma ispitivanja RhD antigena s obzirom na odabir monoklonskih reagensa utjecala na prevenciju imunizacijskih događaja u dugogodišnjem razdoblju. Praćenje imunizacija populacije trudnica kroz dulji vremenski period pruža uvid u adekvatnost strategije određivanja RhD antigena i primjene imunoprofilakse kod trudnica s D varijantama.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Nasljedne razlike u ekspresiji RhD antigena na eritrocitnoj membrani nazivamo D varijantama. Neke D varijante mogu razviti RhD imunizaciju, koja je vodeći uzrok hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta (HBFN). Različite D varijante na različit način reagiraju s monoklonskim anti-D reagensima, što može dovesti do toga da D varijanta koja se može imunizirati bude proglašena RhD pozitivnom.

**Ciljevi:** Ispitati pojavu RhD imunizacije kod trudnica s D varijantom te kliničke posljedice kod njihove RhD pozitivne djece, odnosno pojavu HBFN. Analizirati D varijante koje su otkrivene u rutinskom radu s korištenim monoklonskim anti-D reagensima, što podrazumijeva detaljnu serološku analizu, *RHD* genotip te prevalenciju D varijanti među trudnicama Splitsko-dalmatinske županije.

Glavni cilj istraživanja je utvrditi je li moguće rutinskim serološkim testiranjem prepoznati nositelje D varijanti koji su u riziku za RhD imunizaciju i tako spriječiti pojavu HBFN kod tih trudnica.

**Metode:** Provedena su dva neovisna istraživanja. Za Studiju 1 su retrospektivno prikupljeni podaci o ukupnom broju trudnoća testiranih na RhD antigen, algoritmu ispitivanja RhD antigena, RhD imunizacijama trudnica i njihovim kliničkim ishodima u dvadesetogodišnjem razdoblju.

U Studiji 2 su u devetogodišnjem razdoblju praćeni uzorci prvorođeni koji nisu dali jaku pozitivnu reakciju aglutinacije (4+) nego su označeni kao gradus 3+ ili manje, te su smatrani nejasnima i podvrgnuti su proširenom serološkom ispitivanju RhD antigena u direktnoj i indirektnoj aglutinaciji, a potom upućeni na genotipizaciju *RHD* antigena.

**Rezultati:** Studijom 1 su obuhvaćene 102,982 trudnoće. RhD imunizaciju razvile su 184 trudnice. Od toga, tri trudnice su bile nositeljice parcijalnih D varijanti (jedna DNB, dvije DVa), što čini 1,63% svih RhD imunizacija (CI 0,34;4,69), a sve tri su inicijalno bile određene kao RhD pozitivne. Ni u jednom slučaju nije došlo do teške HBFN.

Studijom 2 je obuhvaćena 20,851 prvorođeni. Devedeset šest trudnica (0,46%) je dalo slabe reakcije aglutinacije u rutinskom serološkom ispitivanju. Od toga su *RHD* genotipizacijom 73 trudnice, odnosno 0,35% (CI 0,27;0,44) određene kao slabi D, i to slabi D tip 1, slabi D tip 3 i jedan slučaj slabog D tipa 29. Četrnaest trudnica, odnosno 0,06% (CI 0,03; 0,11) je određeno kao parcijalni D kategorije DVa. Za dvije trudnice nije bilo moguće odrediti genotip varijante. Ostalih sedam trudnica je proglašeno *RHD* pozitivnima. Prevalencija D varijanti otkrivenih serološkim metodama u našoj populaciji prvorođeni je 0,42% (95% CI 0,34;0,52), a najčešći parcijalni D antigen pripada kategoriji

DVa. Sve nositeljice kategorije DVa su inicijalnim ispitivanjem bile ispravno prepoznate kao vjerojatni parcijalni D antigen zahvaljujući jako pozitivnim reakcijama aglutinacije s klonom D7B8, a slabim reaktivnostima (2+ ili manje) s klonom RUM-1.

**Zaključak:** RhD imunizacija se dogodila kod tri nositeljice parcijalnih D varijanti DVa i DNB. Ni u jednom slučaju nije došlo do teške HBFN. Najznačajnija varijanta parcijalnog D antigena u našoj populaciji je parcijalni D kategorije DVa. Monoklonski anti-D reagensi za ispitivanje trudnica i primatelja transfuzije bi trebali biti odabrani tako da s DVa varijantom daju negativne ili slabe reakcije kao što je stanična linija RUM-1, tako da tim osobama bude dodijeljen RhD negativan status.

Ključne riječi: D varijanta, trudnoća, HBFN, anti-D, RhD imunizacija, monoklonski reagensi

## 8. SUMMARY

**Introduction:** Hereditary differences in RhD antigen expression on red cell membrane are designated as D variants. The carriers of some D variants are prone to RhD immunization. Anti-D is the leading cause of hemolytic disease of fetus and newborn (HDFN). Different D variants give different reactivities with monoclonal anti-D reagents. This can lead to immunization events, as they could be mistakenly recognized as RhD positive.

**Aims:** To evaluate the occurrence of RhD immunization in pregnant carriers of D variants, as well as the occurrence of HDFN in their RhD positive infants. To analyze D variants detected in routine D typing using monoclonal anti-D reagents by performing extensive serologic analysis and *RHD* genotyping. To determine the prevalence of D variants among pregnant women of Split-dalmatian County.

The overall aim of the research is to determine if it is possible to successfully use routine serologic methods for recognizing those D variant carriers that are in the risk of immunization, and by this to prevent HDFN.

**Methods:** Two independent researches have been conducted. For Study 1, the data were retrospectively collected on the number of pregnancies in which RhD antigen was determined, the algorithm of RhD antigen typing, the RhD immunization events, HDFN occurrences and their outcomes in pregnant women over a period of twenty years.

For Study 2, over a period of nine years we analyzed the samples of primiparous women which failed to show strong reactions (4+) with anti-D reagents, but were graded 3+ or less instead. Their RhD status was considered undetermined, and they underwent extensive serologic evaluation of RhD antigen in direct and indirect agglutination, as well as *RHD* genotyping.

**Results:** Study 1 included 10,982 pregnancies. RhD immunization was detected in 184 pregnant women, out of which three were partial D variant carriers (one DNB, two DVa variants), which accounts for 1.63% of all RhD immunizations (CI 0.34;4.69). All three women were initially designated RhD positive status. There were no cases of severe HDFN.

Study 2 included 20,851 primiparous women. Ninety-six of them (0.46%) gave weak agglutination reactions in routine serologic typing. *RHD* genotyping showed 73 of them (0,35%; CI 0.27;0.44) to be weak D types 1 or weak D type 3, with one case being weak D type 29. Fourteen women (0.06%; CI 0.03;0.11) were genotyped as partial D variant DVa. Genotyping was unable to specify a D variant

for two women. The remaining seven women were resolved as *RHD* positive. The prevalence of D variants detected by serologic methods among primiparous women in our population is 0.42% (95% CI 0.34;0.52). The most prevalent partial D variant is category DVa. All DVa carriers were correctly recognized as probable partial D variants on their initial RhD typing, due to the strong positive agglutination reactions with cell line D7B8 and weak reactions (score 2+ or less) with cell line RUM-1.

**Conclusion.** RhD immunization occurred in three pregnant carriers of partial D antigen. There were no cases of severe HDFN in their children. The most significant partial D variant in our population is category DVa. Monoclonal anti-D reagents for testing pregnant women and transfusion recipients should be chosen in a way that will ensure that they give negative or weak positive reactions with DVa variant, such as cell line RUM-1. This will ensure that these individuals are assigned RhD negative status.

Key words: D variant, pregnancy, HDFN, anti-D, RhD immunization, monoclonal reagents



## 9. LITERATURA

1. Daniels G. Variants of RhD--current testing and clinical consequences. *Br J Haematol.* 2013;161(4):461-70. Epub 2013/02/26.
2. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood.* 2000;95(12):3662-8. Epub 2000/06/14.
3. Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet.* 2001;2:10. Epub 2001/08/10.
4. Klein H AD. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine.* 11 ed. Oxford: Blackwell Scientific publications; 2005.
5. Harmening D. *Modern Blood Banking and Transfusion Practices.* 5 ed. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2005.
6. Brecher M. *Technical Manual.* 15 ed. Bethesda, USA: AABB; 2005.
7. Simon TL DW, Snyder EL, Stowell CP, Strauss RG. *Rossi's principles of transfusion medicine.* 3 ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
8. Qureshi H, Massey E, Kirwan D, Davies T, Robson S, White J, et al. BCSH guideline for the use of anti-D immunoglobulin for the prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfus Med.* 2014;24(1):8-20. Epub 2014/08/15.
9. 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. Epub 2011/01/11.
10. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood.* 1999;93(1):385-93. Epub 1998/12/24.
11. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology [database on the Internet]. [cited December 09, 2018]. Available from: [www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/](http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/).
12. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Muller TH, et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood.* 2000;95(8):2699-708. Epub 2001/02/07.
13. Christiansen M, Samuelsen B, Christiansen L, Morbjerg T, Bredahl C, Grunnet N. Correlation between serology and genetics of weak D types in Denmark. *Transfusion.* 2008;48(1):187-93. Epub 2007/09/29.
14. Muller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schonitzer D, et al. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion.* 2001;41(1):45-52. Epub 2001/02/13.

15. Wagner FF, Eicher NI, Jorgensen JR, Lonicer CB, Flegel WA. DNB: a partial D with anti-D frequent in Central Europe. *Blood*. 2002;100(6):2253-6. Epub 2002/08/30.
16. Flegel WA, Wagner FF. RHD epitope density profiles of RHD variant red cells analyzed by flow cytometry. *Transfus Clin Biol*. 1996;3(6):429-31. Epub 1996/01/01.
17. 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;46(4):616-23. Epub 2006/04/06.
18. Wagner FF, Kasulke D, Kerowgan M, Flegel WA. Frequencies of the blood groups ABO, Rhesus, D category VI, Kell, and of clinically relevant high-frequency antigens in south-western Germany. *Infusionsther Transfusionsmed*. 1995;22(5):285-90. Epub 1995/10/01.
19. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Three molecular structures cause rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematologic features. *Blood*. 1998;91(6):2157-68. Epub 1998/04/16.
20. Prasad MR, Krugh D, Rossi KQ, O'Shaughnessy RW. Anti-D in Rh positive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(4):1158-62. Epub 2006/09/27.
21. Gardener GJ, Legler TJ, Hyett JA, Liew YW, Flower RL, Hyland CA. Anti-D in pregnant women with the RHD(IVS3+1G>A)-associated DEL phenotype. *Transfusion*. 2012;52(9):2016-9. Epub 2012/02/09.
22. Cannon M, Pierce R, Taber EB, Schucker J. Fatal hydrops fetalis caused by anti-D in a mother with partial D. *Obstet Gynecol*. 2003;102(5 Pt 2):1143-5. Epub 2003/11/11.
23. Wang D, Lane C, Quillen K. Prevalence of RhD variants, confirmed by molecular genotyping, in a multiethnic prenatal population. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(3):438-42. Epub 2010/08/19.
24. Hyland CA, Gardener GJ, O'Brien H, Millard G, Gibbons K, Tremellen A, et al. Strategy for managing maternal variant RHD alleles in Rhesus D negative obstetric populations during fetal RHD genotyping. *Prenat Diagn*. 2014;34(1):56-62. Epub 2013/10/15.
25. Yazer MH, Bruner PA, Bakdash S, Tobian AA, Triulzi DJ, Earnest V, et al. Low incidence of D alloimmunization among patients with a serologic weak D phenotype after D+ transfusion. *Transfusion*. 2016;56(10):2502-9. Epub 2016/07/13.
26. Fung KFK, Eason E. No. 133-Prevention of Rh Alloimmunization. *J Obstet Gynaecol Can*. 2018;40(1):e1-e10. Epub 2017/12/25.
27. Committee on Practice B-O. Practice Bulletin No. 181: Prevention of Rh D Alloimmunization. *Obstet Gynecol*. 2017;130(2):e57-e70. Epub 2017/07/26.

28. Bennardello F, Coluzzi S, Curciarello G, Todros T, Villa S, Italian Society of Transfusion M, et al. Recommendations for the prevention and treatment of haemolytic disease of the foetus and newborn. *Blood Transfus.* 2015;13(1):109-34. Epub 2015/01/31.
29. 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 serologic weak D phenotype. College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. *Transfusion.* 2015;55(3):680-9. Epub 2014/12/03.
30. Virk M, Sandler SG. Rh Immunoprophylaxis for Women With a Serologic Weak D Phenotype. *Lab Med.* 2015;46(3):190-4. Epub 2015/07/23.
31. Taradi M. Građa i svojstva protutijela. In: Andreis I, editor. *Imunologija.* 6 ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. p. 77-104.
32. Qureshi R. *Introduction to Transfusion Science Practice.* 6 ed: British Blood Transfusion Society; 2005.
33. Kulkarni S, Kasiviswanathan V, Ghosh K. A simple diagnostic strategy for RhD typing in discrepant cases in the Indian population. *Blood Transfus.* 2013;11(1):37-42. Epub 2012/08/09.
34. Lai M, Grasso C, Boschi I, D'Onofrio G, Pascali V, Leone G. Characterization of anti-D monoclonal antibody reagents based on their reactivity with the weak D phenotype. *Transfusion.* 2009;49(5):937-42. Epub 2009/01/30.
35. Hussein E, Teruya J. Serologic findings of RhD alleles in Egyptians and their clinical implications. *Transfus Apher Sci.* 2014;51(2):184-7. Epub 2014/09/16.
36. von Zabern I, Wagner FF, Moulds JM, Moulds JJ, Flegel WA. D category IV: a group of clinically relevant and phylogenetically diverse partial D. *Transfusion.* 2013;53(11 Suppl 2):2960-73. Epub 2013/03/07.
37. Campos FC, Mota MA, Aravechia MG, Torres KB, Bub CB, Kutner JM, et al. Variant RHD Types in Brazilians With Discrepancies in RhD Typing. *J Clin Lab Anal.* 2016;30(6):845-8. Epub 2016/10/30.
38. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood.* 2000;95(2):375-87. Epub 2000/01/11.
39. Dajak S, Krstic JL, Kormoczi G, Dogic V, Burilovic V. Characteristics and frequency of DEL phenotype detected by indirect antiglobulin test in Dalmatia county of Croatia. *Transfus Apher Sci.* 2014;50(2):210-3. Epub 2014/02/22.
40. Dogic V, Bingulac-Popovic J, Babic I, Hundric-Haspl Z, Jurakovic-Loncar N, Mratinovic-Mikulandra J, et al. Distribution of weak D types in the Croatian population. *Transfus Med.* 2011;21(4):278-9. Epub 2011/01/29.

41. Noizat-Pirenne F, Verdier M, Lejealle A, Mercadier A, Bonin P, Peltier-Pujol F, et al. Weak D phenotypes and transfusion safety: where do we stand in daily practice? *Transfusion*. 2007;47(9):1616-20. Epub 2007/08/30.
42. Clarke G, Hannon J, Berardi P, Barr G, Cote J, Fallis R, et al. Resolving variable maternal D typing using serology and genotyping in selected prenatal patients. *Transfusion*. 2016;56(12):2980-5. Epub 2016/09/10.
43. Abdelrazik AM, Elshafie SM, Ezzat Ahmed GM, Abdelaziz HM. Combining serology and molecular typing of weak D role in improving D typing strategy in Egypt. *Transfusion*. 2013;53(11 Suppl 2):2940-4. Epub 2013/02/01.
44. Denomme GA, Dake LR, Vilensky D, Ramyar L, Judd WJ. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion*. 2008;48(3):473-8. Epub 2007/12/11.
45. Van Sandt VS, Gassner C, Emonds MP, Legler TJ, Mahieu S, Kormoczi GF. RHD variants in Flanders, Belgium. *Transfusion*. 2015;55(6 Pt 2):1411-7. Epub 2014/11/22.
46. Kacker S, Vassallo R, Keller MA, Westhoff CM, Frick KD, Sandler SG, et al. Financial implications of RHD genotyping of pregnant women with a serologic weak D phenotype. *Transfusion*. 2015;55(9):2095-103. Epub 2015/03/27.
47. Laget L IC, Durieux-Roussel E, Gouvitsos J, Dettori I, Chiaroni J, Ferrera-Tourenc V. Relevance and costs of RHD genotyping in women with a weak D phenotype. *Transfus Clin Biol*. 2018.
48. Hadley A. Laboratory assays for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Transpl Immunol*. 2002;10(2-3):191-8. Epub 2002/09/10.
49. Hadley A. A comparison of in vitro tests for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang*. 1998;74 Suppl 2:375-83. Epub 1998/08/15.
50. Dajak S, Roje D, Haspl Z, Maglic P. The importance of antenatal prevention of RhD immunisation in the first pregnancy. *Blood Transfus*. 2014;12(3):410-5. Epub 2014/06/03.
51. British Committee for Standards in H, Milkins C, Berryman J, Cantwell C, Elliott C, Haggas R, et al. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. British Committee for Standards in Haematology. *Transfus Med*. 2013;23(1):3-35. Epub 2012/12/12.
52. Daniels G. *Human Blood Groups*. 3 ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2013.
53. Schmidt LC, Castilho L, Vieira OV, Sippert E, Gaspardi AC, Martins ML, et al. Impact of a confirmatory RhD test on the correct serologic typing of blood donors. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(5):302-5. Epub 2015/09/27.

## 10. ŽIVOTOPIS

Jelena Lukačević Krstić, dr.med.

Zavod za transfuzijsku medicinu

Klinički bolnički centar Split

Spinčićeva 1

Tel. 021/556-056

Datum i mjesto rođenja: 07. kolovoza 1980., Split

Kućna adresa: Ulica domovinskog rata 5b, 21210 Solin

Mob. 0996734422

### **Obrazovanje**

1999.-2005: Medicinski fakultet sveučilišta u Splitu:

Od 2009.: Poslijediplomski studij „Klinička medicina utemeljena na dokazima“, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu;

2005.-2006.: Pripravnički staž u Domu zdravlja Splitsko-dalmatinske županije;

2007.: položen državni ispit;

2007.-2010.: Specijalistički staž na Zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Split

2011.: položen specijalistički ispit iz transfuzijske medicine

2011.- specijalist transfuzijske medicine na Zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Split;

2014.- voditelj Odsjeka za osiguranje kvalitete na Zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Split.

Aktivno znanje engleskog jezika.

### **Akademski naslovi**

2007.: doktor medicine.

### **Članstvo i aktivnosti u znanstvenim i strukovnim udrugama**

Hrvatski liječnički zbor od 2007.;

Hrvatska liječnička komora od 2007.

### **Objavljeni radovi**

1. Lukacevic Krstic J, Dajak S, Bingulac-Popovic J, Dogic V, Mratinovic-Mikulandra J. Anti-D antibodies in pregnant D variant carriers initially typed as RhD positive. *Transfus Med Hemother*. 2016;43:419-424.
2. Lukacevic Krstic J, Dajak S, Bingulac-Popovic J, Dogic V, Mratinovic-Mikulandra J. Anti-D Reagents Should Be Chosen Accordingly to the Prevalence of D Variants in the Obstetric Population. *J Clin Lab Anal*. 2017 Jun 26. doi: 10.1002/jcla.22285.
3. Dajak S, Krstic JL, Kormoczi G, Dogic V, Burilovic V. Characteristics and frequency of DEL phenotype detected by indirect antiglobulin test in Dalmatia county of Croatia. *Transfus Apher Sci*. 2014;50(2):210-3.
4. Dajak S, Culic S, Stefanovic V, Lukacevic J. Relationship between previous maternal transfusions and haemolytic disease of the foetus and newborn mediated by non-RhD antibodies. *Blood Transfus*. 2013;11(4):528-32.