

Značaj antieritrocitnih protutijela otkrivenih na kontrolnom testiranju za razvoj hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta

Dajak, Slavica

Doctoral thesis / Disertacija

2011

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:171:946737>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**Sveučilište u Splitu
Medicinski fakultet**

Slavica Dajak

**ZNAČAJ ANTIERITROCITNIH PROTUTIJELA
OTKRIVENIH NA KONTROLNOM TESTIRANJU ZA
RAZVOJ HEMOLITIČKE BOLESTI FETUSA I
NOVOROĐENČETA**

Doktorska disertacija

Split, 2011.

Rad je izrađen u Odjelu za transfuziju krvi KBC Split.

Mentor: dr.sc. Željka Hundrić-Hašpl

Zahvale

Posebno zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Željki Hundrić- Hašpl na stručnoj pomoći i potpori tijekom istraživanja.

Također zahvaljujem prof.dr.sc. Vedranu Stefanoviću, prof.dr.sc. Srđani Čulić i doc.dr.sc. Renati Pecotić i Vesni Čapkun mr.sc. na stručnoj pomoći tijekom istraživanja.

Veliko hvala mojim kolegicama Jeli Mratinović- Mikulandra mr.sc., Peri Erceg-Maglić mr.sc., Hanii Dadić-Jadrić mr.sc., Anuški Trlaja mr.sc., Branki Skelin dr. med., Dejana Bogdanić dr. med., Javorki Dodig dr. med. i Eleonori Gjakun dr. med., koje su pratile imunizirane trudnice i pažljivo prikupljale podatke za ovo višegodišnje istraživanje. Zahvaljujem i drugim djelatnicima Odjela za transfuziju krvi, koji su svojim savjesnim radom doprinjeli ovom istraživanju.

Najveća hvala mom suprugu Mirku na pruženoj potpori u ovom istraživanju i u životu.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA.....	1
1. UVOD.....	2
1.1. ERITROCITNI ANTIGENI I ANTIERITROCITNA PROTUTIJELA.....	3
1.1.1. Imunizacija na antigene krvnih grupa.....	3
1.1.2. Obilježja antieritrocitnih protutijela.....	4
1.1.3. Specifičnost antieritrocitnih protutijela.....	5
1.1.3.1. RhD protutijela.....	6
1.1.3.2. Ne-RhD protutijela.....	7
1.1.4. Prijelaz protutijela od majke na fetus.....	8
1.2. HEMOLITIČKA BOLEST FETUSA I NOVOROĐENČETA.....	9
1.2.1. Patofiziologija.....	9
1.2.2. Klinička slika.....	10
1.2.3. Procjena težine bolesti.....	11
1.2.3.1. Neinvazivne metode.....	11
1.2.3.2. Invazivne metode.....	12
1.2.3.3. Procjena težine hemolitičke bolesti novorođenčeta.....	13
1.3.4. Liječenje.....	13
1.3. TESTIRANJE TRUDNICA.....	15
1.3.1. Prvo testiranje u trudnoći.....	15
1.3.2. Kontrolno testiranje RhD negativnih trudnica.....	16
1.3.3. Kontrolno testiranje RhD pozitivnih trudnica.....	17
1.3.4. Test pretraživanja i identifikacija antieritrocitnih protutijela.....	17
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	20
3. METODE I MATERIJAL.....	21
3.1. Metode.....	21
3.1.1. Testiranje trudnica.....	21
3.1.2. Testiranje imuniziranih trudnica.....	21
3.1.3. Testiranje novorođenčadi imuniziranih trudnic.....	22
3.1.4. Liječenje hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta.....	22
3.2. Testovi i materijali.....	25
3.2.1. Testovi za trudnice i roditelje.....	25
3.2.2. Testovi za novorođenčad.....	27

3.3. Opis studije.....	28
3.4. Statističke metode.....	29
4. REZULTATI	30
4.1. Učestalost antieritrocitnih protutijela u trudnica.....	30
4.2. Vrijeme otkrivanja anti-D i ne-RhD protutijela tijekom trudnoće.....	34
4.2.1. Anti-D protutijela otkrivena na kontrolnom testiranju.....	36
4.2.2. Ne-RhD protutijela otkrivena na kontrolnom testiranju.....	38
4.3. Ishod trudnoća s anti-D protutijelima.....	40
4.4. Ishod trudnoća s ne-RhD protutijelima.....	47
4.5. Učestalost teške hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta.....	56
5. RASPRAVA.....	59
6. ZAKLJUČCI.....	65
7. SAŽETAK.....	67
8. SUMMARY.....	68
9. LITERATURA.....	69
10. ŽIVOTOPIS.....	75

POPIS KRATICA

C.I.	– confidence interval
DAT	- direktni antiglobulinski test
Eng.	- engleski
FMK	- fetomaternalna krvarenja
HBFN	- hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta
HBN	- hemolitička bolest novorođenčeta
IAT	- indirektni antiglobulinski test
IK	- izmjena krvi
IUT	- intrauterina transfuzija
IVIG	- intravenski imunoglobulini
RH	- Republika Hrvatska
RhD Ig	- RhD imunoglobulin
TK	- transfuzija krvi

1. UVOD

Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta (HBFN) je bolest u koje antieritrocitna protutijela majke prolaze posteljicu i uzrokuju ubranu razgradnju eritrocita fetusa i novorođenčeta i mogu dovesti do teške anemije i smrti *in utero*. Ipak, većinom hemolitički proces najizraženiji je nakon poroda i slabi smanjenjem količine protutijela u krvi novorođenčeta (1,2,3,4).

HBFN se prvi put u literaturi spominje 1609. godine, kao klinički sindrom koji je smatran nasljednim. Uzrok bolesti ostaje nepoznat do 1939. godine kada je otkriveno da nepodudarnost eritrocita majke i fetusa uzrokuje nastanak antieritrocitnih protutijela u majke koja uzrokuju hemolizu eritrocita fetusa. Tada otkriveno anti-D protutijelo uzrokovalo je većinu HBFN te su novorođenčad RHD negativnih trudnica jedina smatrana rizičnima za nastanak bolesti (2).

Kasnije su otkrivena druga specifična antieritrocitna protutijela koja su uzrokovala jednako teške HBFN sa smrću fetusa i novorođenčeta. Značaj i udio ovih protutijela, kao uzroka HBFN je porastao, poglavito zbog prevencije RHD imunizacije, primjene RhD imunoglobulina (RHD Ig) u RhD negativnih roditelja (1,2,3).

Transfuzijsko liječenje fetusa i novorođenčeta s podudarnom krvi je lijek izbora u teških HBFN. Uz postojeće mogućnosti liječenja intrauterinim transfuzijama (IUT) krvi, izmjenom krvi i transfuzijama krvi novorođenčetu, prognoza bolesti danas ovisi o ranoj dijagnozi i pravovremenom liječenju (1,2,4).

Najveću važnost u ranoj dijagnozi HBFN ima testiranje trudnica na antieritrocitna protutijela. Niti jedan drugi neinvazivni test prenatalne dijagnostike neće pouzdano otkriti sve HBFN. Testiranjem trudnica u prvom tromjesečju trudnoće otkrivaju se trudnice s protutijelima prisutnim od početka trudnoće. Važnost ovog testiranja je nedvojbeno jer su HBFN, u ovih trudnica, najteže.

Zbog fetomaternalnih krvarenja (FMK) tijekom trudnoće test može postati pozitivan, a značaj ovih protutijela kao uzrok HBFN je dvojbena (1,2,3,4).

Ukoliko protutijela otkrivena tijekom trudnoće ne uzrokuju HBFN, kontrolno testiranje svih trudnica (posebno RHD pozitivnih) je neekonomično i nepotrebno (5,6,7,8).

Ako protutijela otkrivena tijekom trudnoće uzrokuju HBFN, potrebno je ispitati za koju skupinu trudnica, pored RhD negativnih trudnica je kontrolno testiranje značajno (5,6,7,8,9).

1.1. ERITROCITNI ANTIGENI I ANTIERITROCITNA PROTUTIJELA

Antigena nepodudarnost među različitim vrstama prepoznata je prije nepodudarnosti unutar iste vrste (1875. godine). Nepodudarnost unutar iste vrste dokazao je Landsteiner 1900. godine, nakon što je pomiješao eritrocite jedne osobe sa serumom druge osobe i dobio aglutinaciju eritrocita. Ovim jednostavnim testom otkrivene su ABO krvne grupe, najveće otkriće u transfuziologiji, za koje je Landsteiner dobio Nobelovu nagradu.

Sljedeći krvno grupni sustav po važnosti je RH sustav. Otkriven je 1940. godine nakon imunizacije Rhesus majmuna s eritrocitima kunića. Eritrocitno protutijelo koje je ovim postupkom nastalo povezano je s eritrocitnim protutijelom u cirkulaciji žene koja je rodila dijete s hidropsom. Dokazano je da je tada otkriveno anti-D protutijelo u serumu roditelje uzrokovalo HBFN (1,2,3,4).

Drugi krvno grupni sustavi Kell, Duffy i Kidd dokazani su otkrićem specifičnih protutijela u serumu, koja su se pojavila, nakon primanja transfuzija krvi, u majki čija su djeca oboljela od HBFN.

Antigeni krvnih grupa su smješteni na eritrocitnoj membrani. Po kemijskom sastavu to su proteini, ugljikohidrati, glikoproteini, glikoforini, određene strukture i funkcije. Razlike u sljedu jedne ili više aminokiselina na proteinu, kao nedostatak ili zamjena pozicije određenog šećera na ugljikohidratu, daju krvno grupnom sustavu antigene osobine. Ove osobine su nasljedne, a njihova učestalost je različita u različitim populacijama (1,2,3,4,10).

Od otkrića antigena ABO sustava, 1900. godine, do danas opisano je oko 650 eritrocitnih antigena, a najveći dio klinički značajnih antigena svrstan je u sustave krvnih grupa (29 krvno grupnih sustava) (1).

1.1.1. IMUNIZACIJA NA ANTIGENE KRVNIH GRUPA

Razlikujemo dva tipa imunskog odgovora, humoralni (posredovan protutijelima) i stanični (posreduju ga limfociti T i makrofagi).

Humoralni imunski put je dominantan nakon imunizacije na aloantigene krvnih grupa, kada primarnim ili sekundarnim imunskim odgovorom nastaju antieritrocitna aloprotutijela (1,4,10).

Tijekom primarnog imunskog odgovora stanice koje prezentiraju antigen razlažu antigen na peptide i izlažu ga pomoćničkim limfocitima T koji potiču limfocite B na proliferaciju i sintezu aloprotutijela. Primarni odgovor je u pravilu spor te se antieritrocitna

protutijela mogu prvi put otkriti tek nakon mjesec i više dana od antigenog podražaja. IgM protutijela nastaju u prvoj fazi primarnoga imunosnog odgovora, a potom gotovo samo IgG aloprotutijela (4,10).

Količina aloprotutijela se vremenom smanjuje, ali limfociti T i B doživotno pamte i sposobni su potaknuti sintezu specifičnog aloprotutijela čim ponovo dođu u kontakt s istim antigenom. Zbog toga se tijekom sljedećeg susreta, u sekundarnom imunosnom odgovoru, "preskače" najduža faza primarnog odgovora - prezentacija antigena pa je sinteza aloprotutijela brza i mogu se otkriti već nakon 24-48 h. Osim toga nastaje velika količina IgG aloprotutijela koja imaju jaki afinitet tj. veću sposobnost vezivanja na eritrocitni antigen (1,2,10).

1.1.2. OBILJEŽJA ANTIERITROCITNIH PROTUTIJELA

a) Imuna protutijela

Imuna protutijela nastaju nakon primjene transfuzija ili nakon FMK. FMK podrazumjeva transplacentarni prijelaz krvi ploda (uključujući fetalne stanice) u majčin krvotok. FMK su gotovo uobičajena tijekom poroda, češća su uz tzv. imunizacijske događaje (pobačaj, amniocenteza, biopsija korionskih resica, prijeteći pobačaj, placenta previa), ali se događaju i bez poznatog uzroka u trudnoći, posebno u trećem tromjesečju. Količina krvi potrebna za imunizaciju majke je vrlo mala iznosi 0.1 ml fetalnih eritrocita (1,3).

Eritrocitni aloantigeni će potaknuti imunosni odgovor, stvaranje protutijela, ovisno o imunogeničnosti antigena. Najjači imonogeni u krvno grupnom sustavu su antigeni ABO sustava. Sljedeći po imunogenosti je RhD antigen. Važnost ABO sustava i RhD antigena su odredili dugogodišnju transfuzijsku praksu tj. transfuzijsko liječenje prema ABO i RhD krvnim grupama (1,2,3). Određivanje drugih eritrocitnih antigena nije dio rutinskog prijetransfuzijskog ispitivanja, iako imunizacija transfuzijom krvi može biti uzrokovana ne-RhD antigenima. Ne-RhD imunizacije su češće posljedica antigen nepodudarnih transfuzija krvi nego li imunizacija nastalih zbog trudnoće (1,2,3). Zbog mogućeg nastanka ne-RhD protutijela (posebno anti-K i anti-c) koja mogu uzrokovati HBFN, potreban je posebni pristup transfuzijskom liječenju žena u generativnoj dobi. Naime, zbog prevencije HBFN, pored davanja krvi prema ABO i RhD krvnoj grupi preporuča se liječiti žene do kraja generativne dobi s Kell, Rhc, RhE i RhC antigen, posebno Kell i Rhc, podudarnom krvi (11,12).

b) *Prirodna protutijela*

Naziv *prirodna protutijela* koristi se za protutijela nastala bez izloženosti stranim eritrocitnim antigenima. Ona su posljedica imunosnog odgovora na antigene iz okoliša jer antigene determinante (epitopi) bakterija, gljivica i biljaka dijele sličnu stereokemijsku strukturu s antigenima krvnih grupa.

Najznačajnija prirodna protutijela, kao i najznačajnija protutijela u transfuziji krvi općenito su protutijela iz ABO sustava, anti-A i anti-B. Nalaze se u krvi osoba koje nemaju istoimeni antigen, a stvaraju se već u rano dojenačko doba. Pored prirodnih protutijela na antigene ABO sustava, postoje prirodna protutijela i na druge antigene krvnih grupa anti-Lewis, anti-M, anti-P1 i druga (1,2,3).

Prirodna protutijela se nazivaju i hladna protutijela jer optimalno reagiraju na temperaturama nižim od tjelesne. Klinički značaj protutijela ovisi o njihovoj reaktivnosti na tjelesnoj temperaturi (anti-A i anti-B su uvijek reaktivna i na 37°C).

Prirodna protutijela su većinom IgM, a mogu biti dijelom i IgG klase. Samo protutijela IgG klase koja su reaktivna na 37°C mogu uzrokovati HBFN. Zanimljivo je da su u osoba krvne grupe O, anti-A i anti-B uvijek dijelom IgG klase. Stoga je novorođenčad trudnica krvne grupe O praktički jedina rizična za nastanak hemolitičke bolesti novorođenčeta (HBN) zbog ABO protutijela (1,2,3,4).

1.1.3. SPECIFIČNOST ANTIERITROCITNIH PROTUTIJELELA

Od 650 eritrocitnih antigena i pripadajućih aloprotutijela s HBFN je povezano oko 50 aloprotutijela (1). RhD aloprotutijela su svakako najznačajnija, ona i danas uz poduzete zaštitne mjere uzrokuju većinu uz to i najteže slučajeve HBFN. Ipak, zaštitne mjere za smanjenje RhD imunizacije, dovele su do porasta udjela i značaja HBFN uzrokovanih ne-RhD protutijelima protutijelima (1,2,3).

To su sljedeća aloprotutijela:

- 1) Rh sustav: anti-c, anti-C, anti-C^w, anti-C^x, anti-e, anti-E, anti-E^w, anti-ce, anti-Rh29, anti-Rh17, anti-Rh32, anti-Evans, anti-Riv;
- 2) Kell sustava: anti-K, anti-k, anti-K^u, anti-Kp^a, anti-Kp^b, anti-Js^a, anti-Js^b;
- 3) Duffy sustava: anti-Fy^a, anti-Fy^b, anti-Fy3;
- 4) Kidd sustava: Jk^a, Jk^b, Jk3;
- 5) Drugi sustavi: anti-M, anti-S, anti-s, anti-U, anti-Mit, anti-PP₁Pk i druga protutijela (1).

Ukupna učestalost klinički značajnih aloprotutijela u populaciji trudnica u regiji Tirol je 0,58%, u Nizozemskoj je 0,3%, u Švedskoj 0,24% (9,13,14).

1.1.3.1. RHD PROTUTIJELA

RhD je najvažniji antigen RH sustava, a u transfuziji krvi zbog svoje imunogeničnosti je sljedeći po važnosti, iza ABO sustava (1). RhD antigen je transmembranski protein koji se nalazi samo na eritrocitima. Kompleksne je građe, serološki je na njemu dokazano 37 epitopa (417 aminokiselina), a genotipizacijom je definirano više od 150 alela RhD gena (15). RhD negativnim osobama (16% Europljana) nedostaje cijeli protein, što objašnjava visoku imunogeničnost RhD antigena (1,2,3).

Manjem broju osoba nedostaje dio RhD antigena ili imaju točkaste mutacije u ekstracelularnom proteinskom lancu i označavaju se kao "parcijalni D", a najpouzdanija metoda određivanja kategorije "parcijalnog D" je genotipizacija (15). Ovakve osobe u kontaktu s RhD pozitivnim eritrocitima mogu stvoriti anti-D protutijela na dio RhD antigena koji im nedostaje (1,2,3,4).

Anti-D protutijela će stvoriti 80% RhD negativnih osoba nakon transfuzije RhD pozitivnih eritrocita, a primarna imunizacija će nastati u šest prvorođki nakon poroda RhD pozitivnog djeteta bez Rh-profilakse. Anti-D protutijela uzrokuju blage do jako teških HBFN sa smrću fetusa i novorođenčeta (1,2,3,4).

Primjena Rh-zaštite, od 1970. godine, značila je preokret u RhD imunizaciji, a time i HBFN. Rh-zaštita podrazumjeva primjenu RhD Ig pripravka visoko koncentriranih RhD aloprotutijela, koja se nakon primjene vežu za RhD pozitivne eritrocite djeteta i spriječavaju aktiviranje imunogenog odgovora majke (4). Obzirom da su FMK najizraženija za vrijeme poroda, primjena RhD Ig do 72 h nakon poroda je najvažnija – poslijenatalna Rh-zaštita. Primjenom poslijenatalne Rh-zaštite smanjena je učestalost RhD imunizacije među RhD negativnim trudnicama s 13 – 19% na 0,7 - 1,9% (11,16,17,18). Obzirom da su FMK moguća tijekom cijele trudnoće, posebno iza 28. tjedna, potrebna je prijenatalna Rh-zaštita u 28. tjednu trudnoće. Višegodišnjom primjenom poslijenatalne i prijenatalne Rh-zaštite te Rh-zaštite u određenim indikacijama (nakon amniocenteze, biopsije posteljice, prijetećeg abortusa, placente previe, te abdominalne traume), u ekonomski razvijenim zemljama smanjen je broj RhD imunizacija na 0,1 - 0,5% (9,16,17,19).

Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske (RH) u Programu mjera zdravstvene zaštite žena odobrilo je primjenu RhD Ig:

- 1) nakon poroda
- 2) prekida trudnoće
- 3) amniocenteze (20).

1.1.3.1. NE-RHD PROTUTIJELA

a) Protutijela iz RH sustava osim anti-D

Do danas je otkriveno 50 antigena iz RH sustava. U transfuziji krvi pored RhD najvažniji su RhC, RhE, Rhc, Rhe i njima pripadajuća protutijela (anti-C, anti-E, anti-c, anti-e) (3). Protutijela iz RH sustava, osim anti-D, uzrokuju blage do jako teških HBFN, a njihov značaj glede HBFN nije jedinstven (1,2,3).

Anti-c protutijelo se javlja s učestalošću od 7:10 000 trudnica, kao uzrok HBFN sljedeća su po važnosti iza anti-D protutijela. Uzrokuju blage do jako teških HBFN. Kroz petnaestogodišnje razdoblje u Engleskoj od 49 perinatalnih smrti uzrokovanih ne-RhD protutijelima, 32 su bila uzrokovana anti-c protutijelima (21). Ovo protutijelo je u oko 40 – 50% trudnica nastalo nakon transfuzije krvi (22).

Anti-E su iza RhD protutijela, sljedeća po učestalosti. Otkrivaju se u 1:1000 trudnica. Rijetko uzrokuju teške HBFN. Pri praćenju 283 trudnice s anti-E protutijelima, samo je jedna trudnoća završila perinatalnom smrću novorođenčeta (23). Anti-E mogu biti prirodna protutijela klase IgM, u tom slučaju ne uzrokuju HBFN (1).

Anti-C se najčešće pojavljuje uz anti-D protutijelo. Samo anti-C protutijelo je otkriveno u 1:10 000 trudnica. Može uzrokovati blage do teških HBFN (24).

Anti-e protutijelo nastaje vrlo rijetko jer je učestalost Rhe antigena u populaciji 98%. Rhe antigen je slabi imunogen, pa su anti-e protutijela gotovo uvijek inducirana transfuzijama krvi. Anti-e protutijelo može uzrokovati srednje tešku HBFN (1).

Anti-C^w su rijetka protutijela jer je RhC^w antigen niske učestalosti (učestalost u populaciji je oko 2%). Anti-Cw uzrokuje uglavnom blage, ali su opisani i slučajevi teških HBFN s kernikterusom (25).

Anti-Rh17 protutijela su izuzetno rijetka jer je Rh17 antigen izuzetno visoke učestalosti. Njegova učestalost u populaciji je 99,99%. U trudnica s anti-Rh17 protutijelima opisani su blaži, kao i vrlo teški oblici HBFN (26,27).

b) *Protutijela iz KELL sustava*

Anti-Kell (anti-K) protutijela nalazimo u 1:1000 trudnica. Nastala su u 80 - 88% trudnica zbog transfuzija Kell pozitivne krvi, a ne zbog trudnoće (1). Iako je K antigen nakon RhD antigena najjači imunogen, zbog male učestalosti Kell pozitivnih osoba (oko 9%) male su šanse da će Kell antigen biti naslijeđen od oca te da će nastati HBFN. Zato je učestalost HBFN uzrokovane anti-K protutijelima daleko manja od učestalosti anti-D protutijela, a prema istraživanjima javlja se u 1 od 20 000 poroda (28).

HBFN uzrokovane anti-K protutijelima imaju srednje tešku do vrlo tešku kliničku sliku, koja ne korelira s visinom titra protutijela. Opisan je kernikterus u djeteta čija je majka imala titar anti-K 1:2 (29). Anti-K osim što kao i ostala eritrocitna protutijela uzrokuju hemolizu eritrocita, suprimiraju eritropoezu te u kliničkoj slici HBFN uzrokovanoj anti-K dominira anemija, koja ne korelira s brojem retikulocita i vrijednostima bilirubina u krvi fetusa i novorođenčeta (30,31).

Supresija eritropoeze s anti-K protutijelima posljedica je imune destrukcije eritrocitnih prekursora jer je Kell antigen prisutan već na eritroblastima, za razliku od RhD antigena koji se na eritrocitnim prekursorima pojavljuje kasnije (1). Treba istaći, ukoliko je u trudnice dokazano anti-K protutijelo, potaknuto isključivo trudnoćama, klinička slika HBFN biti će izrazito teška (1).

Anti-Cellano (anti-k) protutijela su rijetka jer je Cellano (k) antigen visoke učestalosti (učestalost u populaciji je 99,8%). Zbog toga je HBFN uzrokovana ovim protutijelom izuzetno rijetka, ali ukoliko se razvije ima istu kliničku sliku kao i HBFN uzrokovana anti-K protutijelom (32).

Anti-Js^a, anti-Js^b, anti-Kp^a, anti-Kp^b (ostala protutijela na antigene Kell sustava) su uglavnom posljedica antigen nepodudarnih transfuzija krvi. Obzirom da je učestalost Js^a i Kp^a antigena manja od 1%, a Js^b i Kp^b veća od 99%, HBFN uzrokovane ovim protutijelima su izuzetno rijetke (32).

c) *Aloprotutijela iz Duffy sustava*

Anti-Duffy^a (anti-Fy^a) protutijela mogu uzrokovati blage do teških HBFN. Učestalost anti Fy^a protutijela u populaciji trudnica je 5:10 000 (33).

d) *Aloprotutijela iz Kidd sustava*

Kidd (anti-Jk^a i anti-Jk^b) protutijela mogu uzrokovati jake poslijetransfuzijske reakcije, ali vrlo rijetko HBFN (1,8). Do sada je opisan samo jedan slučaj kernikterusa uzrokovan anti-Jk^a protutijelom (34).

1.1.4. PRIJELAZ PROTUTIJELA OD MAJKE NA FETUSA

Prijelaz protutijela od majke na fetus moguć je jedino preko posteljice. Samo protutijela IgG klase prolaze posteljicu i to aktivnim transportom u mjehurićima, vezana za Fc receptore na stanicama sinciotrofoblasta. Uloga Fc receptora nije samo prijenos protutijela i pasivna imunost novorođenčeta i dojenčeta, već i zaštita IgG od normalnog serumskog katabolizma. Poluživot protutijela IgG klase je 21 dan, odnosno 3 - 4 puta duži nego drugih klasa protutijela. Prijenos protutijela je neznatan u prvih 12 tjedana trudnoće. Od 24. tjedna eksponencijalno raste a pri kraju trudnoće količina eritrocitnih aloprotutijela može doseći veće vrijednosti u cirkulaciji djeteta nego u cirkulaciji majke (1,2). Prosječna vrijednost u krvi majke je 12 g/l, a u krvi novorođenčeta 15 g/l (35).

IgG klasa protutijela se sastoji od 4 subklase: IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4. Stanice sinciotrofoblasta najaktivnije prenose subklasu IgG1. Treba naglasiti da receptor Fc IgG vrste I na fagocitima-makrofazima osim za subklasu IgG1 ima visoki afinitet i za sublasu IgG3. Obloženost eritrocita upravo ovim subklasama imunoglobulina "olakšati" će fagocitozu mehanizmom olakšane fagocitoze–opsonizacije odnosno stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima i uzrokovati HBFN (36,37).

1.2. HEMOLITIČKA BOLEST FETUSA I NOVOROĐENČETA

1.2.1. PATOFIZIOLOGIJA

Antieritrocitna protutijela u cirkulaciji fetusa i novorođenčeta vežu se za specifične eritrocitne antigene. Protutijelima obloženi eritrociti mehanizmom olakšane fagocitoze bivaju fagocitirani u slezeni, te životni vijek eritrocita može, u teškoj HBFN, biti skraćen na samo 2 - 3 dana (1,38).

Nastanak i težina anemije ovise s jedne strane o antieritrocitnim protutijelima majke, specifičnosti protutijela, koncentraciji protutijela u krvi, klasi i subklasi te avidnosti protutijela, a s druge strane o sposobnosti hematopoetskog sustava fetusa i novorođenčeta da kompenzira anemiju (1,4). Koštana srž i drugi hematopoetski organi, jetra i slezena, na

nastalu anemiju odgovaraju povećanom proizvodnjom eritrocita i otpuštanjem nezrelih eritrocita u cirkulaciju, kao u fetalne eritroblastoze (38).

Hemolizom eritrocita oslobađa se hemoglobin i njegov metabolički produkt bilirubin. Indirektni–nekonjugirani bilirubin u fetalnom razdoblju prolazi preko posteljice u cirkulaciju majke. Potom se u jetri majke konjugira-konvertira u direktni bilirubin te biva izlučen putem žuči. Stoga vrijednosti ukupnog bilirubina u fetalnoj cirkulaciji i amnionskoj tekućini, premda mogu biti povišene, ne dosežu toksične vrijednosti (1,2,3,4,38). Nakon poroda, jetra novorođenčeta nije sposobna konjugirati i izlučiti bilirubin, posebno u nedonoščadi i nastaje nakupljanje razgradnih produkata bilirubina. Indirektni bilirubin doseže toksične vrijednosti (>20 mg/dl), koje ako je liječenje zakašnjelo mogu uzrokovati trajno oštećenje mozga (1).

1.2.2 KLINIČKA SLIKA

Klinička slika HBFN manifestira se u rasponu od blage (laboratorijski prepoznatljive hemolize), do vrlo teške HBFN s mogućim smrtnim ishodom, već od 8. tjedna gestacije (1,38).

U blažim slučajevima HBFN nastaje ubrzana razgradnja eritrocita, posljedična žutica izraženija od fiziološke i pad hemoglobina veći od fiziološkog pada (1,2).

Teži oblik bolesti očituje se već pri rođenju jačom anemijom, koja zahtijeva liječenje. Razgradnja eritrocita je izražena i bilirubin vrlo brzo raste, a bez hitne izmjene krvi novorođenčetu može nastati *kernikterus* sindrom obilježen letargijom, spazmom, nepravilnim disanjem i trajnim oštećenjem mozga. Vrijednosti bilirubina u krvi i razvoj kernikerusa visoko koreliraju (1,2,4). Kernikterus se neće razviti pri vrijednostima bilirubina < 20 mg/dl u donesene novorođenčadi, dok su u nedonoščadi i niže vrijednosti bilirubina rizične (1).

Jak hemolitički proces u fetalnom razdoblju praćen je slikom fetalne anemije, a u najtežim slučajevima razvije se *hydrops fetalis*, koji obilježavaju generalizirani edemi s jako povećanom jetrom i slezenom te niskim vrijednostima albumina u krvi. Relativno visoke vrijednosti albumina u ascitesu (u odnosu na vrijednosti u krvi) upućuju na oštećenje endotela krvnih žila, kao posljedicu hipoksije. Komplikacije fetalnog hidropsa koje dovode do smrti su intravaskularne tromboze s opsežnim krvarenjima u pluća i mozak (1,38,39).

1.2.3. PROCJENA TEŽINE BOLESTI

Težina HBFN se najpouzdanije određuju iz uzorka krvi. Obzirom da je u fetalnom razdoblju ovaj postupak vrlo invazivan i rizičan za trudnoću, također uzrokuje i veća FMK s porastom količine protutijela, prednost se daje neinvazivnim metodama (1,2).

1.2.3.1. NEINVAZIVNE METODE

a) *Količina protutijela u krvi majke*

Već dugo korištena metoda je semikvantitativna *metoda titracije seruma*, gdje reaktivnost protutijela u epruveti s najvećom dilucijom označavamo kao titar protutijela. Prednost testa je u izvodivosti uz jednostavniju opremljenost laboratorija, dok su nedostaci u različitim rezultatima testa, nastalih zbog različitih metoda rada, subjektivne interpretacije rezultata, nemogućnosti upotrebe istih testnih eritrocita i drugo (1,3,4). Kritična vrijednost semikvantitativnog titra protutijela definirana je kao vrijednost kada su moguće teške HBFN. Kritična vrijednost titra za anti-D i druga protutijela (osim anti-K) je 1:8 do 1:32. Anti-K protutijela mogu izazvati teške HBFN i pri nižem titru (29).

Testom koncentracije protutijela se također određuje količina protutijela u krvi majke. Test je automatiziran, precizniji je od subjektivnog određivanja semikvantitativne količine protutijela, a dostupan je u bolje opremljenim laboratorijima, samo za anti-D protutijela. Koncentracija anti-D protutijela veća od 6 i.u/ml može uzrokovati umjereno teške HBFN (1).

b) *Određivanje IgG subklase protutijela u serumu majke*

IgG subklase se određuju indirektnim antiglobulinskim testom (IAT) pomoću monoklonskih protutijela. Teška HBFN je povezana sa subklasama IgG1 i IgG3. HBFN je lakša ako su prisutna samo IgG1, nego samo IgG3, a najteža ako su prisutna IgG1+IgG3 protutijela (36,37).

c) *Biološki testovi*

Biološkim testovima se određuje sposobnost antieritrocitnih protutijela da potaknu fagocitozu ili lizu eritrocita. Zahtijevniji su za izvođenje nego titar i koncentracija protutijela, ali imaju veću prediktivnu vrijednost (1). Najčešći biološki testovi su:

1) Test monocitima u sloju

U ovom testu eritrociti se obložu ispitivanim protutijelima te dovode u kontakt s

mononuklearima. Potom se mjeri indeks fagocitoze (1). Ovaj test razlikuje blage od teških HBFN pouzdanije nego amniocenteza i određivanje bilirubina iz plodove vode (40).

2) Stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima

U ovom testu eritrociti obloženi protutijelima se oblažu izotopima, a potom inkubiraju s monocitima. Nakon lize oštećenih eritrocita mjeri se količina oslobođenih izotopa (1).

d) Ultrazvučni pregled

Klasičnim ultrazvučnim pregledom mogu se prepoznati teške HBFN u kojih je prisutan ascites ili izljev u pleuralnu ili perikardijalnu šupljinu, odnosno izražena klinička slika fetalnog hidropsa. Nepouzdan je u procjenjivanju fetalne anemije (2).

Obzirom da kod fetalne anemije nastaje veći protok krvi, mjerenje protoka krvi kroz srednju cerebralnu arteriju *Doppler ultrazvukom* može otkriti ovu anemiju. Ovim testom se mogu otkriti umjerene i teške HBFN i bez hidropsa (2).

1.2.3.2. INVAZIVNE METODE

a) Amniocenteza

Amniocenteza je invazivna metoda kojom se uzima uzorak amnionske tekućine i potom 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 (38). Prema Lileyevoj krivulji optička gustoća amnionske tekućine se može interpretirati nakon 27. gestacijskog tjedna. Obzirom da je optička gustoća amnionske tekućine promjenjiva (smanjuje se nakon 27. gestacijskog tjedna), procjenjivanje težine HBFN, prema Lileyevoj krivulji prije 27. gestacijskog tjedna nije pouzdano (38).

b) Uzorak krvi fetusa

Kordocenteza je invazivna metoda gdje se pod kontrolom ultrazvuka preko trbuha majke ulazi u umbilikalnu venu. Procjena fetalne anemije ovom metodom je svakako najpouzdanija jer se direktno iz uzorka krvi fetusa određuju hemoglobin i hematokrit. Određivanje hemoglobina i hematokrita iz umbilikalane krvi je rutinski postupak prije IUT (1,2,4).

Metoda je rizična zbog moguće sekundarne imunizacije i porasta titra protutijela, ali i primarne imunizacije drugim eritrocitnim antigenima. Osim toga, postupak kordocenteze je rizičan radi mogućeg prekida trudnoće (od 606 učinjenih kordocenteza do prekida trudnoće je došlo u 0,8%) (41).

1.2.3.3. PROCJENA TEŽINE HEMOLITIČKE BOLESTI NOVOROĐENČETA

Novorođenčad iz rizične trudnoće, zbog antieritriticnih protutijela majke, se prati nakon poroda. Određuju im se, iz krvi pupkovine i venske krvi, vrijednost bilirubina i hemoglobina, ABO i RhD krvne grupa, specifični eritrocitni antigen (za protutijela majke) i direktni Coombsov test. Obzirom da imuna hemoliza uzrokuje pad hemoglobina i daljnji rast bilirubina, praćenje ovih vrijednosti je važno, posebno u prvim danima života (38,42). Druge pretrage kao što su broj retikulocita i vrijednost serumskog eritropoetina korisne su u razlikovanju hipoproliferativnih od hemolitičkih anemija (36).

S druge strane, nakon poroda rutinski se vrši pregled sve novorođenčadi radi otkrivanja anemije i žutice. Pri tom se primarnom smatra pažljiva klinička procjena i određivanje *Apgar scora* u ranom postporođajnom razdoblju. Simptomi anemije (boja kože, ubrzano disanje, ubrzan rad srca, letargija) utječu na *Apgar scor*. Rutinsko testiranje krvi ne smatra se potrebnim u sve novorođenčadi, izuzev kad postoji sumnja na anemiju i hiperbilirubinemiju te kada u diferencijalnoj dijagnozi dolazi u obzir i HBN (38).

1.2.3. LIJEČENJE

a) *Intrauterine transfuzije*

IUT mogu se primijeniti u peritonealnu šupljinu fetusa ili u umbilikalnu venu.

Prva transfuzija krvi fetusu primjenjena je u *peritonealnu* šupljinu fetusa (Liley, 1963. godine). Iz peritonealne šupljine eritrociti se preko desnog limfatičkog duktusa absorbiraju u krvotok fetusa. Pri tomu važnu ulogu imaju pokreti fetalnog ošita jer pospješuju adsorbiciju eritrocita u krvotok. Ako dijete ima hidrops pokreti ošita su oskudni pa je učinkovitost peritonealnih transfuzija umanjena. Ipak, zbog jednostavnosti primjene peritonealne transfuzije i većeg ukupnog volumena transfudirane krvi ovakva metoda ima svoje mjesto u kombinaciji s intravaskularnom transfuzijom (43).

Krv se, kod *intravaskularne transfuzije* krvi fetusu, pod kontrolom ultrazvuka injicira kroz umbilikalnu venu. Primjenjuje se već od 20. do 24. gestacijskog tjedna, svaka 2 do 4

tjedna (1). U Nizozemskoj u dvanaestogodišnjem razdoblju 210 fetusa je primilo 593 IUT. Preživljenje fetusa bez hidropsa je bilo 92%, dok je u fetusa s hidropsom preživljavanje bilo 78% (44).

Koncentrati eritrocita za IUT trebaju biti krvne grupe "O", podudarni sa serumom majke, sa smanjenim brojem leukocita, tri puta isprani u fiziološkoj otopini i ne stariji od 3 dana. Preostali limfociti iz transfudiranih koncentrata eritrocita, zbog imunosne nezrelosti fetusa, mogu uzrokovati oboljenja presađak protiv primaoca (*engl. Graft Versus Host Disease - GVHD*). Stoga, poradi prevencije GVHD krv treba biti i ozračena.

b) Izmjena krvi novorođenčeta

Ciljevi izmjene krvi novorođenčeta su smanjenje bilirubina u serumu i prevencija daljnjeg rasta bilirubina. Kriteriji za izmjenu krvi uključuju vrijednost bilirubina, vrijednost hemoglobina (u umbilikalnoj i venskoj krvi), gestacijska dob, porođajna težina, te komplikacije kao što su perinatalna asfiksija, acidoza, hipoalbuminemia, hipoglikemija, meningitis i kernikterus (38).

Prilikom izmjene krvi, krv se preko umbilikalne vene naizmjenično aspirira i injicira. Za izmjenu krvi je potreban dva puta veći volumen krvi 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 (1,2). Jednom izmjenom krvi smanjit će se broj nepodudarnih eritrocita za 87%, a bilirubina oko 45% (3,43). Bilirubin i antieritrocitna protutijela nakon izmjene krvi prelaze u krvotok iz ekstravaskularnih prostora te se, u teških HBFN potrebno smanjenje bilirubina i protutijela ne može postići jednom izmjenom krvi (1,2).

Iako je izmjena krvi novorođenčeta znatno povećala preživljenje i gotovo potpuno uklonila rizik od kernikterusa, ozbiljne komplikacije (embolija, spazam krvnih žila, tromboza, srčane aritmije, poremećaj elektrolita) nastaju u 12% novorođenčadi (45).

c) Transfuzije krvi novorođenčetu

Novorođenčadi koja su liječena pomoću IUT ili su liječena izmjenama krvi, kao i novorođenčadi bez prethodnog transfuzijskog liječenja potrebno je, zbog rizika nastanka anemije, pratiti vrijednosti hemoglobina u krvi svakih 7 do 10 dana. Pri padu hemoglobina prema 70 g/l potrebno je liječenje transfuzijama eritrocita (2). Najčešće u prvih 6 do 8 tjedana života mogu biti potrebne jedna ili više transfuzija eritrocita. Za transfuzijsko liječenje

novorođenčeta primjenjuju se koncentracije eritrocita sa smanjenim brojem leukocita podudarni s serumom majke i to 20 ml/kg težine (1,2,3,43).

d) Fototerapija

Izlaganjem novorođenčeta fluorescentnom svjetlu (valne duljine 420 do 480 nm) bilirubin se konvertira u biliverdin, netoksični pigment topiv u vodi (1). Kod blažih oblika HBN, fototerapija je početna metoda za smanjenje bilirubina u krvi. Indikacije za fototerapiju u donesene novorođenčadi su povećanje bilirubina veće od 0,5 mg/dl na dan ili ako ukupni bilirubin prelazi 10, 12, ili 14 mg/dl u 12., 18., ili 24. satu života (1,43).

e) Intravenski IgG

Primjena visokih doza intravenskih imunoglobulina (IVIG) novorođenčetu kod HBN dovodi do pada bilirubina. Njihova primjena u kombinaciji s fototerapijom smanjila je potrebu za izmjenom krvi (46). IVIG su primjenjivani na više načina: u dozi 0,5 g/kg kroz 2 h; u dozi 1 g/kg kroz 4 h; u dozi 0,8 g/kg/dnevno za tri dana (46).

f) Terapijska plazmafereza u majke

Nakon diferencijalnog centrifugiranja krvi trudnice izdvaja se plazma i zamjenjuje albuminima, u cilju smanjenja količine protutijela u cirkulaciji majke. Racionalan pristup za primjenu ove metode, ipak nije donio očekivane rezultate (1,2,3). Plazmafereza se, u centrima koji imaju veliko iskustvo primjene IUT, preporuča kada je u prethodnim trudnoćama nastao fetalni hidrops prije 24. tjedna. Tada bi plazmaferezu trebalo primijeniti već od 12. tjedna trudnoće (47).

1.3. TESTIRANJE TRUDNICA

1.3.1. PRVO TESTIRANJE U TRUDNOĆI

Sve razvijene zemlje propisuju u ranoj trudnoći (10. - 14. tjedan) određivanje ABO krvne grupe, RhD antigena i test pretraživanja antieritrocitnih protutijela (48,49,50).

Testom pretraživanja u ranoj trudnoći otkrivaju se protutijela stvorena prije sadašnje trudnoće. Naime, FMK potrebna za primarnu imunizaciju ne događaju se u normalnim trudnoćama prije 12. tjedna trudnoće, ako se k tome doda da za razvoj protutijela treba 4 tjedna do 6 mjeseci (prosječno 9 tjedana), očito je da primarnu imunizaciju nećemo otkriti u ranoj trudnoći. Stoga je cilj ranog pretraživanja protutijela otkrivanje prethodno imuniziranih

trudnica, koje bi u ovoj trudnoći mogle doživjeti sekundarnu imunizaciju posljedica čega je brz i jak porast titra protutijela (1,2,3,4).

Negativan rezultat testa pretraživanja može značiti da trudnica nije imunizirana, ili je imunizirana, ali je količina protutijela ispod granice otkrivanja testa. Rijetko test pretraživanja može biti negativan, a da su u serumu prisutna klinički značajna antieritrocitna protutijela. Naime, testni eritrociti koji se koriste za rutinsko otkrivanje antieritrocitnih protutijela ne moraju imati antigene čija je učestalost manja od 1% te se s njima neće moći otkriti imunizacija uzrokovana protutijelima na ove antigene. Antieritrocitna protutijela na antigene niske učestalosti vrlo rijetko uzrokuju HBFN. Te se imunizacije u pravilu otkrivaju pri porodu uz simptome HBFN, pozitivan direktni Coombsov test novorođenčeta, bez detektabilnih protutijela majke uz ABO podudarnost (1,2,3,4).

Na prvom testiranju trudnicama se određuje i ABO krvna grupa. Obzirom da protutijela iz ABO sustava nisu povezana s HBF, objašnjenje određivanja ABO krvne grupe leži u mogućoj potrebi transfuzijskog liječenja trudnice i roditelja. S druge strane, budući da je to jedino određivanje ABO krvne grupe u trudnoći, ovom se pretragom selektiraju trudnice krvne grupe "O", čija su novorođenčad rizična za razvoj ABO HBN (1,3).

Određivanje RhD antigena na prvom testiranju jedno je od važnijih u trudnoći. Naime, već je u ranoj trudnoći potrebno identificirati RhD negativne trudnice, zbog mogućnosti primanja RhD-profilakse, odnosno izdvojiti RhD negativne trudnice kao rizičniju skupinu za razvoj HBFN (1,2,3).

1.3.2. KONTROLNO TESTIRANJE RHD NEGATIVNIH TRUDNICA

Zbog FMK koja se dešavaju tijekom cijele trudnoće, negativan test pretraživanja u prvom tromjesečju može na kontrolnom testiranju u trećem tromjesečju postati pozitivan u RhD negativnih i RhD pozitivnih trudnica (1,2,3,4,19,51). Preporuke praktično svih razvijenih zemalja propisuju za RhD negativne trudnice kontrolno pretraživanje protutijela na početku trećeg tromjesečja (28. - 30. tjedna) (48,49,50).

Prema standardima i uputama transfuzijske medicine, u RH, pored navedenog kontrolnog pretraživanja protutijela u 28. tjednu trudnoće, preporuča se i pretraživanje u 34. tjednu trudnoće (52).

Pored otkrivanja RhD imunizacije nastale tijekom trudnoće, u zemljama koje provode rutinsku prijenatalnu Rh-zaštitu, kontrolno pretraživanje u 28. tjednu trudnoće služi i kao posljednja provjera prije primjene Rh-zaštite (1,3).

1.3.3. KONTROLNO TESTIRANJE RHD POZITIVNIH TRUDNICA

Glede kontrolnog testiranja RhD pozitivnih trudnica, u svijetu postoje značajne razlike (48). Prisutne su zbog nedoumice oko kliničke važnosti ne-RhD protutijela stvorenih tijekom trudnoće, za trudnicu i dijete (5,6,7,8,14,53). Eritrocitna protutijela stvorena tijekom trudnoće su bitna za trudnicu u slučaju hitnog transfuzijskog liječenja ili ako uzrokuju HBFN. Rezultati istraživanja HBFN provedeni u više zemalja pokazali su da antieritrocitna protutijela otrivena prvi puta u trećem tromjesečju nisu uzrokovala HBFN pa je zaključeno da je kontrolno testiranje u trećem tromjesečju nepotrebno i neekonomično (5,6,7,8,14,53).

Oprečan zaključak donose Koelewijn i suradnici. Analizirali su učinkovitost testa pretraživanja u prvom tromjesečju u RhD pozitivnih trudnica i zaključili da je prediktivna vrijednost testa pretraživanja u prvom tromjesečju samo 75%. Najčešće su Rhc aloprotutijela uzrokovala HBFN, iako nisu otkrivena na prvom pretraživanju. Zbog toga preporučuju kontrolno testiranje u 30. tjednu samo za Rhc antigen negativne trudnice (9).

1.3.4. TEST PRETRAŽIVANJA I ODREĐIVANJE SPECIFIČNOSTI ANTIERITROCITNIH PROTUTIJELA

Test pretraživanja antieritrocitnih protutijela je primarni test za otkrivanje trudnoće rizične za razvoj HBFN. Niti jedan drugi neinvazivni test prenatalne dijagnostike neće pouzdano otkriti sve HBFN osim ovog testa (1).

Test pretraživanja antieritrocitnih protutijela izvodi se u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT). Može se raditi metodom u epruveti, u mikrostupcu i u mikropločama (54,55). Od komercijalnih testova u mikrostupcu najzastupljeniji su: Ortho Clinical Diagnostics, New Jersey, USA; Diamed GmbH Biorad, Cressier, Switzerland; Scangel GmbH Biorad, Philadelphia, USA (56).

U više studija je uspoređivana osjetljivost metoda u mikrostupcu: Ortho Clinical Diagnostics, new Diamed AG, Biorad-Scangel. Osjetljivost navedenih metoda je bila za klinički značajna protutijela od 90% do 95%, pri tomu niti jedna od metoda nije otkrila sva klinički značajna protutijela (56).

Identifikacija protutijela ili određivanje specifičnosti protutijela se izvodi ako je test pretraživanja pozitivan. Identifikacija se, kao i test pretraživanja, primarno izvodi u IAT. Pored IAT u identifikaciji se koriste drugi testovi: testiranje s enzimom obrađenim testnim

eritrocitima, elucija protutijela s eritrocita, adsorbicija protutijela iz seruma, neutralizacija protutijela u serumu topivim antigenima (54,55).

Kada je određena specifičnost antieritrocitnih protutijela, procjenjuje se njihov klinički značaj. Klinički značaj protutijela nije jednostavno definirati, a najbliža je definicija da su to protutijela koja uzrokuju skraćen životni vijek transfudiranih eritrocita ili uzrokuju HBFN (tablica 1) (1,57).

Tablica 1. Specifična antieritrocitna protutijela po sustavima krvnih grupa i učestalost antigena u Europskoj populaciji. Za svako protutijelo navedena su obilježja, imuna ili prirodna protutijela, kao i njihova povezanost s HBFN.

Antieritrocitna protutijela	Imuna	Prirodna	Uzrokuju HBFN	Učestalost antigena (%)
RH SUSTAV				
Anti-D	+		+	84
Anti-C	+		+	70
Anti-E	+	+	+	30
Anti-c	+		+	80
Anti-e	+		+	98
Anti-C ^w	+	+	+	1
Anti-Rh17	+		+	99,99
KELL SUSTAV				
Anti-K	+	(+)	+	9
Anti-k	+		+	99,9
DUFFY SUSTAV				
Anti-Fy ^a	+		+	65
Anti-Fy ^b	+		+	80
KIDD SUSTAV				
Anti-Jk ^a	+		+	77
Anti-Jk ^b	+		+	73
MNS SUSTAV				
Anti-M	+	+	Rijetko	78
Anti-N	(+)	+	Rijetko	72
Anti-S	+	+	+	55
Anti-s	+		+	89
Anti-U	+		+	99,99
LUTHERAN SUSTAV				
Anti-Lu ^a	+	+	+	8
Anti-Lu ^b	+			99,99
LEWIS SUSTAV				
Anti-Le ^a		+		22
Anti-Le ^b		+		72
P SUSTAV				
Anti-P ₁	(+)	+		79
Anti-PP ₁ P ^k		+	+	99,99
CARTWRIGHT SUSTAV				
Anti-Yt ^a	+		Rijetko	77
Anti-Yt ^b	+			73
DRUGI ANTIGENI				
Anti-Ch ^a	+			98
Anti-Rg ^a	+			97
Anti-Yk ^a	+			92
Anti-Kn ^a	+			99
Anti-JMH	+	+		98
Anti- Vel	+			99,99

2. CILJEVI I HIPOTEZE

Ciljevi ovog istraživanja, provedenog u Odjelu za transfuziju krvi, KBC Split, u razdoblju od 1. siječnja 1993. godine do 31. prosinca 2008. godine, su istražiti:

1. Učestalost anti-D i drugih klinički značajnih protutijela (anti-K, anti-c, anti-E, anti-C, anti-Rh17, anti-Cw, anti-Fya, anti-Fyb, anti,Jka, anti-Jkb, anti-s, anti-S) u ispitivanoj populaciji trudnica
2. Na kojem su testiranju tijekom trudnoće (prvo testiranje ili kontrolna testiranja u 28. tjednu, u 34. tjednu ili na porodu) su prvi put otkrivena navedena protutijela
3. U kojoj trudnoći (prva, druga, treća i kasnije) su protutijela otkrivena na kontrolnom pretraživanju
4. Broj oboljelih od HBFN ako su aloprotutijela otkrivena na prvom testiranju
5. Broj oboljelih od HBFN ako su aloprotutijela otkrivena na kontrolnom testiranju
6. Povezanost HBFN s aloprotutijelima otkrivenim na kontrolnom testiranju u prvorotki i višerotki
7. Procjeniti značaj testiranja RhD negativnih i RhD pozitivnih prvorotki i višerotki u trećem tromjesečju glede ranog otkrivanja HBFN.

Ova studija postavlja sljedeće hipoteze:

1. Uz prijenatalnu Rh-zaštitu koja se provodi u Republici Hrvatskoj, najveća je učestalost anti-D protutijela, a potom ne-RhD protutijela iz Rh i Kell sustava. Sukladno tome najveća je i učestalost teških HBFN uzrokovanih ovim protutijelima.
2. FMK u trudnoći uzrokuju nastanak značajnog broja RhD i ne-RhD imunizacija, koje su otkrivene na kontrolnom testiranju.
3. Anti-D i ne-RhD protutijela otkrivena na kontrolnom testiranju u trećem tromjesečju trudnoće mogu uzrokovati HBFN.

3. METODE I MATERIJAL

U istraživanje su uključene trudnice testirane na Odjelu za transfuziju krvi KBC Split, imunizirane trudnice i novorođenčad imuniziranih trudnica. Istraživanje je provedeno u petnaestgodišnjem razdoblju, od 1. siječnja 1993. godine do 31. prosinca 2008. godine, retrospektivnom analizom dokumentacije Odjela za transfuziju krvi KBC Split, dokumentacije Kliničkog zavodu za patologiju i Zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije. Istraživanje je sveuhvatno za Splitsko-dalmatinsku županiju.

3.1. METODE

3.1.1. TESTIRANJE TRUDNICA

Testiranje trudnica je provedeno, prema preporukama Ministarstva zdravstva i Hrvatskog transfuziološkog društva (9,10). U praćenom razdoblju preporuke za testiranje trudnica su bile istovjetne. Ukoliko su redovnim testiranjem otkrivena antieritrocitna protutijela na istom Odjelu je određena specifičnost protutijela. Ukoliko se specifičnost nije mogla odrediti u KBC Split uzorci krvi su prosljeđeni na daljnje ispitivanje u nacionalni referentni centar Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu u Zagrebu, ako ni u nacionalnom referentnom centru to nije bilo moguće, prosljeđeni su na završnu identifikaciju u Internacionalni referentni imunohematološki centar u Bristolu, Velika Britanija.

Daljnje praćenje trudnica ovisilo je o specifičnost protutijela, a sva testiranja su zabilježena u radnim listama. U dokazanih:

- 1) Protutijela koja ne uzrokuju HBFN: anti-Le; P1, -Bg i druga, trudnice kontrolirane na redovnim kontrolama;
- 2) Protutijela koja rijetko uzrokuju HBFN: anti-M, -N i druga, trudnice su kontrolirane svaka 2 - 3 mjeseca;
- 3) Protutijela koja često uzrokuju HBFN: anti-D, anti-K, anti-c, anti-E, anti-C, anti-Rh17, anti-C^w, anti-Fy^a, anti-Fy^b, anti-Jk^a, anti-Jk^b, anti-s, anti-S. Trudnice su intenzivno kontrolirane do poroda.

3.1.2. TESTIRANJE IMUNIZIRANIH TRUDNICA

Imunizirane trudnice (trudnice s protutijelima koja često uzrokuju HBFN) su, na Odjelu za transfuziju krvi KBC Split, prospektivno praćene pomoću Kartona za ispitivanje

senzibilizacija u trudnoći (slika 1a). Kartoni su pripremljeni nakon otkrivanja protutijela. Prilikom pripreme Kartona upisani su anamnestički podaci trudnice (prethodne trudnoće, ishod prethodnih trudnoća, prethodne transfuzije, bolesti trudnice) te rezultati svih prethodnih testiranja tijekom trudnoće.

Ritam kontrole imuniziranih trudnica je ovisio o specifičnosti aloprotutijela, količini aloprotutijela u krvi trudnice, gestacijskom tjednu te prisustvu specifičnog antigena na eritrocitima oca djeteta. Pri svakoj kontroli određena je količina aloprotutijela (titar) u cirkulaciji trudnice i pretraživanje na druga antieritrocitna protutijela. Rezultati testiranja su upisni u Kartone ispitivanja senzibilizacija u trudnoći, a oni se nalaze na Odjelu za transfuziju krvi KBC Split (slika 1a i 1b).

3.1.3. TESTIRANJE NOVOROĐENČADI IMUNIZIRANIH TRUDNICA

Novorođenčadi imuniziranih trudnica je neposredno nakon poroda, iz uzorka krvi pupkovine, određen specifični eritrocitni antigen i direktni antiglobulinski test (DAT). Ukoliko je DAT iz pupkovine bio pozitivan, iz uzorka venske krvi je određena ABO krvna grupa i RhD antigen te DAT. Novorođenčadi s pozitivnim DAT-om, u čijih su majki bila prisutna dva i više antieritrocitna protutijela, napravljena je elucija, „skidanje“ protutijela s eritrocita novorođenčeta, potom identifikacija aloprotutijela u eluatu.

HBFN koje nisu otkrivene tijekom trudnoće (test pretraživanja tijekom trudnoće je bio negativan ili majke nisu bile na redovnim kontrolama), otkrivene su nakon poroda zbog sumnje kliničara na HBN. Ovoj novorođenčadi je iz uzorka venske krvi određena ABO krvna grupa, RhD antigen i DAT. Ukoliko je DAT novorođenčeta bio pozitivan uzorak krvi majke je potom testiran na antieritrocitna protutijela. Time je postignuta sveobuhvatnost nad HBFN.

3.1.4. LIJEČENJE HEMOLITIČKE BOLESTI FETUSA I NOVOROĐENČETA

Nakon poroda, razvoj HBN su pratili neonatolozi. Liječenje HBN je bilo prema prema preporukama posljednjeg izdanja «Nelson textbook of Pediatrics» (38,58,59,60). Prema preporukama kriteriji za liječenje HBN bile su vrijednosti hemoglobina, vrijednosti bilirubina (u venskoj krvi i u krvi pupkovine), gestacijska dob, porođajna težina i komplikacije kao što su perinatalna asfiksija, acidoza, hipoalbuminemija, hipoglikemija, meningitis i znakovi kernikterusa.

KARTON ISPITIVANJA SENZIBILIZACIJA U TRUDNOĆI

Broj

Prezime, ime oca - majke, ime trudnice

Datum rođenja

Adresa

Zanimanje

Gdje radi

Ranija ispitivanja

TRUDNOĆA	DATUM PORODA	ANAMNEZA: dječje bolesti, srčane, epilepsija, dijabetes, anemija, žutica, visoki tlak, TBC, alergija, trauma, uzimanje lijekova	ISHOD: abortsus, prijevremeni porod, mrtvo ili živo rođeno dijete	Primjena transfuzije kod majke ili djeteta	Ako je dijete živo da li je dobio žuticu, anemiju ili je zatraženo	SPOL	TCZINA	NAPOMENA
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								

Tiskara "BRAMIT" Split

Slika 1a. Karton ispitivanja senzibilizacije u trudnoći

PREZIME IME	ABO kivna grupa	Rh FENOTIP		OSTALE KRVNE GRUPE		ERITROCITNI PANEI		HLA TIPIZACIJA		NAPOMENA
		Fenotip	Datum	Bt. protokol	Datum	Bt. prot.	Datum	Bt. prot.	Datum	
OT										
DUEGA										

KONTROLE	Datum	Broj protokol	DC		ANITIJELA U SERUMU			Kontrola nakon aplikacije	HLA		NAPOMENA
			poliv.	IgG	SLANA SREDINA +4°C	S PAPAN. +20°C	ERITR. +37°C		I C poliv.	IgG	

Slika 1b. Karton ispitivanja senzibilizacije u trudnoći

U liječenju HBN su korištene fototerapija, izmjena krvi i transfuzije eritrocita. Krv je pripravljena isključivo na Odjelu za transfuziju krvi, a podaci o liječenju su upisni u Kartone (slika 1b).

Liječenje HBF pomoću IUT eritrocita centralizirano je u Zagrebu, KBC Zagreb ili Općoj bolnici Sveti Duh. Podaci o liječenju u ovim ustanovama, dobiveni su iz otpusnog pisma novorođenčeta i uneseni u Karton za ispitivanje senzibilizacije u trudnoći.

3.2. TESTOVI I MATERIJALI

3.2.1. TESTOVI ZA TRUDNICE I RODILJE

a) ABO krvna grupa i RhD antigen

ABO krvna grupa je određena uporednim testiranjem ABO antigena na eritrocitima i regularnih protutijela u serumu trudnica.

ABO antigeni su određeni pomoću monoklonskih protutijela anti-A, anti-B i anti-AB, proizvođača Dominion Biologicals Limited, Nova Scotia, Canada i proizvođača Biognost, Zagreb, Hrvatska. Anti-A i anti-B protutijela u serumu su određena s testnim eritrocitima A1, B i O. Korišteni su eritrociti višestrukih dobrovoljnih davaoca krvi poznate krvne grupe. Određivanje ABO antigena i regularnih protutijela je uporedno dvostruko testirano s dvije linije monoklonskih protutijela i dvije stanične linije testnih eritrocita.

RhD antigen je određen usporednim testiranjem s dvije monoklonske linije reagensa, anti-D Novaclone, proizvođača Dominion Biologicals Limited, Nova Scotia, Canada i anti-D MG proizvođača Biognost, Zagreb, Hrvatska. Trudnicama koje su bile RhD negativne u direktnoj aglutinaciji, RhD antigen je testiran u IAT s poliklonskim anti-D protutijelima, anti-D human, proizvođača Ortho Clinical Diagnosis, New Jersey, USA.

b) Test pretraživanja antieritrocitnih protutijela metodom u epruveti

Ovaj test je rađen od 1. siječnja 1993. godine do 30. travnja 1998. godine. U testiranju su korišteni dvostanični testni eritrociti (Selectogen I i II, Ortho Clinical Diagnosis, New Jersey, USA), nisko ionska otopina (BLISS, Ortho Clinical Diagnosis, New Jersey, USA) i polispecifični AHG (Ortho Clinical Diagnosis, New Jersey, USA). Na testnim eritrocitima bili su prisutni slijedeći eritrocitni antigeni: D, C, E, c, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, M, N, S, s, Le^a, Le^b, P1. Test je rađen prema upustvima u tri faze (57). U prvoj fazi testa ukapane su u dvije epruvete po dvije kapi seruma trudnice i jedna kap testnih eritrocita (Selectogen I u prvu epruvetu i Selectogen II u drugu). Nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi očitana

je aglutinacija eritrocita (1. faza). Druga faza inkubacije na 37°C se uz dodak nisko ionske otopine odvijala 30 minuta. U trećoj fazi nakon pranja eritrocita dodan je polispecifični AHG, a potom očitana aglutinacija eritrocita. Rezultat testa je očitana makroskopski i aglutinoskopom kao negativan ili pozitivan od 1+ do 4+.

c) Test pretraživanja antieritrocitnih protutijela metodom u mikrostupcu

Testiranje antieritrocitnih protutijela u IAT je rađeno u BioVue mikrometodi (Ortho Clinical Diagnosis, New Jersey, USA) od 30. travnja 1998. godine do 31. prosinca 2008. godine. Testiranje je rađeno prema uputstvima proizvođača. U testiranju su korišteni dvostanični testni eritrociti (Selectogen I i II, Ortho Clinical Diagnosis, New Jersey, USA) i polispecifične BioVue mikrokartice.

Prema uputstvima proizvođača testni eritrociti i serum trudnice su ukapani u mikrokartice, nakon inkubacije mikrokartice su centrifugirane (centrifuga BioVue Ortho Clinical Diagnosis, New Jersey, USA), a rezultat testa je očitana makroskopski, negativanim ili pozitivanim - od 1+ do 4+ (slika 1).

d) Određivanje specifičnosti antieritrocitnih protutijela

Određivanje specifičnosti antieritrocitnih protutijela primarno je izvedeno u IAT-u u mikrometodi Ortho Clinical Diagnosis, New Jersey, USA. U identifikaciji su korišteni testni eritrociti proizvođača Ortho Clinical Diagnosis, New Jersey, USA (Panel A, Panel B, BioVue Top) i proizvođača Dominion Biologicals Limited, Nova Scotia, Canada (Panocell).

e) Određivanje količine antieritrocitnih aloprotutijela

Određivanje količine antieritrocitnih aloprotutijela izvedeno je semikvantitativnom metodom titriranja seruma u epruveti; u prvoj fazi testa - direktna aglutinacija, određena su kompletna protutijela (IgM); u drugoj fazi testa, u IAT određena su inkompletna protutijela (IgG) (27). Najveća dilucija seruma koja je dala makroskopski vidljivu aglutinaciju od +1, označena je kao krajnja točka titra (27).

3.2.2. TESTOVI ZA NOVOROĐENČAD

a) Određivanje ABO krvne grupe i RhD antigena

Određivanje ABO antigena na eritrocitima metodom direktne aglutinacije komercijalnim reagensijama koje sadrže monoklonska protutijela određena je ABO krvna grupa. Korištene su mikrokartice Newborn proizvođača Ortho Clinical Diagnosis, New Jersey, USA i reagensi anti-A, anti-B i anti-AB proizvođača Biognost, Zagreb, Hrvatska, u uporednom dvostrukom testiranju.

RhD antigen je također određen metodom direktne aglutinacije s komercijalnim reagensijama koje sadrže monoklonska protutijela usporednim testiranjem s dvije linije monoklonski protutijela. Korištene su mikrokartice Newborn proizvođača Ortho Clinical Diagnosis, New Jersey, USA i reagens anti-D MG, proizvođača Biognost, Zagreb, Hrvatska, u uporednom dvostrukom testiranju.

b) Direktni Coombsov test ili direktni antiglobulinski test

Obloženost eritrocita novorođenčeta protutijelima majke je ispitana DAT-om u mikrometodi. Korištene su polispecifične mikrokartice BioVue proizvođača Ortho Clinical Diagnosis, New Jersey, USA. Nakon ukapavanja eritrocita u mikrokarticu i centrifugiranja mikrokartice rezultat testa je očitao kao negativan ili pozitivan - od 1+ do 4+ (slika 1).

c) Određivanje drugih eritrocitnih antigena

Eritrocitni antigeni: RhC, Rhc, RhE, Rhe, RhC^w, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, M, N, S, s, određeni su serološkom metodom aglutinacije eritrocita u epruveti. Metodom direktne aglutinacije s monoklonskim protutijelima i metodom indirektna aglutinacije s poliklonskim protutijelima. Određivanje svakog eritrocitnog antigena je napravljeno prema zadanim uputama proizvođača reagensa.

d) Elucija protutijela vezanih za eritrocite i identifikacija eluiranih protutijela

Elucija «skidanje» protutijela vezanih za eritrocite izvedena je postupkom elucije toplinom ili elucijom u kiselom mediju.

Kod elucije toplinom antieritrocitna protutijela su odvojena od eritrocitnih antigena nakon izlaganja eritrocita kroz 10 minuta na temperaturi od 56 °C (27).

Kod elucije u kiselom mediju antieritrocitna protutijela su odvojena od eritrocitnih antigena nakon dodavanja kiseline i spuštanja pH na 3. Za ovaj test korišten je komercijalni set glicin/HCl EDTA Dicedel, Diamed, Cresser, Switzerland.

Antieritrocitna protutijela dobivena postupkom elucije su identificirana u IAT s komercijalnim panelima, Panel A i Panel B (Ortho Clinical Diagnosis, New Jersey, USA).

3.3. OPIS STUDIJE

Istraživanje je provedeno analizom dokumentacije iz redovnog rada te unošenjem podataka u računalni program Microsoft Excel. Analizirana je sljedeća dokumentacija:

1) Radne liste Odjela za transfuziju krvi

Uvidom u radne liste određen je ukupan broj testiranih trudnica (RhD negativnih i RhD pozitivnih) te broj trudnica s antieritrocitnim protutijelima (s protutijelima koja ne uzrokuju HBFN, koja rijetko uzrokuju HBFN i koja često uzrokuju HBFN).

2) Obrazci za praćenje imunizacija

Iz Obrazaca za svaku trudnoću s antieritrocitnim protutijelima analizirani su sljedeći podatci:

- Specifičnost antieritrocitnih protutijela koja uzrokuju HBFN
U trudnica s dva i više klinički značajna protutijela povezana s antigenom oca djeteta određeno je dominantno protutijelo sljedom anti-D, anti-K, anti-c, anti-E, anti-C, anti-Rh17, anti-Cw, anti-Fy^a, anti-Fy^b, anti-Jk^a, anti-Jk^b, anti-s, anti-S.
- Vrijeme otkrivanja protutijela u trudnoći, prvo testiranje u trudnoći ili kontrolno testiranje (28. tjedan, 34. tjedan, porod). Za određivanje značaja protutijela otkrivenih na kontrolnom testiranju uzete su isključivo imunizirane trudnice u kojih su protutijela otkrivena na kontrolnim testiranjima (28. tjedan, 34. tjedan i porod), s posebnim naglaskom da im je test pretraživanja na prvom testiranju u tekućoj trudnoći bio negativan. U ovih trudnica prvo kao i kontrolno testiranje je izvedeno na Odjelu za transfuziju KBC Split.
- Redni broj praćene trudnoće (prva trudnoća, druga, treća i više) analiziran je u trudnica u kojih su protutijela otkrivena na kontrolnim testiranjima u trudnoći.
- Rezultati testiranja novorođenčeta (specifični eritrocitni antigen i DAT)

- Primjenjeno transfuzijsko liječenje HBFN (IUT, izmjena krvi ili transfuzija krvi). HBFN je smatrana teškom ukoliko su specifični eritrocitni antigen i DAT bili pozitivni, a HBFN je liječena IUT i/ili izmjenom krvi i/ili transfuzijom krvi.

3) *Obdukcijski nalazi*

Obdukcijski nalazi u slučaju pobačaja, mrtvorodenog djeteta i smrti novorođenčeta su analizirani na Kliničkom zavodu za patologiju KBC Split. Mrtvorodena djeca i novorođenčad umrla nakon poroda u kojih je HBFN bila uzrok smrti su pribrojana teškoj HBFN.

Istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva KBC Split.

3.4. STATISTIČKE METODE

Rezultati su analizirani korištenjem Statistica 7.0. (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Primjenjene su deskriptivne statističke metode, broj, udio i učestalost antieritrocitnih protutijela u trudnica te broj, udio i učestalost HBFN. Učestalost antieritrocitnih protutijela je određena na broj testiranih trudnica, dok je učestalost HBFN određena na ukupan broj novorođene djece u Splitsko-dalmatinskoj županiji za praćeno razdoblje. Broj, udio i učestalost antieritrocitnih protutijela i HBFN određeni su općenito za anti-D i ne-RhD protutijela te za svako specifično antieritrocitno protutijelo.

4. REZULTATI

4.1. UČESTALOST ANTIERITRICITNIH PROTUTIJELA U TRUDNICA

U Splitsko-Dalmatinskoj županiji razdoblju od 1. siječnja 1993. godine do 31. prosinca 2008. godine bilo je 85 600 novorođenih. Na Odjelu za transfuziju krvi u KBC Split u istom razdoblju je testirano 84 000 trudnoća. Time je prijenatalna obuhvatnost testom pretraživanja bila 98%. Test pretraživanja antieritrocitnih protutijela je u 29.200 trudnoća rađen metodom u epruveti od 01. siječnja, 1993. godine do 30. travnja, 1998. godine, a u 54.800 trudnoća metodom u mikrostupcu od 01. svibnja, 1998. godine do 31. prosinca 2008. godine.

Antieritrocitna protutijela su otkrivena u 1105 (1,35%) trudnoća od 84 000 testiranih (tablica 1). Pri tomu su protutijela koja ne uzrokuju HBFN otkrivena u 553 (50%) trudnoće, protutijela koja rijetko uzrokuju HBFN u 197 (18%), dok su protutijela koja često uzrokuju HBFN otkrivena u 355 (32%) trudnoća (tablica 2).

Daljnje istraživanje provedeno je u trudnica s protutijelima koja često uzrokuju HBFN, 298 trudnica, odnosno 355 trudnoća. Tijekom studije od 1993. godine do 2008. godine, 47 trudnica s protutijelima koja često uzrokuju HBFN je imalo više od jedne trudnoće (raspon od 2 do 4) stoga je od 298 trudnica ukupno praćeno 355 trudnoća (tablica 3).

Tablica 2. Distribucija i učestalost antieritrocitnih protutijela u trudnica u razdoblju od 1. siječnja 1993. godine do 31. prosinca 2008. godine

Antieritrocitna protutijela	Broj trudnoća	%	Učestalost na 10 000 trudnica (95 % C.I.) [#]
Protutijela koja ne uzrokuju HBFN	553	50	67 (61-74)
Anti-Le	314	38	38 (33-43)
Anti-Pl	57	5	7 (5-9)
Nespecifična hladna protutijela	168	15	20 (17-24)
Anti-HLA	12	1	1,5 (5-24)
Anti-Ch i Rg	2	0,2	0,2 (0-0.6)
Protutijela koja rijetko uzrokuju HBFN	197	18	24 (20-21)
Anti-M	181	7	22 (18-26)
Autoprotutijela	13	1	1,6 (0.6-2.6)
Anti-Yt ^a	2	0,2	0.2 (0-0.6)
Anti-Jr ^a	1	0,1	0,1 (0-0.4)
Protutijela koja često uzrokuju HBFN	355	32	43 (38-48)
Anti-D	196	18	129 (107-150)*
Druga protutijela osim anti-D	159	14	19 (16-23)
Ukupno	1105	100	132 (125-144)

[#] Učestalost antieritrocitnih protutijela je određena na ukupan broj testiranih trudnica (N=84 000)

* Učestalost anti-D protutijela je određena na broj testiranih RhD negativnih trudnica (N=15 200)

Najčešća protutijela koja često uzrokuju HBFN su anti-D protutijela, otkrivena su u 155 trudnica, odnosno 196 (55%) trudnoća te je učestalost anti-D protutijela kod RhD negativnih trudnica bila 1,29% (1,07-1,50% 95% interval pouzdanosti (*engl. Confidence interval C.I.*) (tablica 3). Od 196 trudnoća s anti-D protutijelima u 158 (45%) je bilo prisutno samo anti-D, a u 37 (10%) trudnoća anti-D je bilo u kombinaciji s drugim protutijelima. Anti-C protutijelo se najčešće pojavljuje uz anti-D, u 24 trudnoće (7%). Druga protutijela s anti-D su prisutna u 13 trudnoća, anti-K (5), anti-E (5), anti-S (2) te jedna trudnica anti-C+E+Fya protutijelima (tablica 3). Tijekom studije anti-D protutijela su stvorile tri trudnice s "parcijalnim D" antigenom, i to "parcijalni D - Va kategorije" (2 trudnice), "parcijalni D - kategorija DNB" (1 trudnica).

Ne-RhD protutijela su otkrivena u 142 trudnice, odnosno 159 (45%) trudnoća, time je učestalost ne-RhD protutijela bila 0,2% (0,16-0,23% 95% C.I.) (tablica 2) U skupini ne-RhD protutijela bila su: anti-K, anti-E, anti-c, anti-C, anti-Rh17, anti-C^w, anti-Fy^a, anti-Jk^a, anti-Jk^b, anti-S i anti-s protutijela (tablica 3). Najčešća od navedenih su anti-K protutijela. Anti-K je bilo dominantno protutijelo u 45 trudnoća (13%); u 41 su bila samo anti-K, a u 4 trudnoće anti-K s drugim protutijelima, anti-C (1), anti-E i anti-Vel (1), anti-Fy^a (1), anti-S (1) protutijelima. Anti-c protutijela su bila dominantna u 37 trudnoća (10%); u 34 bilo je prisutno samo anti-c; u 3 trudnoće anti-c s drugim protutijelima, anti-C^w (1) i anti-E (2). Anti-E je bilo dominantno protutijelo u 40 trudnoća (11%). U 39 trudnoća praćeno je bilo samo anti-E, a u jednoj bilo je u kombinaciji s anti-Fy^a. Od drugih protutijela iz Rh sustava anti-C^w je dokazano u dvije trudnoće, a anti-Rh17 u 4 trudnoće. Protutijela iz Duffy sustava anti-Fy^a su bila dominantna u 7 trudnoća, a u jednoj trudnoći anti-Fy^a je bilo prisutno s anti-Jk^b protutijelom. Protutijela iz Kidd sustava su bila dominantna u 8 trudnoća, anti-Jk^a (7) i anti-Jk^b (1), dok su protutijela iz Ss sustava su dokazana u 7 trudnoća, anti-S (6) i anti-s (1) (tablica 3).

Tablica 3. Distribucija i učestalost antieritrocitnih aloprotutijela koja uzrokuju HBFN, u razdoblju od 1. siječnja 1993. godine do 31. prosinca 2008. godine

Dominantna antieritrocitna protutijela	Broj trudnoća	%	Učestalost na 10 000 trudnica (95 % C.I.) [#]
Anti-D	196	55	129 (107-150)*
D	158		
D + C	24		
D + E	5		
D + K	5		
D i druga osim C ili E ili K	3		
Anti-K	45	13	5,5 (3-7)
K	41		
K i druga osim c ili D	4		
Anti-c	37	10	4,5 (3-6)
c	34		
c + E	2		
c plus druga osim D ili K ili E	1		
Anti-E	40	11	5 (3-7)
E	39		
E i druga osim D ili c ili K	1		
Anti- C	9	3	1 (0,3-2)
C	5		
C + e	2		
C i druga osim D ili K ili e	2		
Druga protutijela iz RH sustava	6	2	7 (0,1-1,4)
Cw	2		
Rh 17	4		
Anti-Fy	7	2	0,8 (0,1-1,6)
Fy ^a	6		
Fy i druga osim RH i Kell	1		
Anti- Jk	8	2	0,9 (0,2-1,8)
Jk ^a	7		
Jk ^b	1		
Ss protutijela	7	2	0,8 (0,1-1,6)
S	6		
s	1		
Ukupno	355	100	43 (38-48)

[#] Učestalost protutijela je određena na ukupan broj testiranih trudnica (N=84 000)

* Učestalost anti-D protutijela je određena na broj RhD negativnih trudnica (N=15 200)

4.2. VRIJEME OTKRIVANJA ANTI-D I NE-RHD PROTUTIJELA TIJEKOM TRUDNOĆE

Protutijela koja uzrokuju HBFN, anti-D i ne-RhD, otkrivena su na prvom i na kontrolnim testiranjima u trudnoći.

Od 196 trudnoća s anti D protutijelima u 124 (63%) anti-D su otkrivena na prvom testiranju, a čak u 72 (37%) trudnice anti-D su prvi puta otkrivena na kontrolnim testiranjima (rezultat prvog testiranja ovim trudnicama je bio negativan) (tablica 4).

Od 159 trudnoća s ne-RhD protutijelima u 143 (90%) protutijela su otkrivena na prvom testiranju, a u 16 na kontrolnim testiranjima (rezultat prvog testiranja ovim trudnicama je bio negativan) (tablica 4)

Tablica 4. Broj i udio trudnica s anti-D i ne-RhD protutijelima otkrivenim na prvom i na kontrolnim testiranjima u trudnoći

Antieritrocitna protutijela	Prvo testiranje	Kontrolna testiranja	Ukupno
Anti-D	124 (63 %)	72(27%)	196 (100%)
Metoda u epruveti	54	28	82
Metoda u mikrostupcu	70	44	114
Ne-RhD	143 (90%)	16 (10 %)	159 (100%)
Metoda u epruveti	41	6	47
Metoda u mikrostupcu	102	10	112

Anti-D protutijela su otkrivena u 82 trudnoće metodom u epruveti (u 54 na prvom testiranju i 28 na kontrolnim testiranjima), dok su u 114 trudnoća otkrivena metodom u mikrostupcu (u 70 na prvom testiranju i 44 na kontrolnim testiranjima) (tablica 4).

Ne-RhD protutijela su otkrivena u 47 trudnoća metodom u epruveti (u 41 na prvom testiranju i 6 na kontrolnim testiranjima), dok su u 112 trudnoća otkrivena metodom u mikrostupcu (u 102 na prvom testiranju i 10 na kontrolnim testiranjima) (tablica 4).

Analizom prvog testiranja u trudnoći uočeno je da sve trudnice nisu došle u prvom tromjesečju na testiranje, iako su, prema važećim preporukama trebale doći (52). Od 124 trudnice s anti-D protutijelima otkrivenim na prvom testiranju, prvo testiranje je obavljeno u prvom tromjesečju u 66 (53%) trudnica, u drugom tromjesečju u 28 (23%), a čak je 30 (24%) trudnica došlo prvi put tek u trećem tromjesečju (tablica 5).

Od 143 trudnice s ne-RhD protutijelima otkrivenim na prvom testiranju, prvo testiranje je bilo u prvom tromjesečju u 68 (48%) trudnica, u drugom tromjesečju u 32 (22%), a čak su 43 (30%) trudnice prvi put došle tek u trećem tromjesečju. (tablica 5).

Tablica 5. Broj trudnoća s anti-D i ne-RhD protutijelima, otkrivenih na prvom testiranju u prvom, drugom i trećem tromjesečju trudnoće

Antieritrocitna protutijela otkrivena na prvom testiranju	Anti-D N=124	ne-RhD N=143
Prvo tromjesečje	66 (53%)	68 (48%)
Drugo tromjesečje	28 (23%)	32 (22%)
Treće tromjesečje	30 (24%)	43 (30%)

4.2.1. ANTI-D PROTUTIJELA OTKRIVENA NA KONTROLNOM TESTIRANJU

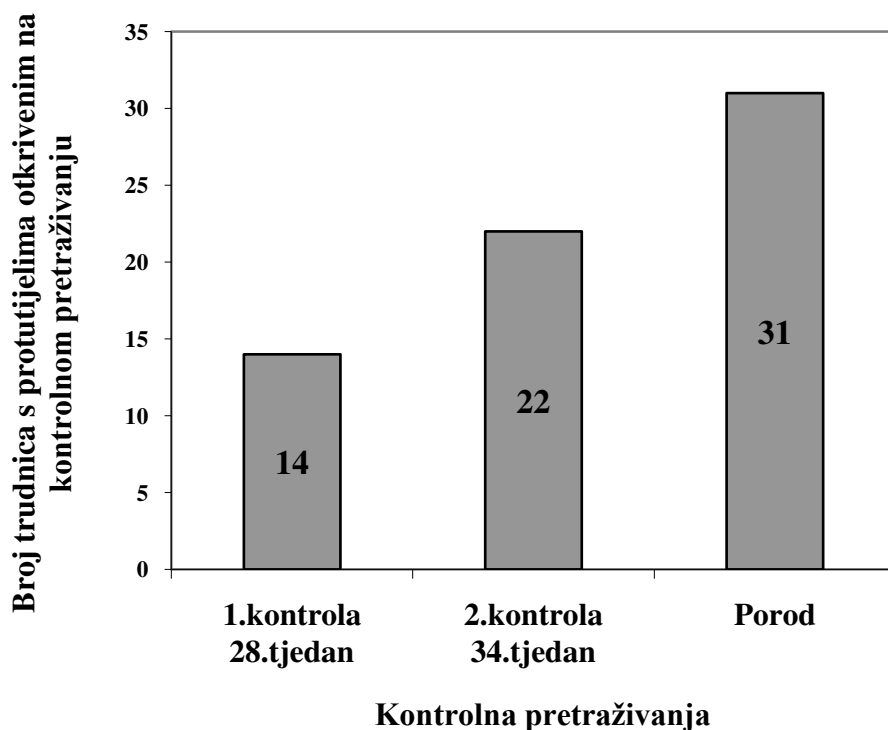
Prema važećim standardima RhD negativne trudnice u kojih je test pretraživanja bio negativan na prvom testiranju naručene su u 28. tjednu trudnoće (1. kontrola), ako je test bio negativan, naručene su ponovno u 34. tjednu trudnoće (2. kontrola). Testiranje nakon poroda se radilo u svih RhD negativnih roditelja radi primjene Rh-zaštite (porod).

Rezultati analize 72 RhD imunizacije nastale tijekom trudnoće su:

- 1) Na prvoj kontroli anti-D protutijela su otkrivena u 14 (19%) trudnica, što znači da su FMK prije šestog mjeseca trudnoće dovela do imunizacije;
- 2) Na drugoj kontroli protutijela su otkrivena u 22 (31%) trudnice;
- 3) Najveći broj anti-D protutijela otkriven je na porodu, u 31 (43 %) trudnice (slika 2).

Iz prikaza je vidljivo da pojavnost anti-D protutijela raste od 28. tjedna trudnoće do poroda (slika 2).

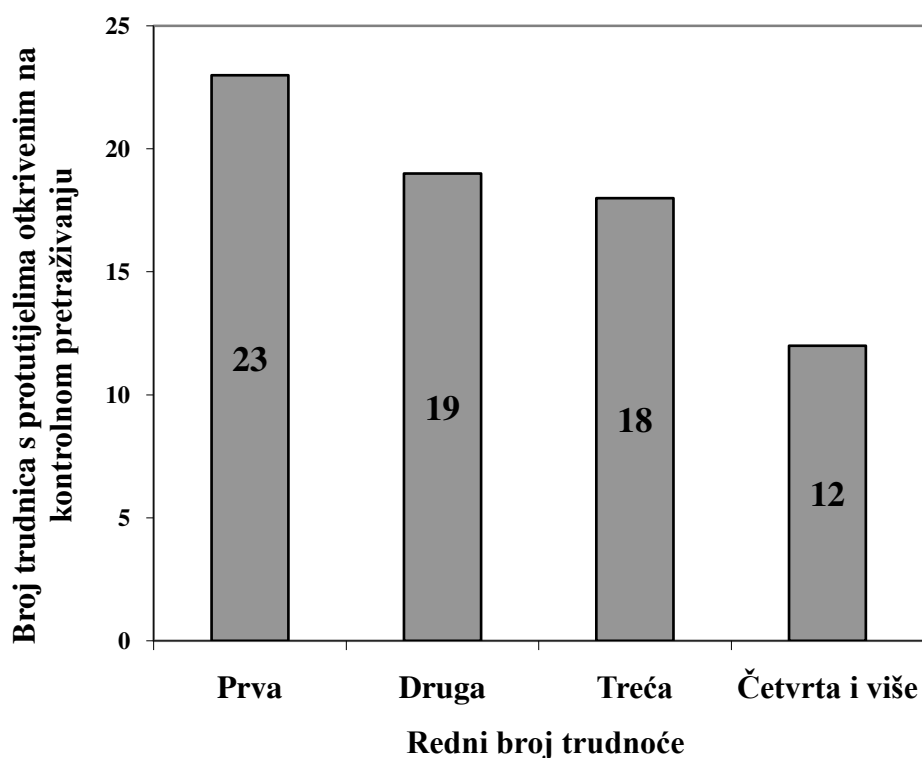
U skupini RhD imunizacija nastalih tijekom trudnoće bilo je 5 (7 %) trudnica koje nisu bile na redovnim kontrolama u 6. ili 8. mjesecu trudnoće, a protutijela su im otkrivena na porodu.



Slika 2. RhD imunizacije otkrivene na 1. ili 2. kontrolnom pretraživanju ili na porodu, u kojih je na prethodnom testiranju test pretraživanja bio negativan

Od 72 RhD imunizacije nastale tijekom trudnoće čak su 23 (32%) nastale u prvoj trudnoći (slika 3). Imunizacije nastale u prvoj trudnoći posljedica su isključivo primarne imunizacije. RhD imunizacija u trudnica s dvije i više trudnoća mogu biti posljedica primarne, ali i sekundarne imunizacije. Tijekom druge trudnoće na kontrolnim testiranjima je otkriveno 19 (26%) RhD imunizacija, tijekom treće 18 (24%), dok ih je 12 (18%) nastalo u trudnica s tri i više trudnoća (slika 3).

Iz prikaza je vidljivo da su se RhD imunizacije nastale tijekom trudnoće najčešće dogodile u prvoj trudnoći (slika 3).

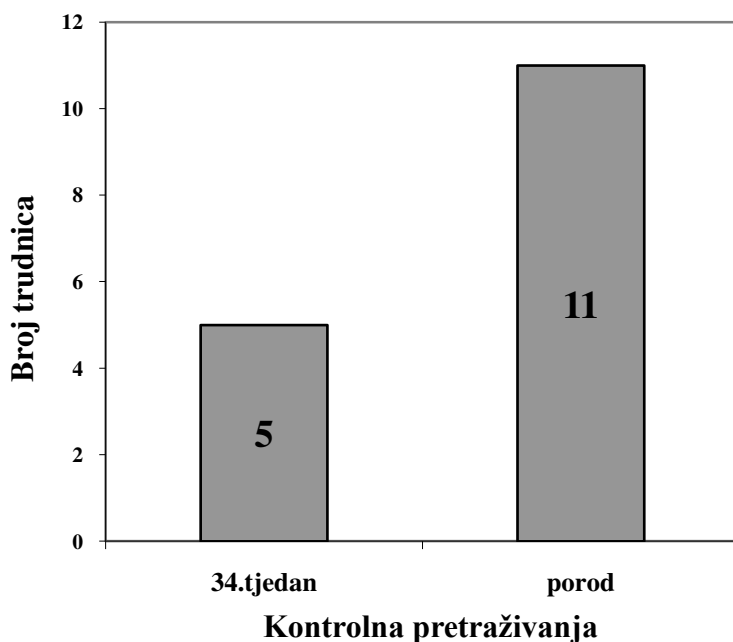


Slika 3. RhD imunizacije otkrivene na kontrolnim pretraživanjima u prvoj, drugoj te kod trudnica s tri i više trudnoća

4.2.2. NE-RHD PROTUTIJELA OTKRIVENA NA KONTROLNOM TESTIRANJU

Prema standardima RhD pozitivne trudnice u kojih je test pretraživanja antieritrocitnih protutijela negativan na prvom testiranju, naručene su na kontrolno pretraživanje u osmom mjesecu trudnoće (kontrola) (52). Ukoliko je kontrolni test bio negativan, trudnice više nisu naručivane. Antieritrocitna protutijela otkrivena na porodu nisu bila dio rutinskog testiranja RhD pozitivnih trudnica, otkrivena su isključivo zbog sumnje na HBFN ili tijekom prijetransfuzijskog testiranja majke.

U 16 trudnica u kojih je test pretraživanja na prvom testiranju bio negativan, ne-RhD protutijela su otkrivena na kontroli u 8. mjesecu trudnoće ili porodu; u 5 (31%) trudnica na kontroli u 8. mjesecu; u 11 (69%) trudnica otkrivena su na porodu. U osmom mjesecu trudnoće otkrivena su sljedeća protutijela: anti-c (3), anti-C (1), anti-S (1), a na porodu su otkrivena: anti-c (7), anti-E (2), anti-C (1), anti-Rh 17 (1) (slika 4).



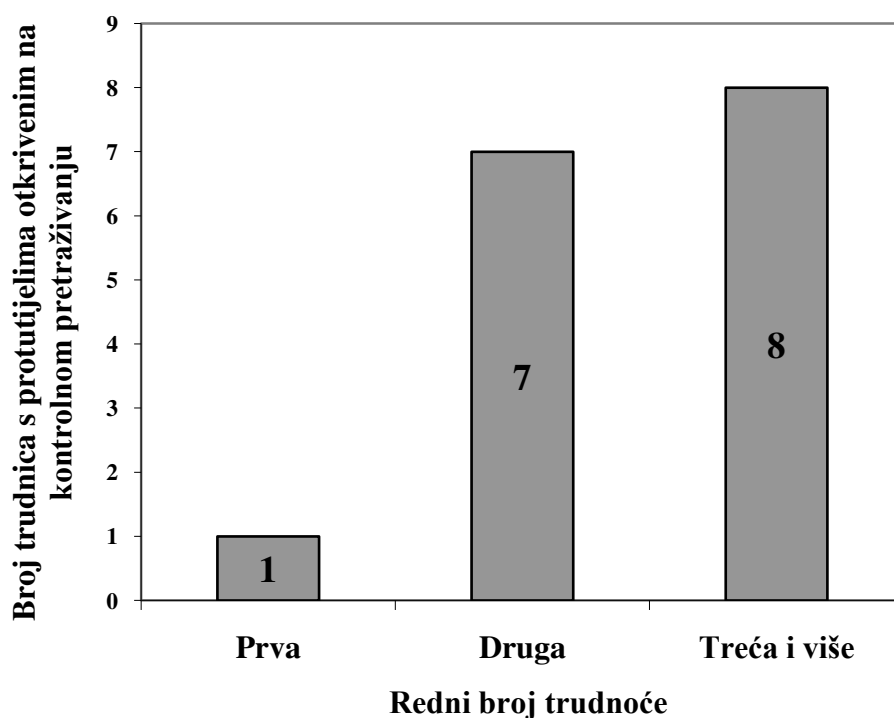
Slika 4. Broj trudnica s ne-RhD imunizacijom otrivenom na kontrolnom pretraživanju u 34. tjednu ili na porodu, kojima je test pretraživanja na prvom testiranju bio negativan

Od navedenih 16 trudnica u kojih su ne-RhD protutijela otkrivena na kontrolnom testiranju, samo je jedne trudnica bila u prvoj trudnoći. Navedena trudnica je primila transfuziju Rh17 pozitivne krvi, a tri mjeseca nakon transfuzije u nje je otkriveno anti-Rh17 protutijelo (slika 5).

U drugoj trudnoći ne-RhD protutijela su otkrivena u 7 (44 %) trudnica. To su sljedeća protutijela: anti-c (5), anti-C (1), anti-E (1). Jedna od navedenih trudnica je primila transfuziju krvi, a anti-c+E protutijela su u nje otkrivena 3,5 mjeseca nakon primljene transfuzije.

Tri ili više trudnoća je imalo 8 (50%) trudnica u kojih su na kontrolnom testiranju otkrivena protutijela: anti-c (5), anti-C (1), anti-E (1), anti-S (1) (slika 5).

U trudnica s više trudnoća veća je mogućnost otkrivanja protutijela na kontrolnom pretraživanju, što je vidljivo iz prikaza na slici 5.



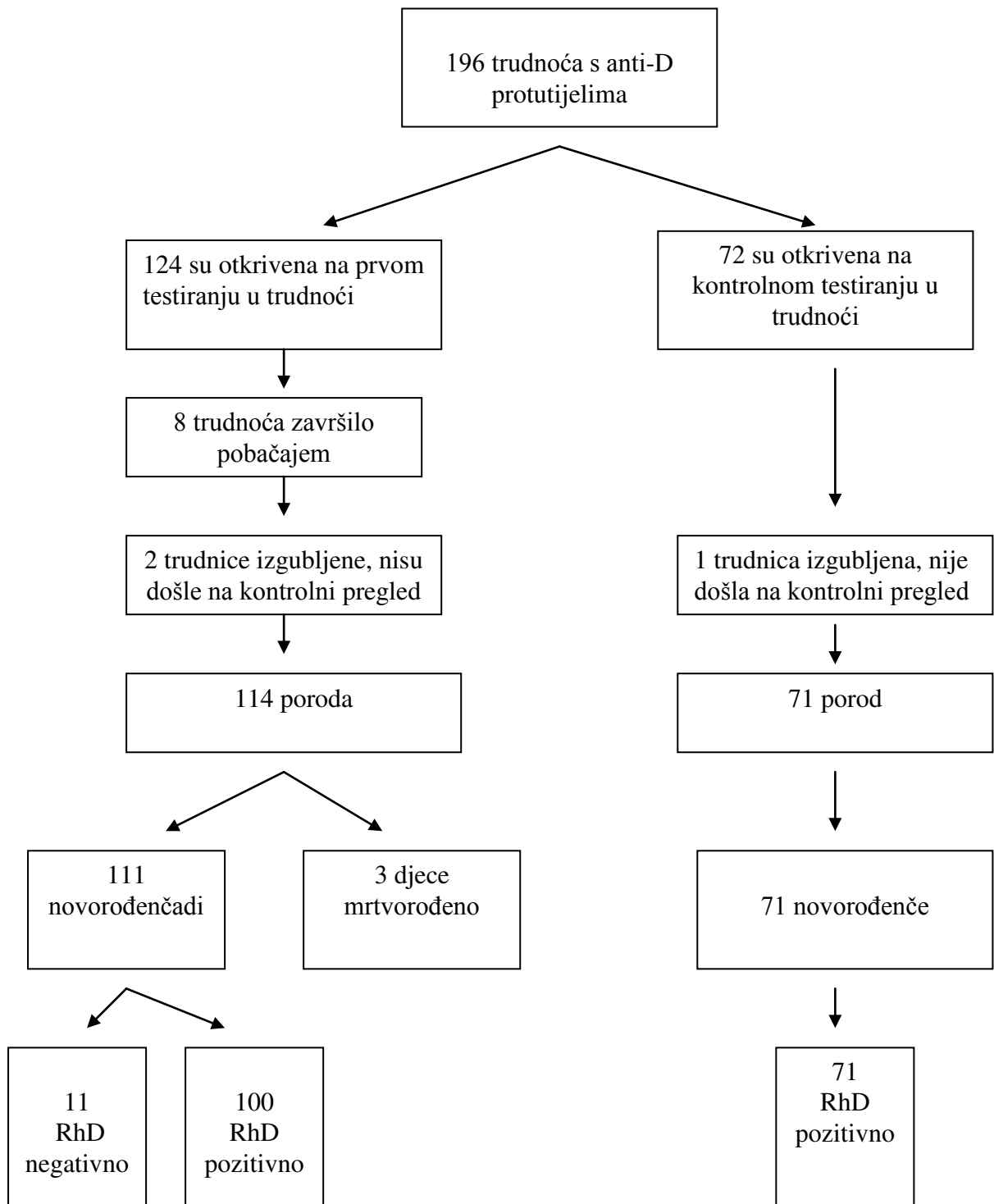
Slika 5. Broj trudnica s ne-RhD imunizacijom otkrivenom na kontrolnim pretraživanjima, u prvoj trudnoći, drugoj, te trećoj i više trudnoće

4.3. ISHOD TRUDNOĆA S ANTI-D PROTUTIJELIMA

Od 124 trudnoće u kojih su protutijela otkrivena na prvom testiranju, 2 trudnice nisu došle na daljnje kontrole te nam je poznat ishod o 122 trudnoće. Od daljnje 122 trudnoće, 8 je završilo pobačajem, a 114 trudnoća porodom. Troje djece je mrtvorodeno, a novorođenčadi je bilo 111, od kojih je 100 novorođenčadi bilo RhD pozitivno, odnosno rizično za razvoj HBFN, a 11 RhD negativno (slika 6). U skupini anti-D protutijela otkrivenih na prvom testiranju bile su tri trudnice s parcijalnim D antigenom. Navedene trudnice su imale 6 trudnoća, 3 novorođenčeta su bila RhD pozitivna, 2 novorođenčeta su naslijedila "parcijalni D" antigen, a jedno novorođenče je bilo RhD negativno (slika 6).

Od 72 trudnoće u kojih su protutijela otkrivena na kontrolnom testiranju 1 trudnica nije došla na daljnje kontrole te nam je poznat ishod 71 trudnoće. Sve trudnoće (N=71) su završile porodom i 71 novorođenče bilo je RhD pozitivno (slika 6).

Od 196 trudnoća s anti-D protutijelima 6 je završilo perinatalnom smrću djeteta (troje djece je mrtvorodeno i tri novorođenčeta su umrla). Mrtvorodena djeca i smrt novorođenčeta bili su samo u trudnica u kojih su anti-D protutijela otkrivena na prvom testiranju u trudnoći. HBFN kao uzrok smrti je potvrđena u 4 djeteta, dvoje mrtvorodene djece i dvoje novorođenčadi (umrli 2. dan života), što je pribrojeno teškoj HBFN. Ostali obdukcijски potvrđeni uzroci smrti su bili teška nezrelost ploda (N=1) i problemi s posteljicom (velamentozna insercija pupkotine i akutni korioamnionitis) (N=1).



Slika 6. Dijagram praćenih trudnoća s anti-D protutijelima

Tešku HBFN je imalo 70 novorođenčadi od 174 RhD pozitivna novorođenčeta, a od 70 teških HBFN četiri su rezultirale perinatalnom smrću, a transfuzijski je liječeno 66 djece.

Transfuzijsko liječenje teške HBFN povezano s vremenom otkrivanja anti-D protutijela prikazano je u tablici 6. Intrauterinim transfuzijama liječeno je dvoje djece s teškom HBFN (3%), a anti-D protutijela su otkrivena na prvom testiranju. Izmjenom krvi (jedna ili više izmjena krvi) i običnim transfuzijama (jedna ili više) je liječeno 26 (15%) novorođenčadi. Protutijela majke su otkrivena na prvom testiranju u njih 24, a u dvoje su otkrivena na kontrolnom testiranju. Samo izmjenama krvi je liječeno 20 (12%) novorođenčadi. Protutijela majke su otkrivena na prvom testiranju u njih 17, a u 3 na kontrolnom testiranju. Samo transfuzijama krvi liječeno je 18 (11%) novorođenčadi. Anti-D protutijela majke otkrivena su na prvom u njih 15, a u tri na kontrolnom testiranju (tablica 6).

Tablica 6. Transfuzijsko liječenje teške HBFN uzrokovane anti-D protutijelima otkrivenim na prvom i kontrolnom testiranju

Vrijeme otkrivanja anti-D	Transfuzijsko liječenje teške HBFN uzrokovane anti-D protutijelima (N=66)			
	IUT	IK i TK	IK	TK
Prvo testiranje	2	24	17	15
Kontrolno testiranje		2	3	3
Ukupno	2 (3%)	26 (37%)	20 (29%)	18 (26%)

Ukupno anti-D protutijela otkrivena na prvom testiranju su uzrokovala 62 (89%) teške RhD HBFN, dok su anti-D protutijela otkrivena na kontrolnim testiranjima majke uzrokovala 8 (11%) teških RhD HBFN (tablica 7).

Od RhD pozitivne novorođenčadi koja nije oboljela od teške HBFN, u njih 38 (38%) protutijela su otkrivena na prvom testiranju, a u 63 (62%) na kontrolnom testiranju (tablica 7).

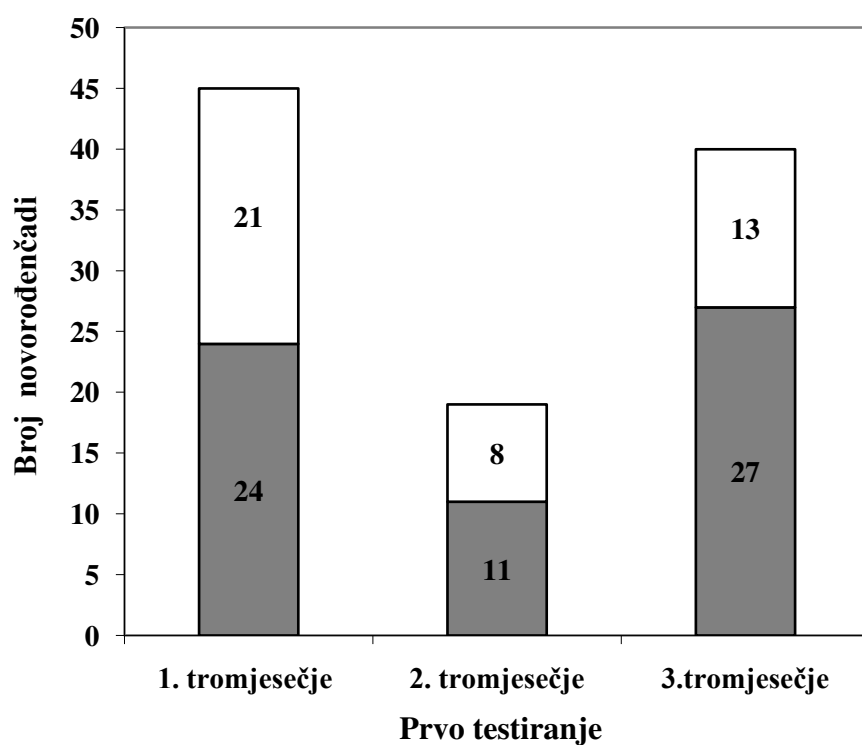
Tri RhD pozitivna novorođenčeta, majki s anti-D protutijelima i parcijalnim D antigenom, nisu oboljela od teške HBFN.

Tablica 7. Posljedice anti-D protutijela otkrivena na prvom i kontrolnom testiranju u RhD pozitivne novorođenčadi (N=171)

Vrijeme otkrivanja ant-D	Teška HBFN	Bez teže HBFN
Prvo testiranje	62 (89%)	38 (38%)
Kontrolna testiranja	8 (11%)	63 (62%)
Ukupno	70 (100%)	101 (100%)

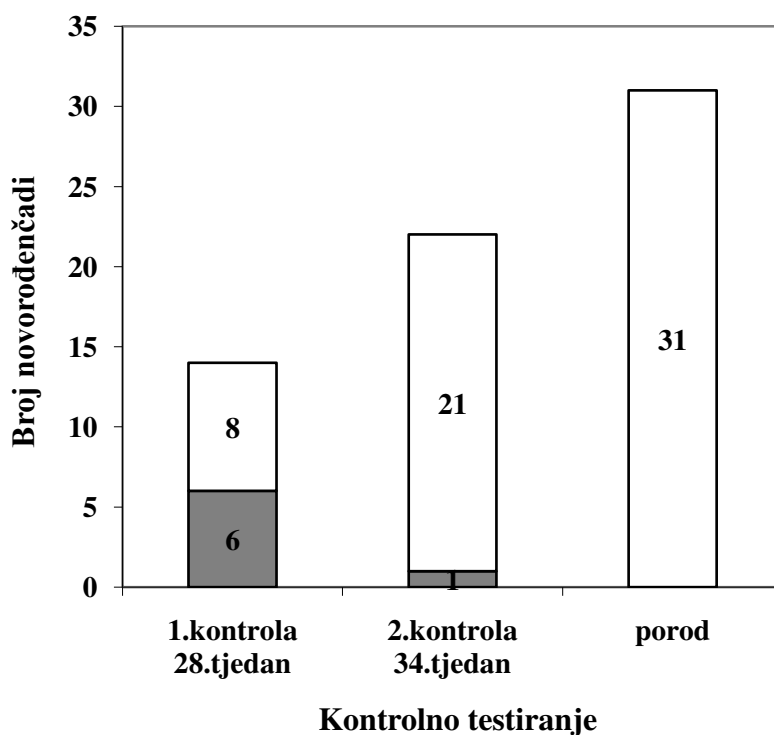
Analiza HBFN uzrokovane anti-D protutijelima otkrivenim na prvom testiranju u prvom, drugom i trećem tromjesečju trudnoće ukazuje da se teška HBFN pojavljuje češće ukoliko su trudnice na prvo testiranje došle tek u trećem tromjesečju (slika 7). To je istovremeno imalo negativan utjecaj i na ishod trudnoće. Od četiri perinatalne smrti zbog anti-D protutijela, tri su se desile upravo u ovih trudnica.

Od 45 novorođenčadi, gdje su protutijela majke otkrivena na prvom testiranju u prvom tromjesečju 24 (53%) je oboljelo od teške HBFN, a 21 (47%) nije oboljelo od teže HBFN. Od 19 novorođenčadi, gdje su protutijela majke otkrivena u drugom tromjesečju 11 (57%) je oboljelo od teške HBFN, a 7 (43%) nije oboljelo od teže HBFN. Od 40 novorođenčadi, gdje su protutijela majke otkrivena u trećem tromjesečju, 27 (64%) je oboljelo od teške HBFN, a 13 (36%) nije oboljelo od teže HBFN (slika 7).



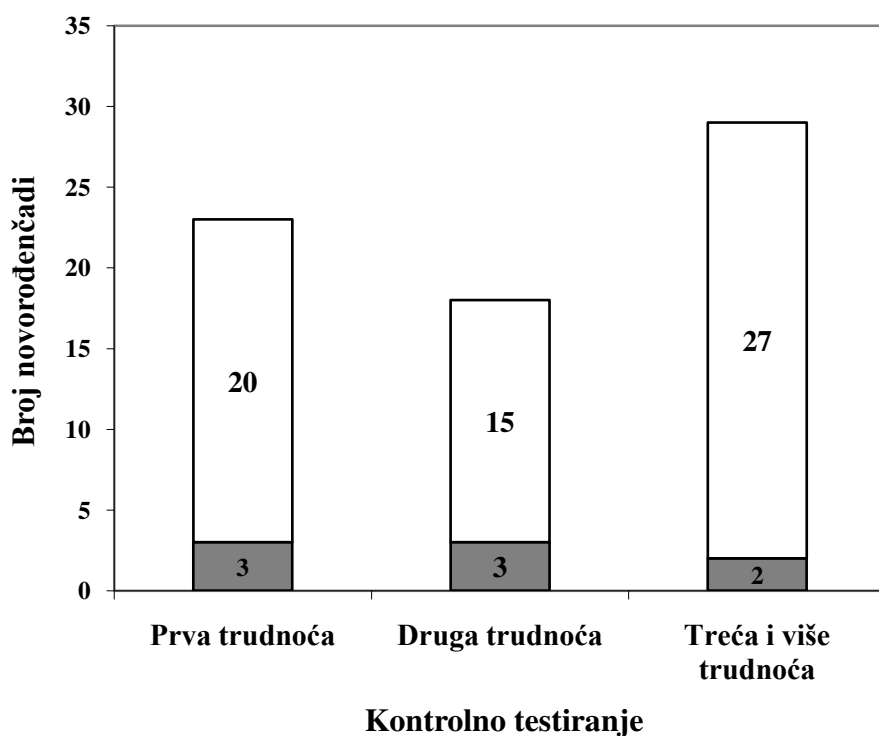
Slika 7. Broj teških HBFN uzrokovanih anti-D protutijelima (sivo) i RhD pozitivne novorođenčadi bez teže HBFN (bijelo) u trudnica koje su na prvo testiranje došle u prvom, drugom ili trećem tromjesečju trudnoće (N=104)

Analizom HBFN uzrokovane anti-D protutijelima otkrivenim na kontrolnim testiranjima u trudnoći, vidljivo je da je najznačajnije testiranje u 28. tjednu trudnoće (1. kontrola) (slika 8). Od 14 novorođenčadi gdje su anti-D protutijela otkrivena u 28. tjednu 6 (42%) ih je oboljelo od teške HBFN (slika 8). Od 22 novorođenčadi gdje su anti-D protutijela otkrivena su na drugoj kontroli, 1 (4 %) je oboljelo od teške HBFN. U skupini RhD pozitivne novorođenčadi (31 novorođenče), gdje su anti-D protutijela otkrivena na porodu nije bilo teških HBFN (slika 8). Od majki koje nisu redovito kontrolirane (n=5) (nakon negativnog testa u prvom tromjesečju nisu bile na prvom ili drugom kontrolnom pretraživanju) jedno je novorođenče oboljelo od teške HBFN.



Slika 8. Prikaz broja teške HBFN (sivo) i antigen pozitivne novorođečadi bez teže HBFN (bijelo) ako su RhD imunizacije otkrivene u 28. tjednu, 34. tjednu ili na porodu

Teške HBFN zbog anti-D protutijela otkrivenih na kontrolnim pretraživanjima su se dogodile u višerotki, ali i u prvoj trudnoći (slika 9). Od 8 teških HBFN tri su bile iz prve, tri iz druge, a dvije iz treće trudnoće (slika 9). Ovim podatkom je isključena sigurnost prve trudnoće glede razvoja HBFN. Osim toga, teška HBFN u prvoj trudnoći je bila vrlo nepovoljan prognostički čimbenik za sljedeće trudnoće. Od navedene tri nulipare dvije su, tijekom studije, imale još po jednu trudnoću. U jedne je druga trudnoća završila spontanom pobačajem u 11. tjednu trudnoće, a u druge su anti-D protutijela uzrokovala tešku HBFN u drugoj trudnoći te je fetus liječen intrauterinim transfuzijama od 23. gestacijskog tjedna. Navedeni podaci upućuju na izrazitu imunosnu reaktivnost ovih trudnica.



Slika 9. Prikaz broja teške HBFN (sivo) i antigen pozitivne novorođenčadi bez teže HBFN (bijelo) ako su RhD imunizacije otkrivene na kontrolnim testiranjima u prvoj trudnoći, drugoj te trećoj i sljedećim trudnoćama

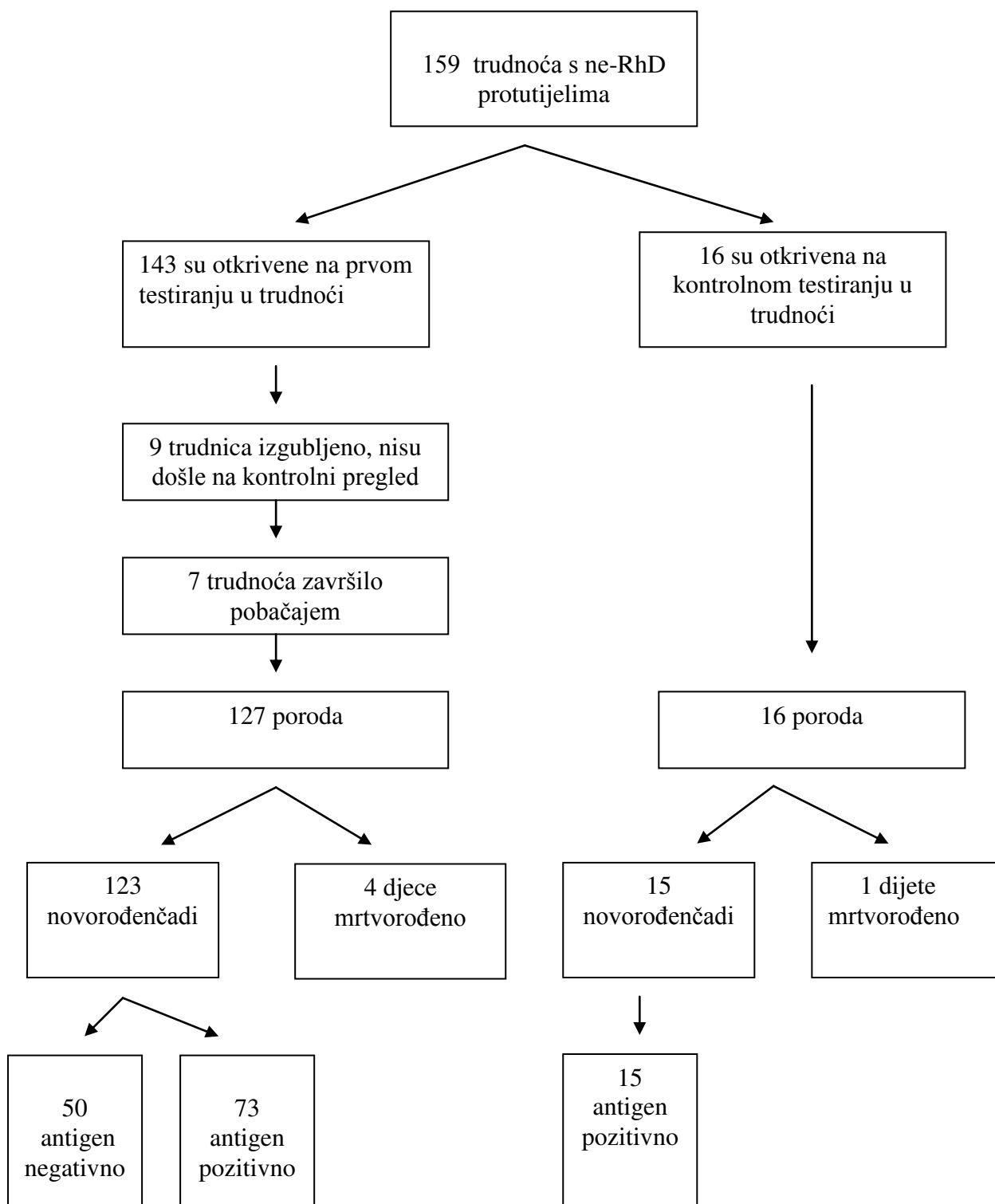
4.4. ISHOD TRUDNOĆA S NE-RHD PROTUTIJELIMA

Ukupno je praćeno 159 trudnoća s ne-RhD protutijelima, u 143 trudnoće protutijela su otkrivena na prvom testiranju, a u 16 na kontrolnom testiranju.

Od 143 trudnoće u kojih su protutijela otkrivena na prvom testiranju 9 trudnica nisu došle na daljnje kontrole te nam je poznat ishod 134 trudnoće. Od daljnje 134 trudnoće, 7 je završilo pobaćajem, a 127 porodom. Troje djece je mrtvorodeno, a novorođenćadi je bilo 124, od kojih je 72 novorođenćadi bilo antigen pozitivno, odnosno rizićno za razvoj HBFN, a 52 antigen negativno (slika 10).

Od 16 trudnoća u kojih su protutijela otkrivena na kontrolnom testiranju porodom ih je završilo 15 i sva su novorođenćad bila antigen pozitivna. Jedno je djete mrtvorodeno, a HBFN je potvrćena kao uzrok smrti (slika 10).

Od 159 trudnoća s ne-RhD protutijelima ukupno je bilo osam perinatalnih smrti, pet mrtvorodjenih i troje umrle novorođenćadi. HBFN kao uzrok smrti je potvrćena u 4 djece (mrtvorodena djeca) što je pribrojeno teškoj HBFN. Ostali obdukcijски potvrćeni uzroci smrti su bili: teške prirodene malformacije (N=2), prirodene malformacije srca (N=1), a u jednom slućaju uzrok smrti je bio nepoznat.



Slika 10. Dijagram praćenih trudnoća s ne-RhD imunizacijom

Od 93 antigen pozitivne novorođenčadi, majki s ne-RhD protutijelima, 41 je oboljelo od teške HBFN, a 47 nije oboljelo od teške HBFN (tablica 8). Pri tomu u 30 slučajeva teških HBFN ne-RhD protutijela majke su otkrivena na prvom testiranju (63% ne-RhD HBFN), a čak u 11 slučajeva protutijela su otkrivena na kontrolnom testiranju (27% RhD HBFN) (tablica 8).

Od antigen pozitivne novorođenčadi koja nije oboljela od teške HBFN, u 42 (89%) novorođenčeta ne-RhD protutijela majke su otkrivena na prvom testiranju, a u 5 (11%) na kontrolnom testiranju (tablica 8).

Tablica 8. Teške HBFN i antigen pozitivna novorođenčad bez teže HBFN i vrijeme otkrivanja ne-RhD imunizacije (N=93)

Vrijeme otkrivanja ne-RhD imunizacije	Teška HBFN	Bez teže HBFN
Prvo testiranje	30 (63%)	47 (89%)
Kontrolna testiranja	11 (27%)	5 (11%)
Ukupno	41 (100%)	52 (100%)

Tešku HBFN su uzrokovala ne-RhD protutijela sljedeće specifičnosti: anti-c, anti-E, anti-C, anti-Rh17, anti-Cw, anti-K, anti-Fya, anti-S antieritrocitna autoprotutijela (tablica 7).

Anti-c

U 37 trudnica s anti-c protutijelima, dvije trudnoće su završile pobačajem, a rođeno je 32 Rhc pozitivne novorođenčadi. Od teške HBFN nije oboljelo 12 Rhc pozitivne novorođenčadi, a 20 ih je imalo tešku HBFN (tablica 7).

Od 20 teških HBFN zbog anti-c protutijela, u 13 su protutijela majke otkrivena na prvom, a u 7 na kontrolnom testiranju (tablica 8). Izmjene krvi novorođenčeta uz transfuzije

krvi primijenjene su u liječenju 9 novorođenčadi, u 6 su protutijela majke otkrivena na prvom testiranju, a u 3 na kontrolnom testiranju. Samo izmjenama krvi je liječeno 6 novorođenčadi, u 3 su protutijela majke otkrivena na prvom testiranju, a u 3 na kontrolnom testiranju. Samo transfuzijama krvi je liječeno 5 novorođenčadi, u 4 su protutijela majke otkrivena na prvom testiranju, a u jednoga na kontrolnom testiranju (tablica 8).

Jedno liječeno novorođenče je umrlo (14. dan života), a prirodene malformacije su bile obdukcijски potvrđeni uzrok smrti.

Anti-E

Od 40 trudnica s anti-E protutijelima rođeno je 25 RhE pozitivne novorođenčadi. Od teške HBFN nije oboljelo 18 RhE pozitivne novorođenčadi, a sedam ih je imalo tešku HBFN (tablica 7).

Od sedam teških HBFN zbog anti-E protutijela, u šest su protutijela majke otkrivena na prvom, a u jedne teške HBFN anti-E su otkrivena na kontrolnom testiranju majke. Izmjene krvi novorođenčeta uz transfuzije krvi novorođenčetu su primijenjene u liječenju tri novorođenčeta, u dva su protutijela majke otkrivena na prvom testiranju, a u jednog na kontrolnom testiranju. Samo transfuzijama krvi su liječena četiri novorođenčeta, u tri su protutijela majke otkrivena na prvom testiranju, a u jednog na kontrolnom testiranju (tablica 8).

Anti-C

Od devet trudnica s anti-C protutijelima rođeno je osam RhC pozitivne novorođenčadi. Od teške HBFN nisu oboljela četiri RhC pozitivna novorođenčeta, a četiri su imala tešku HBFN (tablica 7).

Od četiri teške HBFN u dvije su protutijela majke otkrivena na prvom, a u dvije na kontrolnom testiranju. Izmjenama krvi liječeno je jedno novorođenče, u kojeg su protutijela majke otkrivena na prvom testiranju. Samo transfuzijama krvi je liječeno troje novorođenčadi, u jednog su protutijela majke otkrivena na prvom testiranju, a u dvoje na kontrolnom testiranju (tablica 8). Jedno liječeno novorođenče je umrlo (8. dan života), a teške prirodene malformacije su bile obdukcijски potvrđeni uzrok smrti.

Anti-Rh17

Antieritrocitno protutijelo na antigen vrlo visoke učestalosti, anti-Rh17 praćeno je u dvije trudnice tijekom četiri trudnoće. Jedna je trudnoća završila pobačajem, a troje djece je

mrtvorodeno (tablica 7). U sve troje mrtvorodene djece HBFN je obdukcijски potvrđeni uzrok smrti.

Od troje mrtvorodene djece u dvoje su anti-Rh17 protutijela majke otkrivena na prvom testiranju i primjenjeno je liječenje s IUT, prvi put u 19. i 22. gestacijskom tjednu. Treće mrtvorodeno dijete je umrlo u 36. gestacijskom tjednu, a anti-RH17 majke su otkrivena na kontrolnom testiranju na porodu nakon intrauterine smrti (tablica 8).

Anti-C^w

Od dvije trudnice s anti-C^w protutijelima jedno je novorođenče bilo RhC^w pozitivno i liječeno je izmjenom krvi, a protutijela majke su otkrivena na prvom testiranju.

Anti-K

Od 45 trudnica s anti-K protutijelima, četiri trudnoće su završile pobačajem, dvoje djece je mrtvorodeno, a jedno K pozitivno novorođenče je umrlo 6. dan života. HBFN je bila obdukcijски potvrđen uzrok smrti u jednog mrtvorodjenog djeteta. Rođeno je pet K pozitivne novorođenčadi, od kojih troje nije oboljelo od teške HBFN, a dvoje je oboljelo (tablica 7).

Jedno je novorođenče liječeno izmjenom krvi uz transfuzije krvi, a drugo novorođenče samo transfuzijama krvi. U svim slučajevima teške HBFN zbog anti-K protutijela, protutijela majke su bila otkrivena na prvom testiranju u trudnoći (tablica 8).

Druga protutijela

Tri teške HBFN liječene transfuzijama eritrocita uzrokovala su anti-Fy^a protutijela (N=1), anti-S (N=1) i u jednog novorođenčeta antieritrocitna autoprotutijela. Protutijela majke su u sve tri trudnice otkrivena na prvom testiranju (tablica 8).

Tablica 7. Posljedice ne-RhD imunizacije u antigen pozitivne novorođenčadi (N=93)

Antieritrocitno protutijelo	Bez teške HBFN N=52	Teška HBFN N=41
Anti-c	12	20
Anti-E	18	7
Anti-C	4	4
Anti-Rh 17		3
Anti-Cw		1
Anti-K	5	3
Duffy sustav*	5	1
Ss sustav [#]	4	1
Kidd sustav	4	
Druga protutijela		1

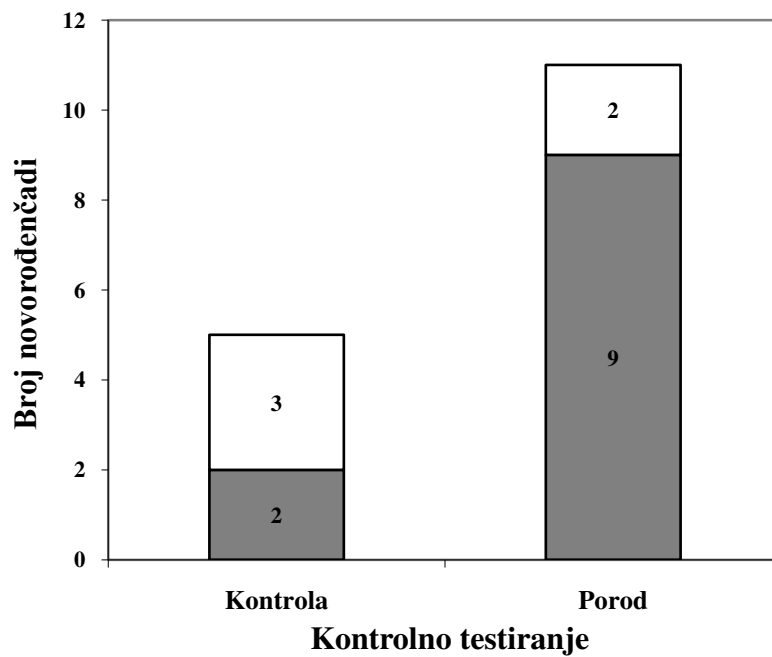
*Iz Duffy sustava, anti Fy^a su uzrokovala tešku HBFN

[#]Iz Ss sustava, anti-S protutijela su uzrokovala tešku HBFN

Tablica 8. Transfuzijsko liječenje teške HBFN uzrokovane specifičnim ne-RhD protutijelom otkrivenim na prvom i kontrolnom testiranju

		Transfuzijsko liječenje teške HBFN				
Ne-RhD protutijela	Vrijeme otkrivanja protutijela	IUT	IK i TK	IK	TK	Ukupno liječenih
	Anti-c					
N=20	Kontrola		3	3	1	7
Anti-E	Prvo testiranje		2		4	6
N=7	Kontrola		1			1
Anti-C	Prvo testiranje			1	1	2
N=4	Kontrola				2	2
Anti-Rh17	Prvo testiranje	2				2
N=2						
Anti-Cw	Prvo testiranje		1			1
N=1						
Anti-K	Prvo testiranje		1		1	2
N=2						
Druga protutijela	Prvo testiranje				3	3
Prvo i kontrolno testiranje		2	14	7	14	39

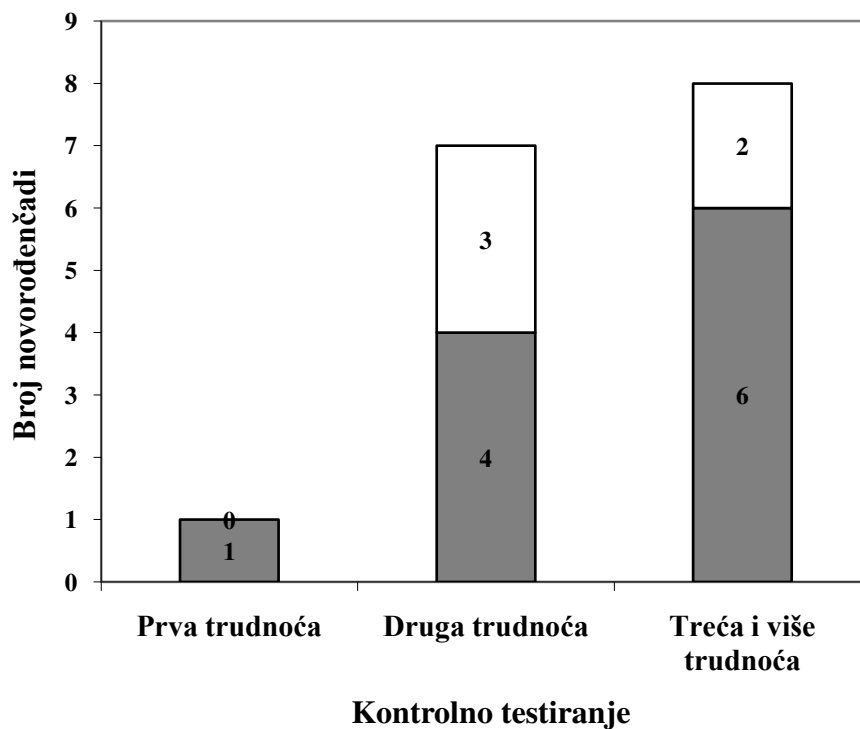
Ne-RhD imunizacije otkrivene na kontroli u 8. mjesecu trudnoće ili na porodu su uzrokovale 11 teških HBFN. U dvije teške HBFN protutijela majke su otkrivena u 8. mjesecu trudnoće, dok su u devet teških HBFN otkrivena na porodu. Time je vidljivo da su ne-RhD imunizacije nastale tijekom trudnoće većinom otkrivane na porodu zbog sumnje kliničara na HBFN (slika 11).



Slika 11. Broj teških HBFN (sivo) i bez teške HBFN (bijelo) ako su ne-RhD imunizacije otkrivene na kontrolnom testiranju i porodu (N=16)

Analizom HBFN uzrokovane ne-RhD imunizacijama nastalim tijekom prve trudnoće, druge, te u trudnica s tri i više trudnoća, razvidno je veći rizik od HBFN u trudnica većim brojem trudnoća (slika 12). Ova protutijela su uzrokovala jednu tešku HBFN u prvoj, četiri u drugoj, a šest u trudnica u trećoj i više trudnoća (slika 12).

Tešku HBFN u prvoj trudnoći su uzrokovala anti-RH17 protutijela s posljedičnom intrauterinom smrću. Smrt fetusa se desila u 36. gestacijskom tjednu, 108 dana nakon što je prvorotka primila Rh17 pozitivnu krv. Prilikom primanja krvi, u 21. tjednu trudnoće, test pretraživanja je bio negativan. Iako je, u ovom slučaju, do smrti fetusa došlo nakon transfuzije krvi, zabrinjavajuće je, ipak, što su od negativnog testa pretraživanja do intrauterine smrti prošla samo tri i pol mjeseca.



Slika 12. Broj teških HBFN (sivo) i bez teže HBFN (bijelo), ako su ne-RhD imunizacije otkrivene na kontrolnom testiranju u prvoj, drugoj i u trudnica s tri i više trudnoća (N=16)

4.5. UČESTALOST TEŠKE HBFN U SPLITSKO-DALMATINSKOJ ŽUPANIJI

U Splitsko-dalmatinskoj županiji u petnaestgodišnjem razdoblju od 1. siječnja 1992. godine do 31. prosinca 2007. godine rođeno je 85 600 novorođenčadi. Ukupna učestalost teške HBFN na 10 000 novorođenčadi bila je 13 (11 – 15; 95% C.I.) (tablica 8).

RhD protutijela su bila najčešći uzrok teških HBFN (63%), njihova učestalost je bila 8,2 na 10 000 novorođenčadi (8-10,5; 95% C.I.). Učestalost teških HBFN zbog ne-RhD protutijela je bila 4,8 na 10 000 novorođene djece (3 - 6,5; 95% C.I.), odnosno 37% teških HBFN. Od ne-RhD protutijela najčešći uzrok HBFN bila su anti-c protutijela, zatim slijedom anti-E, anti-C, anti-Rh17 i anti-K protutijela (tablica 9).

RhD i ne-RhD protutijela otkrivena na kontrolnim testiranjima su uzrokovale ukupno 19 teških HBFN. Učestalost teških RhD HBFN otkrivenih na kontrolnom testiranju određena je na broj testiranih RhD negativnih trudnica (N=15 200), dok je učestalost ne-RhD HBFN određena na broj testiranih RhD pozitivnih trudnica (N=69 800). U RhD negativnih trudnica učestalost je bila 5,3 na 10 000 trudnica (3 - 7,5 95% C.I.), što znači da je kontrolnim pretraživanjem 2 000 RhD negativnih trudnica otkriven jedan slučaj teške HBFN. U RhD pozitivnih trudnica učestalost je bila 1,6 na 10 000 trudnica (0,8-2,3; 95% C.I.), odnosno kontrolnim pretraživanjem 6 500 RhD pozitivnih trudnica otkriven je jedan slučaj teške HBFN (tablica 10).

Perinatalna smrt se dogodila u 14 od 355 trudnoća s antieritrocitnim protutijelima, u šest trudnoća s anti-D protutijelima i u osam s ne-RhD protutijelima (3 anti-K, 3 anti-Rh17, 1 anti-c, 1 anti-C). HBFN je bila direktan uzrok osam perinatalnih smrti, četiri s anti-D protutijelom i četiri ne-RhD protutijelima, te je ukupni perinatalni mortalitet uzrokovan HBFN bio 9 (2-16; 95% C.I.) na 100 000 novorođene djece.

Tablica 9. Broj i učestalost teške HBFN u razdoblju od 1. siječnja 1993. godine do 31. prosinca 2008. godine. Učestalost je određena na broj novorođenčadi u Splitsko dalmatinskoj županji (N=85 600)

Antieritrocitna protutijela	Teške HBFN		
	Broj	Udio (%)	Učestalost na 10 000 (95 % CI)
Anti-D	70	63	8,2 (6 - 10,5)
D	47		
D + C	18		
D + E	3		
D + K	1		
D i druga osim C ili E ili K	1		
Anti-K	3	2,7	0,4 (0 - 0,8)
K	2		
K i druga osim c ili D	1		
Anti-c	20	18	2,3 (1,1 – 3,6)
c	18		
c + E	2		
Anti-E	7	6	0,8 (0 – 1,5)
E	6		
E i druga osim D ili c ili K	1		
Anti- C	4	3,6	0,5 (0 – 1)
C	3		
C + e	1		
Druga protutijela iz RH sustava	4	3,6	0,5 (0 – 1)
Cw	1		
Rh 17	3		
Druga protutijela	3	2,7	0,4 (0 - 0,8)
Ukupno ne-RhD protutijela	41	37	4,8 (3 - 6,5)
Ukupno anti-D i ne-RhD protutijela	111	100	13 (11-15)

Tablica 10. Broj i učestalost teške HBFN uzrokovane anti-D i ne-RhD protutijelima otkrivenim na kontrolnom pretraživanju RhD negativnih i RhD pozitivnih trudnica, od 1. siječnja 1993. godine do 31. prosinca 2008. godine

Antieritrocitna protutijela	Teške HBFN	
	Broj	Učestalost na 10 000 (95 % CI)
Anti-D	8	5,3 (3- 7,5)
D	7	
D + C	1	
Ne-RhD protutijela	11	1,6 (0,8-2,3)
Anti-c	7	
c	6	
c + E	1	
Anti-E	1	
Anti- C	2	
C	1	
C + e	1	
Anti-Rh 17	1	

5. RASPRAVA

Preporučena testiranja u trudnoći trebaju otkriti sva antieritrocitna protutijela koja uzrokuju HBFN. U svjetskoj literaturi i prijenatalnim standardima, do sada je nedefiniran klinički značaj protutijela otkrivenih na kontrolnom testiranju. U ovom istraživanju je na 84000 trudnoća ispitan značaj anti-D i ne-RhD protutijela otkrivenih na kontrolnom testiranju glede razvoja teške hemolitičke bolesti. Prvi put ispitan je značaj kontrolnog testiranja za RhD negativne i RhD pozitivne prvoročke i višeročke.

Prema rezultatima istraživanja, anti-D protutijela su u 72 trudnice (37% RhD imunizacija) prvi puta otkrivena tek na kontrolnim pretraživanjima od kojih je u 8 slučajeva nastala teška HBFN. Tri teške HBFN uzrokovane anti-D protutijelima otkrivenim na kontrolnom pretraživanju dogodile su se u prvoj trudnoći. Ne-RhD protutijela su u 16 trudnica otkrivena na kontrolnim pretraživanjima (10 anti-c, 2 anti-E, 2 anti-C, 1 anti-S, i 1 anti-Rh17 protutijelo) i uzrokovala su 11 teških HBFN, od kojih su 10 trudnica bile višeročke. Prema tome, ovim istraživanjem je dokazano da su, anti-D i ne-RhD protutijela otkrivena prvi puta tek na kontrolnom testiranju, uzrokovala tešku HBFN u istoj trudnoći. Možemo, također, zaključiti da je kontrolno testiranje značajno za sve RhD negativne trudnice i za RhD pozitivne višeročke s naglaskom na RhD pozitivne Rhc negativne višeročke.

Učestalost RhD imunizacija u ukupnoj populaciji ispitanih RhD negativnih trudnica je 1,3%. Obzirom da učestalost RhD imunizacija ovisi o načinu primjene Rh-zaštite, rezultate učestalosti smo usporedili s istraživanjima u kojima je isto kao i kod nas provedena samo poslijenatalna Rh-zaštita. Prema rezultatima metanalize objavljenom u BJOG, koja je uključila prospektivna istraživanja učestalosti RhD imunizacija za određene oblike Rh-zaštite, učestalost RhD imunizacija u skupini trudnica s provedenom samo poslijenatalnom Rh-zaštitom iznosila je 1,6% (0,9-1,9%) (61). Rezultati ispitivanja drugih autora upućuju na znatno veću učestalost RhD imunizacija uz poslijenatalni oblik zaštite koja je veća od 3% (18,62). Pretpostavljamo da učestalost veća od 3% prikazana za jednu regiju je uzrokovana uključivanjem rizičnih slučajeva iz više regija, ali i posljedica nedosljedno provedene poslijenatalne Rh-zaštite. Usporedbom s navedenim istraživanjima možemo zaključiti da učestalost RhD imunizacija u Splitsko-dalmatinskoj županiji potvrđuje redovitu primjenu odobrenog poslijenatalnog oblika Rh-zaštite.

U populaciji naših RhD negativnih trudnica anti-D protutijela, otkrivena su u 72 (37%) trudnice na kontrolnim testiranjima od kojih je u 80% trudnica test pretraživanja u 28.

tjednu bio negativan da bi se protutijela otkrila u 34. tjednu trudnoće ili na porodu. Iz ovoga možemo zaključiti da su FMK iza 28. tjedna trudnoće uzrokovala RhD imunizaciju. Slični su rezultati i zaključci drugih autora. U istraživanju Bowman i suradnika od 62 RhD imunizacije otkrivene tijekom trudnoće 47 (76%) ih je otkriveno od 34. tjedna trudnoće do poroda (63). U istraživanju Eklund i suradnika 50% RhD imunizacija nastalih tijekom trudnoće otkriveno je od 36. tjedna do poroda (64). Temeljem dobivenih rezultata zaključujemo da je neophodno provođenje prijenatalne Rh-zaštite u 28. tjednu trudnoće.

Anti-D protutijela otkrivena prvi puta na kontrolnom testiranju su u našoj populaciji trudnica najčešće otkrivena u prvoj trudnoći. Otkrivena su u 23 (32%) prvorotke, u kojih je isključivo FMK tijekom prve trudnoće uzrokovalo RhD imunizaciju. Naši rezultati potvrđuju rezultate istraživanja Eklund-a, Bowman-a i Tovey-a sa suradnicima koji ukazuju da do RhD imunizacija većinom dolazi u prvoj trudnoći (19,63,64). Stoga rezultati našeg istraživanja, kao i istraživanja drugih autora nameću zaključak da je prijenatalna Rh-zaštita najpotrebnija upravo u trećem tromjesječju prve trudnoće (16,17,63,64).

Od 72 trudnice s anti-D protutijelima otkrivenim na kontrolnom testiranju u njih 8 protutijela su uzrokovala tešku hemolitičku bolest. Iako su mnogi autori potvrdili indukciju imunog odgovora i nastanak anti-D protutijela u prvoj trudnoći, pretraživanjem literature nismo našli niti jedno istraživanje u kojem je ispitana povezanost anti-D protutijela otkrivenih prvi puta na kontrolnom testiranju s razvojem HBFN u istoj trudnoći. Kontrolno testiranje je opravdano ukoliko tada otkrivena protutijela uzrokuju HBFN. Opravdanost kontrolnih testiranja RhD negativnih trudnica u 28. i u 34. tjedanu trudnoće, u našem istraživanju je prvi put ispitana. U našoj populaciji trudnica u 28. tjednu otkriveno je 14 RhD imunizacija, od kojih je čak u 6 (43%) nastala teška HBFN. Zbog FMK iza 28. tjedna 21 RhD imunizacija otkrivena je u 34. tjednu, međutim ova protutijela nisu se pokazala rizičnima glede teške HBFN. Time je ponovo naglašena važnost testiranja u 28. tjednu trudnoće. Ujedno želimo naglasiti da je u zemljama koje provode prijenatalnu Rh-zaštitu, testiranje u 28. tjednu trudnoće posljednja provjera prije njene primjene.

U našoj populaciji trudnica anti-D protutijela otkrivena na kontrolnom testiranju prvorotki i višerotki uzrokovala su HBFN. Još uvijek je prihvaćeno stručno mišljenje da novorođenčad prvorotki, u kojih je došlo do primarne imunizacije tijekom trudnoće, neće oboljeti od HBFN (1,2,3). U eminentnijoj knjizi transfuzijske medicine Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine još uvijek stoji tvrdnja, citiram: „RhD imunizacije nastale u prvoj trudnoći mogu uzrokovati pozitivan DAT novorođenčeta, ali bez klinički znakova teške hemolitičke bolesti. Ukoliko se razvije teška klinička slika HBFN treba uvijek sumnjati da je

primarna imunizacija nastala u prethodnim nepriznatim trudnoćama i/ili transfuzijama krvi. (1). U našem istraživanju troje novorođenčadi prvorotki, koje nisu imale prethodnih pobačaja niti su primale krv, oboljelo je od teške hemolitičke bolesti. Obzirom da su sljedeće trudnoće ovih trudnica bile s izrazito teškom HBFN, razlog je očito jaka imunosna reaktivnost ovih trudnica zbog čega se bolest ispoljila već u prvoj trudnoći. Obzirom na potpuno nove spoznaje do kojih smo došli našim istraživanjem namjera nam je da razloge ovako jake imunosne reaktivnosti, pojedinih prvorotki ispitatamo u sljedećim istraživanjima. Jedna od smjernica će biti povezivanje teških HBFN u prvoj trudnoći s HLA protutijelima i HLA antigenima majke.

Prema svjetskim standardima i standardima u RH potrebno je prvo prijenatalno imunohematološko testiranje provesti u prvom tromjesečju trudnoće (20,52). U našoj populaciji trudnica anti-D protutijela otkrivena na prvom testiranju uzrokovala su 89% RHD HBFN čime je potvrđena važnost prvog testiranja. Želimo naglasiti da su naše RhD negativne trudnice na prvo imunohematološko testiranje dolazile ne smo prema zadanom standardu u prvom već nažalost u drugom ili trećem tromjesečju što je znatno utjecalo na ishod HBFN. Najveći udio novorođenčadi s vrlo teškim kliničkim slikama HBFN bio je u majki koje su na prvo testiranje došle tek u trećem tromjesečju. Od četiri perinatalne smrti poradi anti-D protutijela, tri se dogodile upravo u ovih trudnica.

Učestalost ne-RhD protutijela koja uzrokuju HBFN, u ispitivanoj populaciji trudnica iznosi je bila 0,2%. Rezultati ovog istraživanja slažu se s rezultatima regionalne Švedske studije i Nizozemske studije na cijeloj populaciji. Učestalost ne-RhD protutijela u tim studijama je 0.24% i 0.3% (9,13). Istraživanja drugih autora upućuju na znatno veću učestalost ne-RhD protutijela (14,62). Razlozi različite učestalosti različitih studija mogu biti sljedeći: istraživanja su provedena na regionalnoj populaciji u koju su uključeni rizični slučajevi iz više regija bez uvida na cijelu populaciju; u studijama nije istovjetno definirana klinička značajnost pojedinih ne-Rh protutijela. Osim toga, želimo naglasiti da na različitu učestalost određenih protutijela utječe i nejednaka učestalost odgovarajućih antigena u različitim populacijama (1,2,3). Ipak, u našem kao i u istraživanjima drugih autora najveća je učestalost sljedećih ne-RhD protutijela: anti-c, anti-E i anti-K. (8,9,12,13,14,62).

U ispitivanoj populaciji trudnica ne-RhD protutijela uzrokovala su 41 (37%) tešku HBFN. Sva ne-RhD protutijela koja su uzrokovala HBFN bila su iz skupine protutijela koja često uzrokuju HBFN, osim jedne teške HBFN koja je uzrokovana anteritocitnim autoantitijelima (rijetko uzrokuju HBFN). Najčešći uzrok HBFN poslije anti-D protutijela bilo je anti-c protutijelo, koje je uzrokovalo 20 od 41 ne-RhD HBFN. Slični su rezultati

istraživanja drugih autora. U istraživanju Koelewijn i suradnika anti-c protutijelo je uzrokovalo 12 o 21 teške ne-RhD HBFN, dok je u istraživanju Fylbey i suradnika od 6 izmjena krvi zbog ne-RhD protutijela u 3 razlog bilo anti-c protutijelo (9,13). Iako je anti-c protutijelo najčešći uzrok ne-RhD HBFN, anti-K protutijelo se, zbog poznatih malignih osobina i izrazito teških HBFN, smatra najdominantnijim ne-RhD protutijelom (9,14,28,29,30). U našem istraživanju su potvrđene samo tri teške HBFN uzrokovane anti-K protutijelima, od kojih je jedna završila perinatalnom smrću. Pored potvrđenih anti-K HBFN, pet trudnoća s anti-K protutijelima je imalo loš ishod (tri trudnoće završile pobačajem i dvije perinatalnom smrću), u kojih HBFN nije potvrđena kao direktni uzrok smrti.

Posebno želimo izdvojiti i anti-Rh17 protutijelo. Anti-Rh17 je izuzetno rijetko protutijelo jer se antigen RH17 nalazi na eritrocitima 99,99% populacije. U literaturi su opisani rijetki pojedinačni slučajevi trudnica s anti-Rh17 protutijelima, a uzrokovali su blage do teške HBFN (26, 27). U našem istraživanju anti-Rh17 protutijelo pokazalo je vrlo maligne osobine, do sada nepoznate. Otkriveno je u dvije trudnice i praćeno u četiri trudnoće. Od navedenog jedna je trudnoća završila pobačajem, a troje djece je mrtvorodeno.

Od ne-RhD protutijela, protutijela iz RH (Rhc, RhE, RhC) i Kell sustava su uzrokovala 95% teških HBFN, u ovom istraživanju. Navedeno opravdava preporuke istraživanja Van Aken i Christianes te istraživanja Howard i suradnika, da se poradi prevencije HBFN ženama prije i u generativnoj dobi daju eritrocitni pripravci podudarni s antigenima iz RH (Rhc, RhE, RhC) i KELL (K) sustava (11,12). U istraživanju rizičnih faktora za nastanak ne-RhD imunizacija Koelewijn i suradnici u BJOG također zaključuju da najveći rizik za ne-RhD imunizacije imaju prethodne transfuzije krvi i procjenjuju da bi liječenje žena do 45 godine života eritrocitnim pripravcima podudarnim s antigenima Rhc, RhE, RhC i K sustava smanjilo broj ne-RhD imunizacija u trudnica za više od 50% (65).

Ne-RhD protutijela, u ovom istraživanju, u 16 slučajeva (10%) nisu otkrivena na prvom testiranju, već su prvi put otkrivena ili na kontrolnom testiranju u 8. mjesecu trudnoće ili većinom na porodu. Razlog što su ne-RhD protutijela nastala tijekom trudnoće većinom otkrivena tek na porodu je vrlo slaba prihvaćenost slanja RhD pozitivnih trudnica na kontrolno pretraživanje u trećem tromjesečju. Naime, iako su RhD pozitivne trudnice od strane transfuzijske službe naručene na kontrolno testiranje u 8. mjesecu trudnoće, većina njih nije došla. Zbog toga su protutijela otkrivena tek nakon poroda temeljem kliničke slike HBFN.

Prema rezultatima ovog istraživanja jasno je uočena nedostatnost samo jednog testa pretraživanja, koje se provodi u prvom tromjesečju, u otkrivanju ne-RhD HBFN. Naime od

teških HBFN uzrokovanih ne-RhD protutijelima čak je 27% uzrokovano protutijelima otkrivenim tek na kontrolnom testiranju. Najčešće su ih uzrokovala anti-c protutijela. Do sličnih rezultata istraživanja dolaze Koelewijn i suradnici u dvogodišnjoj prospektivnoj studiji na 305 000 RhD pozitivnih trudnica (9). Oni su zaključili da je 25% teških HBFN uzrokovano ne-RhD protutijelima otkrivenim tek na kontrolnom pretraživanju, a najčešće propušteno protutijelo bilo je anti-c. Stoga autori preporučuju kontrolno testiranje u 30. tjednu, ali samo Rhc antigen negativnih trudnica. Isti autori zaključuju da je učestalost teške HBFN uzrokovane ne-RhD protutijelima otkrivenim na kontrolnom testiranju 1:12000, pa temeljem toga smatraju da je kontrolno pretraživanje RhD pozitivnih trudnica opravdano i usporedivo s korisnošću drugih testova pretraživanja u prije i poslijenatalnoj dijagnostici (9).

Za razliku od ovih rezultata u istraživanjima koja su proveli Andersen i suradnici na 3046 RhD pozitivnih trudnica, Lurie i suradnici na 1 265 RhD pozitivnih i RhD negativnih trudnica, Rothenberg i suradnici na 10 581 RhD pozitivnih trudnica, Adenij i suradnici na 13 143 trudnica te De Vrijar i suradnici na 2 392 trudnice ističu da test pretraživanja može postati pozitivan na kontrolnom testiranju, ali tada otkrivena protutijela neće uzrokovati HBFN. Zbog toga prema njihovom mišljenju, glede ranog otkrivanja HBFN, dovoljan je samo test pretraživanja u prvom tromjesečju (5,6,7,47,48). Zaključak nabrojanih autora da je kontrolno pretraživanje RhD pozitivnih trudnica neopravdano najvjerojatnije je posljedica odviše malog broja trudnica uključenih u ispitivanje.

Osim ispitanog značaja ne-RhD protutijela otkrivenih na kontrolnom testiranju, u ovom istraživanju prvi put je ispitana povezanost protutijela otkrivenih na kontrolnom testiranju glede razvoja HBFN s rednim brojem trudnoće. Prema našim rezultatima, ne-RhD protutijela otkrivena na kontrolnom testiranju uzrokovala su teške HBFN u višerotki. Jedini slučaj teške HBFN u prvorotki, koji je završio intrauterinom smrću, bio je uzrokovan anti-Rh 17 protutijelima. Razlog smrtnog ishoda bio je žestoki imunosni podražaj transfuzijom Rh17 pozitivne krvi u trudnoći.

Mogućnost razvoja teške HBFN, poradi ne-RhD protutijela otkrivenih na kontrolnom pretraživanju višerotki, može se objasniti sekundarnim imunosnim odgovorom. Poznato je da su FMK najčešća u trećem tromjesečju, a posebno za vrijeme poroda (1,11,16,17). Zbog toga i slabiji imunogeni od RhD antigena mogu u trećem tromjesječju i za vrijeme poroda potaknuti imunosni odgovor (1,2,3,4). Nakon poroda, prestaje antigeni poticaj eritrocitima djeteta te se količina protutijela postupno smanjuje (pada titar protutijela). Obzirom da se RhD pozitivnim trudnicama test pretraživanja ne radi do sljedeće trudnoće, a tada, zbog smanjenja količine protutijela ispod granice osjetljivosti, test pretraživanja na prvom

testiranju može biti negativan. Manja FMK u već imuniziranih trudnica su dovoljan poticaj za stvaranje protutijela mehanizmom sekundarnog imunskog odgovora, koji je jači i brži. (1,2,3,4).

6. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja 84 000 trudnoća i analizom 196 trudnoća s anti-D i 159 s ne-RhD protutijelima, za vremensko razdoblje od 1. siječnja 1993. godine do 31. prosinca 2008. godine, možemo zaključiti:

1. Učestalost anti-D protutijela kod RhD negativnih trudnica u ovom istraživanju je 1,3%, a za daljnje smanjenje učestalosti RhD imunizacija u trudnica potrebna je prijenatalna Rh-zaštita.
Učestalost klinički značajnih ne-RhD protutijela je 0,2%. Najčešća su protutijela iz Kell sustava (anti-K), zatim protutijela iz RH sustava anti-E i anti-c.
2. Anti-D protutijela su u 72 trudnice (37% RhD imunizacija) otkrivena na kontrolnim testiranjima u 28., 34. tjednu ili na porodu. Ova protutijela su u 80% trudnica otkrivena u 34. tjednu trudnoće ili na porodu, kao posljedica FMK iza 28. tjedna trudnoće. Time je neupitna važnost prijenatalne Rh-zaštite u 28. tjednu trudnoće.
Ne-RhD protutijela su u 16 trudnica (11% ne-RhD imunizacija) otkrivena na kontrolnim testiranjima (10 anti-c, 2 anti-C, 2 anti-E, 1 anti-Rh17, 1 anti-S).
3. Anti-D protutijela otkrivena na kontrolnim testiranjima su najčešće (23 prvoročke) nastala u prvoj trudnoći, isključivo kao posljedica primarne imunizacije. Ovaj rezultat upućuje da je prijenatalna Rh-zaštita najpotrebnija upravo u prvoj trudnoći.
Od 16 trudnica s ne-RhD protutijelima otkrivenim na kontrolnim pretraživanjima njih 15 su bile višerotke, u 7 su protutijela otkrivena u drugoj trudnoći, a u 8 u trećoj i više trudnoća. Samo jedna trudnica s anti-Rh17 protutijelima je bila prvoročka, s tim da je u trudnoći primila Rh17 pozitivne eritrocitne pripravke.
4. Anti-D protutijela otkrivena na prvom testiranju uzrokovala su 62 (89% RhD HBFN) teške HBFN. Ne-RhD protutijela otkrivena na prvom testiranju uzrokovala su 30 (73% ne-RhD) teških HBFN. Teške HBFN uzrokovane anti-D i ne-RhD protutijelima su bile u većem postotku, a uz to i najteži slučajevi, u trudnica koje su na prvo testiranje došle u drugom ili čak trećem tromjesečju. Ovim je potvrđen značaj prvog testiranja u prvom tromjesečju trudnoće, glede ranog otkrivanja HBFN.

5. Anti-D protutijela otkrivena na kontrolnom testiranju su uzrokovala 8 teških HBFN, odnosno 11% RHD HBFN. Glede ranog otkrivanja HBFN uzrokovanih ovim protutijelima, neupitnu važnost ima testiranje u 28. tjednu trudnoće, što je prvi put dokazano u ovom istraživanju.

Ne-RhD protutijela otkrivena na kontrolnim pretraživanjima uzrokovala su 11 teških HBFN (7 anti-c, 2 anti-C, 1 anti-Rh17 i 1 anti-E). Time, testom pretraživanja u prvom tromjesečju nije otkriveno 27% ne-RhD HBFN, a najčešće propušteno ne-RhD protutijelo je bilo anti-c.

6. U našem istraživanju je dokazano da anti-D protutijela otkrivena na kontrolnim testiranjima su uzrokovala tri teške HBFN već u prvoj trudnoći. Sljedeće trudnoće ovih trudnica su bile s izrazito teškom HBFN što ukazuje na jaku imunosnu reaktivnost nekih trudnica. Ovim je istraživanjem prvi puta isključena tvrdnja prisutna u recentnoj literaturi da primarna RhD imunizacija u prvoj trudnoći ne može uzrokovati HBFN.

U našem istraživanju također je prvi put dokazano da su teške HBFN, uzrokovane ne-RhD protutijelima otkrivenim na kontrolnim testiranjima višerotki, što se može objasniti sekundarnim imunosnim odgovorom.

7. Glede ranog otkrivanja HBFN pored testiranja u prvom tromjesečju potrebno je i kontrolno pretraživanje antieritrocitnih protutijela. Kontrolno pretraživanje je potrebno u svih RhD negativnih trudnica u 28. tjedanu trudnoće te u RhD pozitivnih višerotki, posebno Rhc negativnih višerotki, od 32. do 34. tjedana trudnoće.

Ovo istraživanje je potvrdilo postavljene hipoteze.

7. SAŽETAK

UVOD: Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta (HBFN) je teška bolest koju uzrokuju protutijela majke usmjerena na jedan ili više eritrocitnih antigena fetusa. Test pretraživanja antieritrocitnih protutijela je osnovni test u trudnoći za otkrivanje fetusa rizičnih za nastanak HBFN. Cilj ovog istraživanja je ispitati kliničke posljedice anti-D i ne-RhD protutijela, koja su otkrivena testom pretraživanja u trećem tromjesečju za fetus/novorođenče.

METODE: U ovo retrospektivno kohortno istraživanje uključene su sve trudnice s antieritrocitnim protutijelima, testirane od 1993. godine do 2008. godine u KBC Split. Podatci su dobiveni iz Kartona za praćenje imunizacija na Odjelu za transfuziju krvi. Iz svakoga Kartona analizirane su tri skupine podataka: redosljed testiranja (prvo ili kontrolna testiranja, 28. tjedan, 34. tjedan ili porod) na kojem su otkrivena protutijela, redosljed trudnoće (prva, druga ili treća i više trudnoća) u kojoj su otkrivena protutijela i jesu li otkrivena protutijela uzrokovala tešku HBFN. HBFN je smatrana teškom, ako je primjenjeno transfuzijsko liječenje (intrauterina transfuzija i/ili izmjena krvi i/ili transfuzija krvi) ili ako je HBFN bila uzrok perinatalne smrti.

REZULTATI: Tijekom istraživanja ukupno je testirano 84 000 trudnoća. Klinički značajna protutijela su otkrivena u 355 trudnoća, u 196 (55%) otkrivena su anti-D protutijela, a u 159 (45%) ne-RhD protutijela. Učestalost anti-D protutijela u RhD negativnih trudnica je bila 1,29%. Anti-D protutijela su u 72 (37%) trudnice otkrivena na kontrolnim testiranjima, a u njih 8 je nastala teška HBFN. Ova protutijela su uzrokovala tri teške HBFN u prvoj trudnoći, tri u drugoj i dvije u trećoj trudnoći.

Ukupna učestalost ne-RhD protutijela bila je 0.2%. Ne-RhD protutijela su u 16 (10%) trudnica otkrivena na kontrolnom testiranju (10 anti-c, 2 anti-C, 2 anti-E, 1 anti-Rh17, 1 anti-S). Ova protutijela su uzrokovala 11 teških HBFN (27% od ne-RhD HBFN) od kojih se 10 dogodilo u višerotki. Od 11 teških ne-RhD HBFN koje nisu otkrivene na prvom testiranju 7 su uzrokovala anti-c protutijela.

ZAKLJUČAK: Testom pretraživanja u trećem tromjesečju mogu se otkriti antieritrocitna protutijela koja nisu bila prisutna ili nisu bila detektibilna testom pretraživanja u prvom tromjesečju. Test pretraživanja u trećem tromjesečju se pokazao značajnim, glede ranog otkrivanja HBFN, za RhD pozitivne višerotke i za sve RhD negativne trudnice.

8. SUMMARY

SIGNIFICANCE OF RED BLOOD CELLS ANTIBODIES DETECTED AT THE THIRD TRIMESTER SCREENING FOR HAEMOLYTIC DISEASE OF THE FETUS AND NEWBORN

BACKGROUND: Antenatal screening for the presence of alloantibodies in pregnant women, which are directed to one or more red cell antigens present on the fetal cells is prerequisite for identifying which fetus are at risk of developing hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN). The objective was to determine clinical consequences of anti-D and non-RhD antibodies detected at third trimester screening for infant/ fetus.

STUDY DESIGN AND METHODS: This retrospective cohort study included all pregnancies with red blood cell (RBC) antibodies who were tested between 1993 and 2008. Data were obtained from the forms for tracking immunization at the Transfusion Department. Each form was analyzed for three data sets: the order of screening at which the antibodies were detected (initial or repeated screening), the order of pregnancy (first pregnancy or higher), and whether the antibodies caused severe HDFN. Severe HDFN was considered if transfusion therapy had been given (intrauterine transfusion and/or exchange transfusion and/or simple transfusion) or if HDFN caused perinatal death

RESULTS: In RhD negative women, anti-D antibody was detected in 1.3% of cases. The anti-D antibody was undetected in 72 (37%) cases on the first-trimester screening, of which eight cases were complicated by severe HDFN. In this group, three patients were primigravidae. An overall non-RhD antibody incidence of 0.2% was observed. In 16 cases, non-RhD antibodies were undetected on the first-trimester screening (10 anti-c, 2 anti-E, 2 anti-C, 1 anti-S, and 1 case of anti-Rh17). Non-RhD antibodies undetected on initial screening caused 11 cases of severe HDFN (27% of all severe non-RhD HDFN). Ten of them were in multiparous women. Seven of 11 cases with severe HDFN that were missed were caused by anti-c antibodies.

CONCLUSION: The third-trimester screening may detect RBC antibodies that were not present or detected on the first-trimester screening. Such screening may be especially relevant in RhD-positive multiparous women due to the risk of HDFN and all RhD negative pregnant women.

9. LITERATURA

1. Hemolytic disease of the fetus and newborn U: Klein H, Anstee D. Mollison, s Blood Transfusion in Clinical Medicine. 11. izd. London: Blackwell Science; 2005. str. 496-545.
2. Arthur W, Kenneth J, Moise J. Hemolytic Disease of the Fetus or Newborn: Treatment and Prevention. U: Simon L, Dzik H, Snyder, Strauss G. Rossi's principles of transfusion medicine. 3. izd. Philadelphia: Lippincot Williams-Wilkins; 2002. str. 428-48.
3. Hemolytic Disease of the Newborn. U: American Association of Blood Banks. Technical Manual. 14. izd. Bethesda: Maryland; 2003. str. 497-511.
4. Kennedy MS, Waheed A. Hemolytic disease of the newborn and fetus. U: Harmening MD, ur. Modern blood banking and transfusion practices. 4. izd. Philadelphia: F.A. Davis Company; 1999. str. 421-35.
5. Adenij AA, Fuller I, Dale T, Lindow SW. Should we continue screening rhesus D positive women for the development of atypical antibodies in late pregnancy? J Matern Fetal Neonatal Med 2007;20:59-61.
6. Rothenberg JM, Weirermiller B, Dirig K, Hurd WW, Schilder J, Golichowski A. Is a third-trimester antibody screen in Rh+ women necessary? Am J Manag Care 1999;5:1145-50.
7. Lurie S, Eliezer E, Piper I, Woliovitch I. Is antibody screening in Rh(D)-positive Women necessary? J Matern Fetal Neonatal Med 2003;14:404-6.
8. Chandrasekar A, Morris KG, Tubman TR, Tharma S, McClelland WM. The clinical outcome of non-RhD antibody affected pregnancies in Northern Ireland. Ulster Med J 2001;70:89-94.
9. Koelewijn JM, Vrijkotte TGM, van der Schoot CE, Bonsel GJ, de Haas M. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands. Transfusion 2008;48:941-52.
10. Marušić M. Fiziološki tijek imunološke reakcije. U: Andreis I, Čulo F, Marušić M, Taradi M. Imunologija. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 1995. str. 221-49.

11. Van Aken WG, Christianes GC. Prevention diagnosis and treatment of Blood group immunization during pregnancy. *Ned Tijdschr Geneesk* 1999;143:2507-10.
12. Howard H, Martlew V, McFadyen, i sur. Consequences for fetus and neonate of maternal red cell alloimmunisation. *Arch Dis Child Fetal Neonatol* Ed 1998;78:F62-6.
13. Filbey D, Hanson U, Wesstrom G. The prevalence of red cell antibodies correlated to the outcome of the newborn: a 12 year study in central Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995;74:687-92.
14. de Vrijer B, Harthoorn-Lasthuizen EJ, Oosterbaan HP. The incidence of irregular antibodies in pregnancy: a prospective study in the region of the s-Hertogenbosch. *Ned Tijdschr Geneesk* 1999;143:2523-7.
15. Flegel WA. Molecular genetics of RH and its clinical application. *Transf Clin Biol* 2006;13:4-12.
16. Beaulieu M. Screening for D sensitization in pregnancy. U: Canadian Task Force on the Periodic Health Examination. *Canadian Guide to Clinical Preventive Health Care*. Ottawa: Health Canada; 1994. str. 116-24.
17. Parent O. Comparison of the efficacy of different methods for prevention of anti-D alloimmunization during pregnancy: targeted strategy limited to risk situations or associated with systematic preventive in 3rd trimester. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2006;35:1S93-1S103.
18. Hundrić Hašpl Ž, Juraković Lončar N, Grgičević D. Utjecaj provođenja RhD imunopofilakse hiperimunim anti-D imunoglobulinom na učestalost RhD imunizacija trudnica. *Liječ Vjesn* 1997;119:189-193.
19. Tovey LAD, Townely A, Stevenson BJ, i sur. The Yorkshire antenatal anti-D immunoglobulin trial in primigravide. *Lancet* 1983;2:244-6.
20. Narodne Novine: Program mjera zdravstvene zaštite žena, NN 2002, br 30, 26. ožujka. 2002.
21. Clarke CA, Mollison PL. Deaths from Rh haemolytic disease fetus and newborn, 1977-1987. *J R Coll Phys* 1989;23:181-4.
22. Bowell PJ, Brown SE, Dike AE, i sur. The significance of anti-c alloimmunization in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93:144-8.

23. Joy SD, Rossi KQ, Krieh D, i sur. Management of pregnancies complicated by anti-E alloimmunization. *Obstet Gynecol* 2005;105:24-8.
24. Howell PJ, Inskip MJ, Jones MN. The significance of anti-C sensitization in pregnancy. *Clin Lab Hematol* 1988;10:251-55.
25. Lawler SD, Vanloghem JJ. The rhesus antigen Cw causing haemolytic disease of the newborn. *Lancet* 1947;ii:545.
26. Masaya H, Keiko N, Shouji K, i sur. Fetal Hemolytic disease due to Anti-Rh17 alloimmunization. *Fetal Diagn Ther* 2004;19:182-6.
27. Li BJ, Jiang YJ, Yuan F, Ye HX. Exchange transfusion of least incompatible blood for severe hemolytic disease of the newborn due to anti-Rh17. *Transfus Med* 2010;20:66-9.
28. Mayne KM, Howell PJ, Pratt GA. The significance of anti-Kell sensitization in pregnancy. *Clin Lab Hematol* 1990;12:379-85.
29. Fleetwood P, De Silva PM, Knight RC. Clinical significance of red cell antibody concentration in pregnancy. *Br J Hematol* 1996;93:13.
30. Vaughan JI, Manning M, Warwick RM, Letsky EA, Murray NA. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. *N Engl J Med* 1998;338:830-1.
31. Daniels G, Hadley A, Green CA. Causes of fetal anemia in hemolytic disease to anti-Kell. *Transfusion* 2003;43:115-6.
32. Kell and Kx blood group systems U: Daniels GL. *Human Blood Groups*. 2. izd. London: Blackwell Science; 2002. str. 295-322.
33. Duffy blood group systems U: Daniels GL. *Human Blood Groups*. 2. izd. London: Blackwell Science; 2002. str. 454-70.
34. Matson GA, Swanson J, Tobin JD. Severe haemolytic disease of the newborn due to anti-Jka. *Vox Sang* 1959;4:144.
35. Kohler PF, Farr RS. Elevation of cord over maternal IgG immunoglobulin: evidence for an active placental IgG transport. *Nature (Lond)* 1966;210:1070.
36. Garner SF, Gorick BD, Lai WYY, i sur. Prediction of the severity of haemolytic disease of the newborn. *Vox sang* 1995;68:169-76.

37. Lambin P, Debbia Puillandre P, i sur. IgG1 and IgG3 anti-D in maternal serum and on the RBCs of infants suffering from HDN: relationship with severity of the disease. *Transfusion* 2002;42:1537-46.
38. Hemolytic disease of the newborn. U: Nelson textbook of Pediatrics. 17th ed. W.B. Saunders company; 2003. str. 601- 6.
39. Nicolaides KH, Warenski JC, Rodeck CH. The relationship of fetal plazma protein concentration and hemoglobin level to the development hydrops in rhesus isoimmunization. *Am J Obstet Gynaecol* 1985;152:431-4.
40. Nance SJ, Nelson JM, Horenstein J. Monocyte monolayer assey: an efficient noninvasive technique for predicting the severity of haemolytic disease of the newborn. *AM J Clin Pathol* 1989;91:288-92.
41. Daffos F, Capella-Pavlovsky M, Forrestier F. Fetal blood sampling during pregnancy with use of a needle guided by ultrasound: a study of 606 consecutive cases. *Am J Obstet Gynecol* 1985;153:655-60.
42. Denner PA, Rhine WD, Stevenson DO. Neonatal jaundice-what now? *Clin Pediar* 1995;34:103-7.
43. Hundrić-Hašpl Ž, Grgičević D. Transfuzijsko liječenje u opstetriciji i ginekologiji. U: Grgičević D i sur. *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi*. Zagreb: Medicinska naklada; 2006. str. 421-23.
44. Van Kamp ILL, Klumper FJ, Meerman RH, Oepkes D, Scherjon SA, Kanhai HH. Treatment of fetal anemia due to red cell alloimmunization with intrauterine transfusions in the Netherlands, 1988-1999. *Acta Obstet Gynecol* 2004;83;(8):731-7.
45. Jackson JC. Adverse events associated with exchange transfusion healthy and ill newborns. *Pediatrics* 1997;99:e7.
46. Gottstein R, Cook RW. Systematic review of intravenous immunoglobulin in haemolytic disease of the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F6-10.
47. Bowman JM. Treatment options for the fetus with alloimune hemolytic disease. *Transfus Med Rev* 1990;4:191-207.

48. Bernioehr A, Smith P, Vydelingum V. Antenatal care in the European Union: A survey on guidelines in all 25 member states of the Community. *Eu J Obst Gyn* 2005;122:22-32.
49. National Institute for Clinical Excellence. Routine antenatal care for healthy pregnant women. London: Abba Litho Sales Limited; 2003 Oct.
50. Villar J, Ba'ageel H, Piagio G, i sur. WHO antenatal care randomised trial for the evaluation of a new model of routine antenatal care. *Lancet* 2001;357:1551-64.
51. Bowman JM, Chown B, Lewis M, i sur. Rh imunization during pregnancy, antenatal prophylaksis. *Can Med Assoc J* 1978;118:623-4.
52. Standardi i upute za rad u transfuzijskoj medicini. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu i Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje. 1995.
53. Andersen AS, Praetorius L, Jorgensen HL, Lylloff K, Larsen KT. Prognostic value of screening for irregular antibodies late in pregnancy in rhesus positive women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81:407-11.
54. Initial Detection and identification of Alloantibodies to Red Cell antigens. U: American Association of Blood Banks. Technical Manual. 14. izd. Bethesda: Maryland; 2003. str. 393-419.
55. Lingenfelter B, Gillen Gibbs F, Steven D. Detection and identification of antibodies. U: Harmening MD, ur. Modern blood banking and transfusion practices. 4. izd. Philidelphia: F.A. Davis Company; 1999. str. 253-76.
56. Weisbach V, Kohnhauser R, Zimmermann R, i sur. Comparasion of the performance of microtube column systems and solid-phase systems and the tube low-ionic-strenght solution additive indirect antiglobulin test in the detection of red cell alloantibodies. *Transfus Med* 2006;16:276-84.
57. Antibody detection and compatibility testing. U: American Association of Blood Banks. Technical Manual. 11. izd. Bethesda: Maryland; 1993. str. 639-47.
58. Hemolytic disease of the newborn. U: Nelson textbook of Pediatrics. 14th ed. W.B. Saunders company; 1992. str. 482-7.

59. Hemolytic disease of the newborn. U: Nelson textbook of Pediatrics. 15th ed. W.B. Saunders company; 1992. str. 500-5.
60. Hemolytic disease of the newborn. U: Nelson textbook of Pediatrics. 16th ed. W.B. Saunders company; 2000. str. 521-5.
61. Jones ML, Wray J, Wight J, i sur. A review of the clinical effectiveness of routine antenatal anti-D prophylaxis for rhesus-negative women who are pregnant. BJOG 2004;111:892-902.
62. Jovanovic-Srzentic S, Djokic M, Tijanic N, i sur. Antibodies detected in samples from 21,730 pregnant women. Immunohematol 2003;19:89-92.
63. Bowman JM, Chown B, Lewis M, i sur. Rh-immunization during pregnancy, antenatal prophylaxis. Can Med Assoc 1978;118:623-7.
64. Eklund J. Prevention of Rh immunization in Finland. A national study, 1969-1977. Acta Paediatr Scand 1987;274:51-7.
65. Koelewijn JM, Vrijkotte TGM, Bonsel GJ, de Haas M, van der Schoot CE. Risk factors for the presence of non-rhesus D red blood cell antibodies in pregnancy. BJOG 2009;116:655-64.

10. ŽIVOTOPIS

Slavica Dajak

Osnovnu školu završila sam u Vrlici. Maturirala sam 1986. godine u Zdravstvenom školskom centru u Splitu. Na Medicinskom fakultetu u Zagrebu – Studij u Splitu diplomirala sam 1992. godine. Pripravnički staž odradila sam u DZ "Dr.Petar Vitezica" u Splitu. Državni ispit položila sam 1993. godina i od tada sam član HLZ i HLK. Od prosinca 1993. do ožujka 2002. godine bila sam zaposlena kao liječnik Hitne medicinske pomoći u Trogiru. Od ožujka 2002. zaposlena sam na Odjelu za transfuziju krvi KB Split.

Specijalistički ispit iz transfuzijske medicine položila sam 2005. u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicine u Zagrebu. Nakon položenog specijalističkog ispita radim u Odsjeku za imunohematologiju, Odjela za transfuziju krvi KBC Split.

Završila sam znanstveni poslijediplomski doktorski studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, smjer „Klinička medicina utemeljena na dokazima”.

Aktivni sam sudionik nacionalnih kongresa iz transfuziologije te kongresa ginekologije porodiljstva. Bila sam predavač i glavni organizator tečaja: ”Novosti u prevenciji, dijagnostici i liječenju hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta”, održanom u Splitu.

Znanstveni rad “Teške hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta uzrokovane antieritrocitnim protutijelima otkrivenim na kontrolnom testiranju”, čiji sam autor, objavljen je u časopisu “Transfusion” - AABB.