Analiza imunohematološkog testiranja trudnica u periodu 2012. do 2016. u Sisačko-moslavačkoj županiji

Dujić, Sanja

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:254360

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Sanja Dujić

ANALIZA IMUNOHEMATOLOŠKOG TESTIRANJA TRUDNICA U PERIODU 2012. DO 2016. U SISAČKO-MOSLAVAČKOJ ŽUPANIJI

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Sanja Dujić

ANALIZA IMUNOHEMATOLOŠKOG TESTIRANJA TRUDNICA U PERIODU 2012. DO 2016. U SISAČKO-MOSLAVAČKOJ ŽUPANIJI

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, diplomski studij Medicinsko – laboratorijske dijagnostike

Mentor rada: Doc.dr.sc.prim. Irena Jukić, dr.med.

Rad ima 32 stranice, 4 tablice i 2 slike.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA ..... **II**

1. UVOD **1**

1.1. ERITROCITNE KRVNE GRUPE I HBFN 3

1.1.1. Ugljikohidratni ertrocitni antigeni *3*

1.1.2. Proteinski eritrocitni antigeni *4*

1.2. HEMOLITIČKA BOLEST FETUSA I NOVOROĐENČETA (HBFN) 6

1.3. IMUNOHEMATOLOŠKA DIJAGNOSTIKA TIJEKOM TRUDNOĆE (ANTENATALNO ISPITIVANJE) 9

1.3.1. Početno ispitivanje *9*

1.3.2. Kontrolno ispitivanje trudnica *10*

1.3.3. Dodatna ispitivanja trudnica *10*

1.3.4. Određivanje očevog i fetalnog RhD statusa *10*

1.4. IMUNOHEMATOLOŠKA DIJAGNOSTIKA NAKON PORODA 11

1.5. ZAŠTITA (PROFILAKSA) 11

2. CILJEVI **13**

3. MATERIJAL I METODE **14**

3.1. USTROJ STUDIJE 14

3.2. MATERIJAL 14

3.3. METODE 15

3.4. STATISTIČKE METODE 18

4. REZULTATI **19**

5. RASPRAVA **24**

6. ZAKLJUČAK **27**

7. SAŽETAK **28**

8. SUMMARY **29**

9. LITERATURA **30**

10. ŽIVOTOPIS **32**

POPIS KRATICA

IAT	Indirektni antiglobulinski test
PTHR	Poslijetransfuzijska hemolitička reakcija
HTR	Hemolitička transfuzijska reakcija
BCS	Britanski komitet za standard u hematologiji
BSH	Britansko društvo hematologa
RCOG UK	Društvo porodničara i ginekologa UK
HBFN	Hemolitička bolest fetusa/novorođenčeta
cffDNA	Umnažanje i analiza fetalne izvanstanične DNA
DAT	Direktni antiglobulinski test
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina

1. UVOD

Imunohematologija je dio transfuzijske medicine koja se bavi ispitivanjem imunoloških reakcija između pojedinih sastojaka krvi. Razvila se radi sigurnijega transfuzijskog liječenja i sprječavanja imunoloških reakcija na transfundirane eritrocite (hemolitička transfuzijska reakcija – HTR) u tijeku ili nakon transfuzija ili tijekom trudnoće (1).

U čovjeka je razvijen sustav obrane organizma (imunološki sustav) čija je funkcija zaštita organizma od svih stranih čimbenika (virusi, bakterije i drugo) koji mogu uzrokovati bolest. Imunološki sustav prepoznaje strane čimbenike koji su ušli u organizam, aktivira nespecifičnu i specifičnu imunološku reakciju, koja ih uklanja iz organizma. Nespecifičnu imunost čine granulociti, monociti i makrofagi te bjelančevine sustava komplementa, a specifičnu imunost limfociti i protutijela (2).

Protutijela su imunoglobulini koji se razlikuju prema razredima i podrazredima. Tako razlikujemo razrede IgM, IgG, IgA, IgE, IgD i podrazrede IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Protutijela koja čovjek stvara na antigene iz okoliša zovemo prirodna protutijela i najčešće pripadaju IgM razredu. Za razliku od njih postoje i imuna protutijela koja nastaju nakon susreta s antigenima drugog čovjeka. To se obično događa tijekom i nakon transfuzije krvnih pripravaka ili tijekom trudnoće. Stvaranje protutijela na točno određeni antigen nazivamo imunizacijom. Razlikujemo primarnu imunizaciju ili prvi susret s antigenom i sekundarnu imunizaciju koja obilježava drugi i svaki sljedeći susret s istim antigenom. Kod primarne imunizacije najprije se stvaraju protutijela razreda IgM, a nakon njih i razreda IgG te dolazi do stvaranja memorijskih limfocita. Upravo zbog njih sekundarnu imunološku reakciju prati vrlo brz porast titra protutijela, koja su razreda IgG. Posljedica imunizacije eritrocitnim antigenima može biti poslijetransfuzijska hemolitička reakcija (PTHR) ili hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta (HBFN) (3).

Glavne preporuke imunoprofilakse u svrhu prevencije RhD imunizacije objavljene od strane Britanskog komiteta za standarde u hematologiji (BCSH) i revidirane od Britanskog društva hematologa (BSH) i predstavnika Kraljevskog društva porodničara i ginekologa Ujedinjenog Kraljevstva (RCOG UK) su sljedeće:

- Nakon potencijalnog imunizacijskog događaja treba primijeniti anti-D zaštitu čim prije, a svakako unutar 72 sata. Ukoliko nije ordinirana adekvatna profilaksa, a bila je indicirana, ima smisla dati istu dozu anti-D imunoglobulina i do 28 dana od potencijalno senzibilizirajućeg incidenta.

- Svim trudnicama potrebno je prilikom prvog posjeta liječniku kao i u 28. tjednu trudnoće učiniti probir za eritrocitna protutijela (IAT).

- Svim neimuniziranim RhD negativnim trudnicama treba ponuditi rutinsku anti-D zaštitu u obliku jedne doze u 28. tjednu trudnoće ili u dvije doze i to u 28. tjednu i u 34. tjednu trudnoće.

- Rutinsku antenatalnu anti-D zaštitu treba promatrati zasebno i primijeniti bez obzira je li već primijenjena anti-D zaštita zbog potencijalnog imunizacijskog događaja.

- Nakon poroda, iz krvi pupkovine potrebno je odrediti ABO i RhD krvnu grupu novorođenčeta. Ukoliko se potvrdi da je dijete RhD pozitivno, svim neimuniziranim RhD negativnim majkama treba unutar 72 sata dati anti-D zaštitu (4).

Svakoj se trudnici pri prvom posjetu liječniku, uz ostale krvne testove koji se rade u trudnoći, određuje ABO krvna grupa, Rh faktor te se testira na prisutnost različitih protutijela u cirkulaciji indirektnim antiglobulinskim testom. Provođenjem testova pretraživanja antieritrocitnih protutijela tijekom trudnoće važno je za praćenje intrauterinog razvoja djeteta kao i mogućeg transfuzijskog liječenja majke. Prva kontrola indirektnog antiglobulinskog testa je u prvom trimestru trudnoće kada se vidi inicijalni status majke, postojanje protutijela, ali se isto tako može detektirati sekundarni imunizacijski odgovor, jer se veliki dio eritrocitnih antigena razvija već od 8.tjedna embrionalnog razvoja. Ukoliko se testiranjem na prvoj kontroli otkriju protutijela koja su klinički značajna za HBFN potrebno je strogo nadzirati trudnoću i titar trudnice. Druga kontrola je u 28. tjednu trudnoće i važna je radi starenja placente i mogućeg fetomateralnog krvarenja, što dovodi do većeg kontakta majke s antigenima djeteta, a time i mogućnosti imunizacije majke. Treća kontrola je na kraju trudnoće radi detekcije protutijela koja su se mogla stvoriti tijekom same trudnoće, a koja su nam isto tako važna za moguće transfuzijsko liječenje, za postojeću ali i svaku iduću trudnoću. Ukoliko se antitijela detektiraju na zadnjoj kontroli ne predstavljaju nužno veliki rizik za postojeću trudnoću. Testiranje se ponavlja tijekom trudnoće i to kod RhD negativnih

trudnica u 28. tjednu trudnoće, odnosno 32. - 34. tjednu trudnoće, a kod RhD pozitivnih u 34. tjednu trudnoće. Trudnicu treba savjetovati o nužnosti redovite imunohematološke i ginekološke kontrole.

1.1. Eritrocitne krvne grupe i HBFN

Sustav krvnih grupa definira nazočnost antigena na eritrocitnoj membrani i opisanog protutijela na taj antigen. Sva antieritrocitna protutijela grupa nemaju jednako kliničko značenje. Razlikujemo klinički značajna i uvjetno klinički značajna protutijela. U klinički značajna i ujedno najčešća protutijela ubrajamo protutijela iz ABO, Rh, Kell, Kidd i Duffy sustava krvnih grupa. Uvjetno klinički značajna protutijela su obično iz MNS, Lewis, P, Ii sustava krvnih grupa. Protutijela iz svih navedenih sustava krvnih grupa mogu uzrokovati poslijetransfuzijsku hemolitičku reakciju (PTHR), a neka od njih i hemolitičku bolest fetusa i novorođenčeta (HBFN). HBFN može biti uzrokovana anti-A i anti-B protutijelima razreda IgG majki krvne grupe O i protutijelima drugih specifičnosti, najčešće anti-D, anti-c, anti-K, anti-Jka.

Klinički značaj antieritrocitnog protutijela ovisi o brojnim čimbenicima: sastavu eritrocitnog antigena, njegovom broju i izraženosti istog na eritrocitnoj membrani, razredu, podrazredu, količini (titru) protutijela, sposobnosti protutijela da prođe posteljicu, sposobnosti protutijela da aktivira komponente sustava komplementa i općenito imunološke aktivnosti osobe (5).

1.1.1. Ugljikohidratni eritrocitni antigeni

ABO sustav krvnih grupa najznačajniji je sustav krvnih grupa čiji su antigeni po sastavu ugljikohidrati. Ostali ugljikohidratni eritrocitni antigeni imaju manji klinički značaj i rijetko uzrokuju PTHR i HBFN.

Protutijela kod ABO sustava krvnih grupa stalno su nazočna u cirkulaciji, a osobito su značajna u nositelja krvne grupe O koji imaju veliki udio protutijela razreda IgG, pa osim teških intravaskularnih PTHR mogu uzrokovati i različite stupnjeve HBFN.

ABO antigeni u novorođenčeta nisu dobro razvijeni jer je, kao i kod svih ugljikohidratnih antigena, sinteza tih antigena osjetno slabija nego u odraslih osoba. U novorođenčeta su prisutna samo majčina ABO IgG protutijela, koja su prošla posteljicu. Zbog toga se do 4. mjeseca djetetova života ABO krvna grupa određuje samo dokazivanjem antigena na eritrocitima, a ne i određivanjem ABO protutijela.

Djeca krvne grupe A, B ili AB rođena od majki krvne grupe O ugrožena su ABO IgG protutijelima koja prolaze posteljicu. ABO HBFN može se pojaviti i u prvoj trudnoći (6).

1.1.2. Proteinski eritrocitni antigeni

S proteinskim antigenima krvnogrupnih sustava organizam se najčešće susreće tijekom imunizacijskih događaja: transfuzija, trudnoća, transplantacija. Ti se antigeni formiraju na eritrocitnoj membrani već u prvom tromjesečju trudnoće. Protutijela na proteinske antigene su predominantno razreda IgG i kao takva uvijek spremna za razvoj ekstravaskularne PTHR i HBFN. Nakon imunizacije proteinskim antigenima ostaje trajno pamćenje (memorija) limfocita na prethodni susret s antigenom. Ponovni susret s istim antigenom uzrokovat će brzi porast broja protutijela. Zbog toga je izuzetno važno provoditi imunohematološko prijetransfuzijsko i antenatalno ispitivanje uzoraka krvi bolesnika i trudnica.

Rh sustav

Najveći je i najkompleksniji sustav krvnih grupa koji je zasnovan na 54 antigena od kojih je pet glavnih, i to D, C, c, E, e. Najvažniji je D antigen, koji je zbog svoje građe visokoimunogeničan, a po važnosti i učestalosti slijedi ga c antigen. Rh antigeni se nalaze samo na eritrocitima. Rh geni su kodominantni i nasljeđuju se kao haplotip (7).

Slabi D je izraz za eritrocitni fenotip koji ima promijenjenu strukturu D antigena ili na membrani eritrocita ima mali broja antigena.

Rh- senzibilizacija nastaje zbog imunizacije s eritrocitnim antigenima Rh sustava krvnih grupa. Imunizacija je moguća transfuzijama, u tijeku trudnoće, nakon pobačaja i porođaja. Prelazak fetalnih RhD pozitivnih eritrocita u cirkulaciju RhD negativne majke uvjet je za RhD-imunizaciju trudnice i RhD-HBFN. Ukoliko majka nije ranije imunizirana, mehanizam

nastanka izoimunizacije uvjetovan je prelaskom fetalnih eritrocita u njenu cirkulaciju, čiji organizam reagira stvaranjem protutijela. Protutijela majke prolaze kroz posteljicu u fetus. U smjeru fetus - majka mogu prolaziti eritrociti, trombociti, limfociti, stanice samog trofoblasta. Fetalni eritrociti mogu proći već u 8. ili 9. tjednu trudnoće. Iz majke u fetus mogu prolaziti majčini eritrociti, trombociti i imunoglobulini. Prolaz IgG imunoglobulina (protutijela) dokazan je u 11. tjednu trudnoće, a s porastom titra koncentracija majčinih protutijela može biti viša u djeteta nego u majke. Anti-D protutijela mogu se početi stvarati već u prvoj trudnoći, no rijetko se mogu dokazati prije 28. tjedna trudnoće. Obično se otkriju iza 34. tjedna trudnoće. Što kasnije nastanu to je veća šansa da se rodi dijete bez znakova HBFN ili sa slabo izraženom kliničkom slikom HBFN. U drugoj i svakoj sljedećoj trudnoći, u kojoj anti-D imunizirana trudnica nosi RhD pozitivan plod, HBFN može biti jače izražena zbog porasta titra protutijela. RhD senzibilizacija i HBFN uglavnom je izražena u drugoj i u sljedećim trudnoćama.

Kell sustav

Antigeni iz Kell sustava krvnih grupa sljedeći su po imunogeničnosti iza antigena Rh sustava. Broj antigena Kell sustava na eritrocitnoj membrani je ukupno gledano manji u odnosu na Rh sustav, ali su zbog izuzetne imunogeničnosti klinički značajni. Najvažniji su antigeni iz Kell sustava krvnih grupa K (K1) i k (K2), prema starijem nazivlju poznat kao Chellano (k). K antigen je jak imunogen. Anti-K protutijelo je klinički značajno jer uzrokuje PTHR i HBFN i najčešće je protutijelo iz ovog sustava krvnih grupa. HBFN uzrokovana protutijelima iz Kell sustava posljedica je supresije eritropoeze, a manje hemolize fetalnih eritrocita. Osobitost ovih protutijela je inhibicija eritropoeze, zbog čega u perifernoj krvi fetusa nije izražena retikulocitoza i eritroblastoza. Eritrocitni prekursori budu razoreni u vrlo ranoj fazi sazrijevanja, kad je količina hemoglobina u njima mala i zbog toga destrukcija eritrocita ne dovodi do porasta bilirubina u amnijskoj tekućini. Naime, koncentracija bilirubina u amnijskoj tekućini i broj retikulocita fetusa nisu proporcionalni jačini anemije. Titar anti-K protutijela nema pozitivnu prediktivnu vrijednost te je potreban intenzivan nadzor trudnoće (fetusa) bez obzira na vrijednost titra. Dijete se najčešće rađa s teškom anemijom dok je hiperbilirubinemija umjerena ili nije izažena (8).

Duffy sustav

Duffy sustav čini pet antigena. Oni se nalaze i na drugim tkivima (mozak, bubreg, slezena, pluća i srce). Najavažniji su Fy^a i Fy^b antigeni. PTHR i HBFN uzrokovane anti-Fy^a

protutijelom su rijetke, ali mogu imati težak klinički tijek, dok anti-Fy^b rijetko uzrokuje PTHR i HBFN i simptomi reakcija su blagi (9).

Kidd sustav

Kidd sustav čine 3 antigena, od kojih su dva kodominantna podjednake učestlosti: Jk^a i Jk^b. Najčešće opisana su anti-Jk^a protutijela dok su anti-Jk^b protutijela rjeđe zastupljena. Protutijela iz Kidd sustava krvnih grupa uzrokuju teške akutne i odgođene PTHR, iako se na eritrocitnoj membrani nalazi mali broj antigena raspoređenih u nakupinama (klasteri). Protutijela koja uzrokuju teške intravaskularne PTHR najčešće su IgM razreda ili IgG3 i oba dobro aktiviraju komplement. U prijetransfuzijskoj dijagnostici Kidd protutijela su pravi imunohematološki izazov zbog velikih oscilacija u titru (količini) (10).

MNS sustav

Ovaj sustav ima 46 antigena. Klinički su najvažniji antigeni ovog sustava M, N, S i s. Iako je anti-M protutijelo najčešće prirodno i razreda IgM, opisani su slučajevi HBFN zbog IgG anti-M. Oni su prirodna protutijela, klinički važna samo ako su aktivna na tjelesnoj temperaturi. Anti-S i anti-s su uglavnom IgG protutijela koja se javljaju nakon imunološkog podražaja transfuzijom krvi ili trudnoćom, ali rijetko uzrokuju PTHR i HBFN (11).

Lutheran sustav

S obzirom da antigeni nisu razvijeni u trenutku poroda, Lutheran protutijela uzrokuju samo blage oblike HBFN (12).

1.2. Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta (HBFN)

Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta (HBFN) je izravna posljedica razgradnje eritrocita djeteta eritrocitnim protutijelima majke koja su u tijeku trudnoće preko posteljice prošla iz majčinog krvotoka u krvotok djeteta. Bolest se počinje razvijati tijekom trudnoće, a jačina bolesti varira od anemije i pojačane žutice bebe nakon poroda do moguće smrti bebe prije rođenja.

Iz krvotoka majke tijekom trudnoće dijete dobiva hranjive tvari i kisik, a štetne tvari prelaze iz krvotoka djeteta u majčin krvotok. Krvotok djeteta i majke su u posteljici međusobno vrlo

blisko povezani pa postoji mogućnost prijelaza eritrocita djeteta u krvotok majke koji se u normalnoj trudnoći mogu dokazati u cirkulaciji majke već u drugom mjesecu trudnoće. Njihov prelazak je jače izražen u zadnja tri mjeseca trudnoće, dok je najjače izražen tijekom poroda. Pojačan prijelaz eritrocita djeteta u cirkulaciju majke događa se tijekom spontanog ili namjernog pobačaja i svih invazivnih dijagnostičkih zahvata tijekom trudnoće u kojima se preko posteljice uzimaju uzorci amnijske plodove vode, dijelova posteljice ili tkiva bebe potrebnih za utvrđivanje zdravlja bebe. Imuni sustav majke na eritrocitima djeteta prepoznaje one dijelove eritrocita djeteta (antigene) koje je dijete naslijedilo od oca. Oni su za majčin imuni sustav strani čimbenici protiv kojih njezin imuni susutav može početi stvarati protutijela. Osim tijekom trudnoće, žene mogu razviti eritrocitna protutijela i ukoliko su za vrijeme života zbog bolesti morale primiti transfuzije krvi. Slučajno se može dogoditi da majka razvije eritrocitno protutijelo na nepoznati dio transfundiranog eritrocita koji je istovjetan s eritrocitnim antigenom koje je dijete naslijedilo od oca. Eritrocitna protutijela prolaze kroz posteljicu, ulaze u krvotok djeteta, vežu se na eritrocitne antigene koje je dijete naslijedilo od oca te uzrokuju njihovu razgradnju i hemolitičku bolest novorođenčeta. HBFN mogu uzrokovati sva protutijela koja su razreda IgG. Najčešći podrazredi IgG protutijela su IgG1 i IgG3. RhD imunizacija najčešća je imunizacija, a hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta uzrokovana anti-D protutijelima može imati vrlo tešku kliničku sliku.

Fetalni eritrociti se mogu dokazati u majčinom krvotoku vrlo rano u trudnoći. Iako majka nije bila prije imunizirana, može se razviti hemolitička bolest novorođenčeta zbog primarne imunizacije majke tijekom trudnoće. Majčina imunizacija najčešće nastaje u tijeku porođaja zbog ulaska djetetovih eritrocita u majčin krvotok. To je razlog zbog kojeg se hemolitička bolest u novorođenčeta najčešće opaža u drugoj ili kasnijim trudnoćama, osim ako majka nije bila imunizirana ranijim transfuzijama. Hemolitička bolest novorođenčeta uzrokovana anti-A i anti-B protutijelima u majke O krvne grupe može nastati već u prvoj trudnoći jer su protutijela anti- A i anti-B uvijek prisutna i razreda su IgG te prolaze kroz posteljicu. Kod neimunizirane RhD negativne trudnice (nema anti-D protutijela u krvi), RhD-imunizacija može se spriječiti pravodobnom primjenom hiperimunog anti-D gamaglobulina (13).

Izmjena plinova, hranjivih i štetnih tvari odvija se preko posteljice, gdje su krvotok djeteta i majke vrlo blisko povezani pa postoji mogućnost prijelaza i eritrocita djeteta u krvotok majke. Prelazak eritrocita je jače izražen u zadnja tri mjeseca trudnoće, a najjače tijekom poroda. Pojačan prijelaz eritrocita djeteta u cirkulaciju majke događa se tijekom krvarenja u trudnoći, spontanog ili namjernog pobačaja, ektopične trudnoće, traume abdomena i invazivnih

dijagnostičkih zahvata tijekom trudnoće (amniocenteze, kordocenteze). HBFN može imati blagu do tešku kliničku sliku, a izuzetno rijetko uzrokovati i smrt novorođenčeta. Klinička slika HBFN ovisi o individualnom imunološkom odgovoru majke pa su mogući razni oblici bolesti od najblaže, samo laboratorijski utvrđene anemije, do najteže kliničke slike fetalnog hidropsa i intrauterine smrti ploda, ako se bolest ne liječi. Karakterističan je laboratorijski nalaz smanjeni broj eritrocita, smanjena koncentracija hemoglobina, povećan broj retikulocita i povećana koncentracija bilirubina. Stupanj težine anemije kao i vrijeme pojavnosti ovisi o intenzitetu imunizacije. Ako hemoliza i anemija ne rezultiraju hidropsom, bolest svejedno može biti ozbiljna. Kod nekog broja fetusa hemoliza se razvija tek poslije porođaja s kliničkom slikom hiperbilirubinemije i opasnošću od bilirubinske encefalopatije s trajnim neurološkim posljedicama. Novorođenče sa slikom hiperbilirubinemije neposredno pri rođenju ne mora pokazivati znakove bolesti, ali se već u prvim satima života javlja žutica koja se brzo pojačava. Koncentracija bilirubina u serumu brzo raste, a slezena i jetra su gotovo uvijek povećane, prvenstveno zbog žarišta ekstramedularne hematopoeze koja se u njima razvija još u fetalno doba. Trećeg do petog dana života javljaju se znakovi bilirubinske encefalopatije kao što su somnolencija, hipotonija mišića na koju se nadovezuje opistotonus, mišićni hipertonus, krikovi, napad toničko-kloničkih grčeva te centralno zatajenje disanja zbog prodora bilirubina u bazalne ganglije mozga, a može uzrokovati i gluhoću te mentalnu retardaciju (13).

Blaga HBFN obično prolazi samo uz fototerapiju, dok su kod srednjeg i teškog oblika HBFN potrebne intrauterine i/ili eksangvinotransfuzije.

ABO *vs.* RhD HBFN

ABO antigeni u novorođenčeta nisu dobro razvijeni ni na eritrocitima ni kao krvnogrupne supstance, a i sustav komplementa je slabo razvijen. To i jest jedan od razloga najčešće blažeg oblika HBFN kod ABO nepodudarnosti majke i djeteta. Budući da su anti-A i anti-B protutijela u osoba krvne grupe O u većoj količini razreda IgG u svakoj trudnoći mogu proći posteljicu i ugroziti dijete koje je nositelj krvne grupe A, B ili AB. ABO hemolitičku bolest fetusa i novorođenčeta nije moguće prevenirati. Važno je ponovo naglasiti da je klinička slika uglavnom blaga i fototerapija je najčešće dostatan oblik liječenja.

Za razliku od HBFN uzrokovanu anti-A i anti-B protutijelima, anti-D protutijela češće uzrokuju ozbiljniju kliničku sliku. Ipak, anti-D protutijela ugrožavaju drugu i svaku sljedeću trudnoću s RhD pozitivnim djetetom. To je jedini antigen za koji postoji prevencija što opravdava nužnost antenatalnog praćenja trudnice (imunohematološko i ginekološko) te pravovremeno davanje zaštite u obliku hiperimunog anti-D gamaglobulina.

Nažalost, za imunizacije ostalim potencijalnim antigenima još uvijek ne postoji dostupna komercijalna zaštita (preventiva). Stoga je važno provoditi imunohematološko ispitivanje i u RhD pozitivnih trudnica (14).

1.3. Imunohematološka dijagnostika tijekom trudnoće (antenatalno ispitivanje)

Testovi u transfuzijskoj medicini se izvode iz uzoraka krvi. U krvi se nalaze sve stanice i proteini. Na stanicama su stanični antigeni, a u plazmi su protutijela. Na plazmatskim se proteinima također nalaze antigeni. U imunohematološkom ispitivanju koriste se i plazma i eritrociti iz uzorka krvi pacijenta (trudnica, majka, novorođenče, otac) te testne reagencije poznate specifičnosti (testni eritrociti i najčešće monoklonska protutijela). Pozitivna reakcija između protutijela i staničnih antigena tijekom imunohematološkog testiranja vidi se kao aglutinacija (15).

Ginekolog u primarnoj zdravstvenoj zaštiti odgovoran je da prilikom prvog pregleda u trudnoći upozna trudnicu s važnošću redovitog imunohematološkog ispitivanja i mogućnostima prevencije te mogućeg liječenja. Imunohematološka dijagnostika provodi se tijekom trudnoće (majka), a neposredno nakon poroda u slučaju RhD negativne rodilje određuje se RhD status djeteta radi odluke o potrebi postnatalne zaštite.

1.3.1. Početno ispitivanje

Imunohematološko ispitivanje se provodi u svih trudnica od 10. do 12. tjedna trudnoće. Ono obuhvaća određivanje ABO i RhD antigena i pretraživanje eritrocitnih protutijela (indirektni Coombsov test - IAT, test senzibilizacije). Ispitivanje se provodi u transfuzijskim jedinicama

koje zadovoljavaju imunohematološku kontrolu kvalitete. Način određivanja ABO i RhD antigena te pretraživanje protutijela propisani su odgovarajućim uputama i standardima. Budući da je to prvo određivanje ABO i RhD krvnih grupa u trudnoći, ovom se pretragom rano otkrivaju RhD negativne trudnice. Najvažnije je odrediti RhD krvnu grupu jer o tome ovisi hoće li trudnica nakon poroda dobiti antenatalnu zaštitu (hiperimuni anti-D gamaglobulin) i hoće li se ginekolog odlučiti za fetalnu RHD genotipizaciju. Drugi razlog je test senzibilizacije - IAT, koji je sastavni dio pretrage krvne grupe i kojim se utvrđuje prisutnost/odsutnost klinički potencijalno značajnih eritrocitnih protutijela, rizik i mogući intenzitet HBFN (16).

1.3.2. Kontrolno ispitivanje trudnica

Ispitivanje se obvezno provodi u svih RhD negativnih trudnica, a zbog sve većeg udjela imunizacije drugim eritrocitnim antigenima preporuča se i u RhD pozitivnih trudnica. U RH kontrolno testiranje RhD negativnih trudnica se preporuča u 28. tjednu trudnoće, odnosno 32.-34. tjednu trudnoće, a RhD pozitivnih u 34. tjednu trudnoće. Ispitivanje obuhvaća određivanje indirektnog antiglobulinskog testa (17).

1.3.3. Dodatna ispitivanja trudnica

Dodatna ispitivanja obvezno se provode u svih trudnica koje imaju pozitivan test pretraživanja protutijela (IAT) na početnom ili kontrolnom ispitivanju tijekom trudnoće. Testiranje se provodi određivanjem specifičnosti i titra protutijela u uzorku krvi trudnice. Iz uzorka krvi oca djeteta određuje se antigen na koji je trudnica imunizirana. U imuniziranih trudnica kontrole do 28. tjedna trudnoće provode se svaka 4 tjedna, a nakon 28. tjedna trudnoće svaka 2 tjedna (17).

1.3.4. Određivanje očevog i fetalnog RhD statusa

Kod određivanja očeva RhD statusa treba provjeriti podatak o očinstvu. Ukoliko je taj podatak pouzdan i ako je otac RhD negativan, daljnje kontrole majke su potrebne zbog

mogućnosti stvaranja protutijela na antigene iz ostalih sustava krvnih grupa iako će dijete biti RhD negativno.

Ako je otac RhD pozitivan, treba preporučiti fetalnu RHD genotipizaciju. Ukoliko se ne postavi pravovremena dijagnoza RhD negativnog fetusa, posljedice su suvišni dijagnostički postupci i kontrole, nepotreban gubitak vremena i novca te nepotrebna brižnost trudnice (14).

Unatrag desetak godina u zapadnim zemljama, a i u RH (u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu), koristi se neinvazivna metoda određivanja fetalnog RhD statusa izravno iz majčine plazme. Metoda se temelji se na izolaciji, umnažanju i analizi fetalne izvanstanične (cell-free) DNA (cffDNA, cell-free fetal DNA) "real-time" PCR metodom.

1.4. Imunohematološka dijagnostika nakon poroda

Kod novorođenčadi RhD negativnih majki, majki krvne grupe O, te u novorođenčadi s klinički primjetnom žuticom i/ili povišenom razinom bilirubina, ispitivanje obuhvaća određivanje ABO i RhD antigena, te direktni antiglobulinski test (DAT). U slučaju pozitivnog DAT-a provodi se dodatno ispitivanje koje uključuje određivanje specifičnosti i eluciju protutijela. Time se potvrđuje prisutnost majčinih protutijela na eritrocitima djeteta, te dokazuje uzrok HBFN.

Iz majčinog uzorka krvi određuje se IAT i, ako je pozitivan, radi se identifikacija antieritrocitnih protutijela (18).

1.5. Zaštita (Profilaksa)

RhD profilaksa tijekom trudnoće i nakon poroda se odvija sukladno rezultatima imunohematološkog ispitivanja. Važna je uloga ginekologa u primarnoj zdravstvenoj zaštiti da prilikom prvog pregleda u trudnoći upozna trudnicu s važnošću redovitog imunohematološkog ispitivanja, osobito ako je poznato da je trudnica RhD negativna. Sve zdravstvene ustanove u Hrvatskoj koje su uključene u zdravstvenu zaštitu trudnica trebaju biti upoznate s postupcima RhD profilakse i pomoći njenom provođenju.

Profilaksu RhD imunizacije potrebno je provesti unutar 72 sata nakon poroda te kod svih potencijalno mogućih imunizacijskih događaja u trudnoći ili prekida trudnoće. Važno je hiperimuni anti-D gamaglobulin primijeniti nakon svakog imunizacijskog događaja i u svakoj trudnoći (16, 17).

2. CILJEVI

Cilj ovog rada je ispitati prevalenciju imuniziranih trudnica u razdoblju od 2012. do 2016. godine, utvrditi antitijela koja su bila uzrok pozitivnog indirektnog antiglobulinskog testa s obzirom na krvnu grupu majke i Rh faktor te razdoblje u kojem su otkrivena.

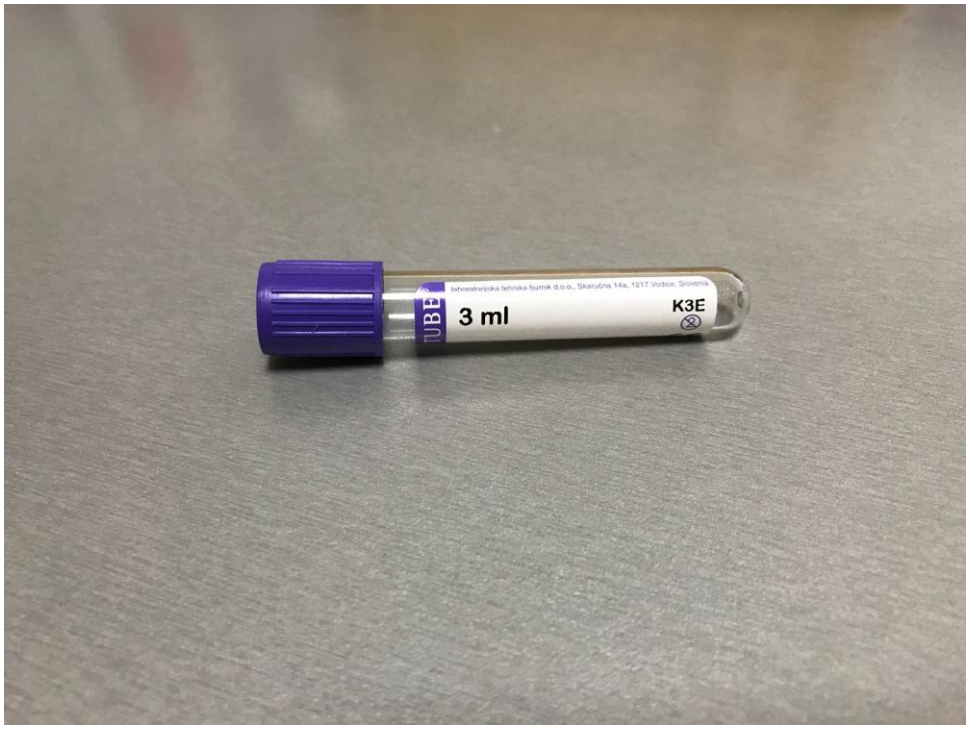
3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ustroj studije

U ovom radu prikazana je analiza rezultata imunohematološkog testiranja uzoraka periferne krvi trudnica upućenih u Opću bolnicu „Dr. Ivo Pedišić“. Testiranje je provedeno u vremenskom periodu od 2012. do 2016. godine na analizatorima Wadiana i Twin Sampler Swing.

3.2. Materijal

Imunohematološka laboratorijska ispitivanja provedena su na uzorcima krvi, plazmi ili serumu. Uzorak krvi za izvođenje imunohematoloških ispitivanja uzima se u epruvetu s antikoagulantnom otopinom ili bez nje. Obično se uzorak uzima u epruvetu s ljubičastim čepom koja u sebi sadrži antikoagulantnu otopinu EDTA. Uzorak, nakon što je zaprimljen ili izvađen u laboratoriju, treba biti centrifugiran na 3500 okretaja, 5 minuta.



Slika 1. Epruveta za hematološke pretrage (fotografirala autorica)

Određivanje krvnih grupa ABO sustava izvodi se hemotestom pomoću anti-A, anti-B i anti-AB testnih reagensa i eritrotestom pomoću A1, B i O testnih eritrocita.

Rezultati hemotesta i eritrotesta se uvijek moraju slagati. Prema aglutinaciji eritrocita s testnim reagensima određuju se četiri krvne grupe iz ABO sustava: A, B, AB i O.

3.3. Metode

Određivanje Rh(D) krvne grupe izvodi se pomoću anti-D testnog reagensa uz RhD negativnu kontrolu. Pozitivna reakcija (aglutinacija) određuje da je osoba RhD pozitivna (+), a negativna reakcija (izostanak aglutinacije) da je RhD negativna (=).

Slika 2. Twin sampler swing (fotografirala autorica)

Titar protutijela je semikvantitativna metoda kojom se određuje količina protutijela u serumu i aviditet protutijela. Ovaj se test primjenjuje u aloimuniziranih trudnica s ciljem procjene

količine protutijela u cirkulaciji trudnice koja mogu dovesti do HBFN. Važno je redovito praćenje titra protutijela, uvijek u usporedbi s nalazom u prethodnom uzorku/uzorcima. To znači da pri svakom imunohematološkom testiranju radimo titar protutijela paralelno iz trenutnog uzorka i uzorka koji smo smrznuli nakon prethodnog ispitivanja. Porast titra protutijela za više od dva razrjeđenja može biti klinički značajan i poslužiti ginekologu kao orijentir za ginekološke dijagnostičke pretrage (npr. doppler sonografijom - određivanje protoka kroz arteriju cerebri mediju).

Antiglobulinski test (Coombsov test) je osnovni test za određivanje antieritrocitnih protutijela. Antiglobulinskim reagensom otkrivamo stanice obložene IgG protutijelima ili komplementom. Postoje dvije vrste antiglobulinskog testa: direktni antiglobulinski (DAT) i indirektni antiglobulinski test (IAT).

Direktni antiglobulinski test (DAT) je test u kojem se u suspenziju eritrocita ispitanika dodaje antihumaniglobulin. Pomoću ovoga testa otkrivaju se stanice koje su vezale protutijela i/ili komplement *in vivo*. Pri sumnji na HBFN taj test se radi sa suspenzijom eritrocita novorođenčeta kako bi se odredilo ima li na njima vezanih majčinih protutijela (IgG). U radu se koriste isključivo eritrociti iz uzorka krvi uzetog s EDTA antikoagulansom.

Pribor i materijali za DAT:

- Mikrokartice: DG Gel Coombs (Grifols) i ID Card LISS/Coombs (DiaMed)
- Epruveta
- Diluent 2
- Mikropipeta od 10 i 50 µL
- Grifols i DiaMed centrifuga
- Uzorak ispitivane krvi uzet u epruvetu s antikoagulansom EDTA

Opis aktivnosti za DAT:

- Pripremiti suspenziju - u jednu epruvetu dodati 1000µL Diluenta 2 i 10 µL gustih eritrocita ispitanika
- Pipetirati 50 µL pripremljene suspenzije eritrocita u DG Gel Coombs ili LISS/Coombs mikrokarticu

- Centrifugirati 10 minuta u Grifols ili DiaMed centrifugi

Indirektnim antiglobulinskim testom (IAT) otkriva se postoje li u ispitivanoj plazmi protutijela koja oblažu ili aglutiniraju testne eritrocite in vitro. Testom se otkrivaju protutijela koja su aktivna na 37°C, tj. sposobna vezati eritrocitne antigene i eventualno aktivirati komplement.

Pribor i materijali za IAT:

- Mikrokartice: DG Gel Coombs (Grifols) i ID Card LISS/Coombs (DiaMed)
- testni eritrociti: 0,8% Serascan Diana 3 (Grifols) i 0,8% ID-DiaCell I, II, III (DiaMed)
- plazma ispitanika
- Mikropipeta od 50 i 25 µL
- Termostat Grifols i DiaMed na temperaturi od 37°C
- Grifols i DiaMed centrifuga

Opis aktivnosti za IAT:

- Ukapati 50µL 0,8% testnih eritrocita
- Iz uzorka ispitanika uzeti 25 µL plazme
- Inkubirati u termostatu na 37°C na 15 minuta
- Centrifugirati na 10 minuta

Na eritrocitu trudnice kod koje je dokazano eritrocitno protutijelo određuje se eritrocitni antigen na koji je razvijeno eritrocitno protutijelo. Prije početka tipiranja potrebno je provjeriti način određivanja eritrocitnih antigena iz priložene upute specifičnog seruma ili reagencije. Specifični serum ili reagencija: anti-C, anti-E, anti-c, anti-e, anti-K, anti-k, anti-M, anti-N, anti-S, anti-s, anti-Jka , anti-Jkb , anti-Fya , anti-Fyb, anti-Lea , anti-Leb , anti-P1.

3.4. Statističke metode

Kategorijski podaci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike razdioba kategorijskih varijabli testirane su Fisherovim egzaknim testom. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program SPSS (inačica 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).

4. REZULTATI

U promatranom četverogodišnjem razdoblju od kraja 2012. do kraja 2016. godine u Odjelu za transfuziju Opće bolnice u Sisku provedeno je imunohematološko testiranje na uzorcima krvi od ukupno 3519 trudnica (Tablica 1). Svim trudnicama se, sukladno zahtjevima propisanim na uputnicama njihovih liječnik, odredila ABO krvna grupa i ostali standardni testovi pri prvom testiranju. Kod svih trudnica je uzeta i anamneza vezana uz mogućnost i rizik razvoja senzibilizacije tijekom trudnoće. Od ukupno 3519 testiranih trudnica, imunizacija je otkrivena kod ukupno njih 22 (0,62 %). Najveći broj i postotak imunizacija (13 ili 1,48 %) otkriven je 2016. godine, a samo jedna (0,12 %) godinu ranije.

Tablica 1. Prikaz broja testiranih trudnica i imunizacija u razdoblju od 2012. do 2016. godine

Godina	Broj testiranih trudnica	Ukupno imunizacija Broj (%)	Aktivna imunizacija Broj (%)	Pasivna anti-D zaštita Broj (%)
2013.	904	4 (0,44)	4 (0,44)	0
2014.	883	4 (0,45)	3 (0,34)	1 (0,11)
2015.	855	1 (0,12)	0	1 (0,12)
2016.	877	13 (1,48)	12 (1,37)	1 (0,11)
Ukupno	**3519**	**22 (0,62)**	**19** (0,54)	**3** (0,09)

Od 3519 trudnica temeljem anamnestičkih podataka i ponavljanog imunohematološkog testiranja nađeno je 22 imuniziranih trudnica i to 19 (0,54 %) aktivno imuniziranih i 3 (0,09 %) trudnice s pozitivnim testovima koji su rezultat primitka anti-D zaštite (pasivna imunizacija).

Tablica 2. Prikaz broja imuniziranih trudnica koje su testirane u OB „Dr. Ivo Pedišić“

REDNI BROJ	DOB (god.)	KRVNA GRUPA	OSTALI ANTIGENI	TJEDAN TRUDNOĆE	TRANSFUZIJA (god.,br.)	Anti-RhD (ranije)	Anti-RhD (sada)	BROJ PORODA	PREKID TRUDNOĆE	PRONAĐENA PROTUTIJELA
1.	29	AB+	C-E+c+e+	32.	2013 (2KE)			1		anti-Le^a
2.	24	O -	C+E-c+e+	26.	-	-	-	-	-	anti- D
3.	24	O+		27.	-	-	-	-	-	anti-M
4.	34	O+	C-E+c+e-	37.	-	-	-	2	-	anti-M
5.	34	A-	C-E-c+e+	36.	-	-	-	-	-	anti-E
6.	38	A+	C+E-c-e+ K+		-	-	-	1		anti- c
7.	33	O+	C-D+E+c+e-	36.	DA			2	1	anti-C, anti-e
8.	37	O -	C-D-E-c+K+	33.			profilaksa	1		anti- D
9.	39	A-	C-E-c+e+	29.			profilaksa		2	anti- D
10.	25	B+	C+E-c-e+ K+	39.				1		anti-E anti-c
11.	27	O+		5.				1		anti- M
12.	27	B+		13.				1		anti- Le^a
13.	28	O-	C-E-c+e+	28.						anti-Jk^a
14.	35	A+	C+E-c+e+M-N+	26+5				2		anti- M
15.	37	A+	C+E-c-e+K-	20.	2016 (2 KE)			8		Nespecif. hladna
16.	33	O-	C-D-E-c+e+	35.	DA, 2010.		profilaksa	2		anti- D
17.	20	AB+								anti-Le^a
18.	32	O+	C+E-c-e+	16.	DA, 2001.			5	2 AR, 1 SP	anti- c
19.	38	O-	C-E-c+e+	14.		26.11.2016.		3		anti- D+C
20.	29	A-	C-E-c+e+	30.	Negira	negira		1		anti-D
21.	25	A+	C+E-c-e+	28.				1		anti-E
22.	33	A+	C+E-c-e+							anti- E

U Tablici 2 prikazani su svi važniji podaci za ovo istraživanje. Prosječna dob ispitanih imuniziranih trudnica iznosi 30,9 godina. Prema određenom ABO fenotipu najviše su zastupljene nositeljice O krvne grupe (45,5 %), slijede A (36,4 %), a u jednakom postotku (9 %) su zastupljene trudnice krvne grupe B i AB. Među imuniziranim trudnicama bilo je njih 8 (36,4 %) RhD negativno.

Anamnestički podaci koji ukazuju na mogući povećani rizik za razvoj imunizacije prikazani su također u Tablici 2. Kod 6 od 22 trudnice (27 %) ova trudnoća je bila prva trudnoća. Od ostalih 15 jedan porod su imale njih 8 (36 %), 2 poroda njih 4 (18 %), jedna je imala 3 poroda, jedna 5, a jedna 8. Važan čimbenik za imunizaciju jest i prekinuta trudnoća, bez obzira radi li se o artificijelnom ili spontanom pobačaju. Jedna od ispitanica nije imala nijedan porod, nego dva pobačaja prije ove trudnoće.

Važan anamnestički podatak svakako je i podatak o transfuzijskom liječenju, što također može utjecati na pojavu imunizacije. Tri trudnice su ranije primale transfuzije koncentrata eritrocita zbog operativnih zahvata, nevezanih uz trudnoću, jedna 2001., druga 2010. godine, a treća se ne sjeća godine. Tijekom promatrane trudnoće dvije od njih 22 su primile po 2 koncentrata eritrocita; jedna u 33., a druga u 38. tjednu trudnoće.

Kod većine ispitivanih trudnica (15 ili 68 %) imunizacija je otkrivena iza 20.-og tjedna trudnoće. Najranije, u petom tjednu otkrivena je anti-M imunizacija kod trudnice koja u anamnezi ima jedan porod, tri od njih 22.

Tablica 3. Vrsta otkrivenih protutijela kod imuniziranih trudnica

Antigen	Otkrivena protutijela	Broj imuniziranih trudnica	Udio (%)
D	Anti-D zaštita (profilaksa)	3	13,6
D	anti-D	2	9,1
C	anti-c	2	9,1
E	anti-E	3	13,6
D+C	anti-D+anti-C	1	4,5
C+e	anti-C+anti-e	1	4,5
E+c	anti-E+anti-c	1	4,5
M	anti-M	4	18,2
Le^a	anti-Le^a	3	13,6
Jk^a	anti-Jk^a	1	4,5
	nespecifična hladna	1	4,5
Ukupno		**22**	**99,8**

U Tablici 3 prikazana su sumarno otkrivena protutijela. U 22 imunizirane trudnice nađeno je ukupno 25 protutijela. Očekivano, najviše je protutijela iz Rh sustava krvnih grupa: u 13 (59 %) trudnica 16 protutijela. Od toga su u 3 (13,6 %) trudnice bila prisutna anti-D protutijela zbog pasivne anti-D zaštite te u 3 (13,6 %) trudnice protutijela dviju različitih specifičnosti. Pojedinačno najčešća protutijela prema specifičnosti bila su: anti-M protutijela kod 4 (18,2 %) trudnice, anti-E u 3 (13,6 %), pasivna anti-D zaštita u 3 (12%) te anti-D i anti-c protutijela u po 2 trudnice (9,1 %).

Razdioba otkrivenih protutijela značajno se razlikovala između skupina imuniziranih trudnica s obzirom na predznak RhD, odnosno na RhD pozitivne i RhD negativne trudnice (Fisherov egzaktni test, p = 0,005) (Tablica 4).

Tablica 4. Razdioba otkrivenih protutijela kod imuniziranih trudnica s obzirom na RhD predznak

Antigen	**Otkrivena protutijela**	**Rh**		**Ukupno**	**P***
		+	**-**		
D	anti-D zaštita (profilaksa)	0	3	3	0,005
D	anti-D	0	2	2	
C	anti-c	2	0	2	
E	anti-E	2	1	3	
D + C	anti-D + anti-C	0	1	1	
C + e	anti-C + anti-e	1	0	1	
E + c	anti-E + anti-c	1	0	1	
M	anti-M	4	0	4	
Le^a	anti- Le^a	3	0	3	
Jk^a	anti- Jk^a	0	1	1	
Ukupno		13	8	21	

* Fisherov egzaktni test

Od ukupnog broja testiranih trudnica (3519) u njih 13 koje su RhD pozitivne otkrivena su protutijela iz Rh sustava (anti- c, anti-E, anti C+ anti-e, anti- E+ anti-c), zatim MNS sustava (anti- M), te Lewis sustava (anti- Le^a).

U RhD negativnih trudnica 3 su razvile pasivnu imunizaciju, kao posljedica primjene Rhogama. Njih 5 je imunizirano protutijelima iz RhD sustava (anti- D, anti-E, anti- D+ anti-C), a samo 1 protutijelima iz Kidd sustava (anti- Jk^a).

5. RASPRAVA

Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta je jedna od ozbiljnijih komplikacija u trudnoći. Do nje dolazi zbog razlike u antigenima između majke i oca djeteta, kada majčin imunološki sustav antigene koje je dijete naslijedilo od oca prepoznaje kao tuđe i na njih stvara eritrocitna protutijela. ABO i Rh samo dva antigena krvno grupnih sustava koji se utvrđuju prilikom određivanja krvnih grupa. Oko 650 antigena razvrstano je u 45 sustava eritrocitnih krvnih grupa. Ti antigeni se nalaze na membrani eritrocita i građeni su od ugljikohidrata ili proteina, na koje trudnica može razviti protutijela tijekom trudnoće ako dijete naslijedi antigen od oca, a majka ga nema. Treba naglasiti da su pojedina antitijela prirođena te mogu se otkriti već u prvoj trudnoći. Najvažnija su protutijela anti-D, anti-c, anti-K, no iako rjeđe, mogu biti stvorena i protutijela na antigene ostalih eritrocitnih krvnih grupa (14). Kidd protutijela uzrokuju teške akutne i odgođene HTR. Kidd antigeni su razvijeni u trenutku rođenja pa protutijela uzrokuju HBN. Anti- M i anti-N su prirodna koja su klinički važna samo ako su aktivna tjelesnoj temperaturi. Anti- S i anti-s su IgG protutijela koja se javljaju nakon imunološkog podražaja transfuzijom ili trudnoćom. Uzrokuju hemolitičku transfuzijsku reakciju i hemolitičku bolest novorođenčeta. Fy^a (Duffy) rijetko uzrokuje HTR i HBN, ali može imati težak klinički tijek, dok anti- Fy^b rijetko uzrokuje HTR i HBN, a simptomi reakciju su blagi. Lewis (a,b) protutijela se javljaju prirodno, gotovo uvijek IgM tipa i ne uzrokuju HBFN. U otkrivanju eritrocitnih protutijela u plazmi majke koristi se indirektni Coombsov test (IAT), dok se za procjenu količine protutijela radi titar protutijela. Početkom prošlog stoljeća HBFN je bila jedna od vodećih uzroka perinatalnog mortaliteta, a danas se rijetko susreće u svakodnevnoj kliničkoj praksi (17). Razlog tome je sve bolja prenatalna skrb trudnica te primjena prenatalne i postnatalne imunoprofilakse. Danas je točnu učestalost Rh-imunizacije teško ustanoviti jer brojni lakši oblici bolesti ostaju neprepoznati. Uz smanjenu učestalost, posljedični perinatalni mortalitet i morbiditet su također u znatnijem padu, ponajviše zbog novih metoda dijagnostike i terapije te mjera prevencije. Standardi praktično svih razvijenih zemalja propisuju određivanje ABO i RhD antigena u ranoj trudnoći te pretraživanje eritrocitnih protutijela. Uloga ranog pretraživanja protutijela u početku trudnoće zapravo je način utvrđivanja stanja nastalih zbog mogućih ranijih rizika imunizacije, odnosno otkrivanje prethodno imuniziranih trudnica. Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta je izravna posljedica imunološke razgradnje fetalnih eritrocita majčinim protutijelima koja su prošla kroz posteljicu. Za razvoj HBFN najznačajnije je anti-D aloprotutijelo zato što je D

antigen iz Rh sustava krvnih grupa najjači eritrocitni imunogen (15). U promatranom četverogodišnjem razdoblju na Odjelu za transfuziju Opće bolnice Sisak testirano je ukupno 3.519 trudnica, a imunizaciju smo otkrili kod njih 22 (0,62 %). Najveći broj i postotak imunizacije (13 ili 1,48%) otkriven je 2016. godine, a prosječna dob ispitivanih trudnica iznosila je 30,9 godina. Najviše su zastupljene nositeljice O krvne grupe (45,5 %), zatim A (36,4 %), a u jednakom postotku (9 %) trudnice krvne grupe B i AB. Među imuniziranim trudnicama bilo je RhD negativnih i RhD pozitivnih trudnica. Veći broj imunizacija otkriven je kod RhD pozitivnih trudnica. Antitijela koja su uzrokovala senzibilizaciju su anti-D (9,1 %), anti-c (9,1 %), anti-E (13,6 %), anti-D+ anti-C (4,5 %), anti-C+ anti-e (4,5 %), anti-E+anti-c (4,5 %), anti- M (18,2 %), anti- Le^a (13,6 %), anti- Jk^a (4,5 %).

Od registriranih antieritrocitnih protutijela kod trudnica u vremenskom razdoblju od 2012. do 2016. godine na području Sisačko- moslavačke županije uočena su prirodna protutijela Le^a koja nisu klinički značajna, klase su IgM i ne prolaze placentu, a antigeni se razvijaju postnatalno i klinički nisu značajna za HBFN. Anti- M protutijelo koje može biti prirodno i imuno, tj. IgM i IgG komponente je uočeno kod trudnice u 27. tjednu trudnoće koja negira imunizacijski događaj i prethodne trudnoće, te je moguće da se radi o prirodnom protutijelu koje nije klinički značajno za HBFN ili o eventualnom najranijem primarnom imunološkom odgovoru. U 3 trudnice je uočeno imuno anti- M protutijelo jer su imale prethodne porode i imunizacijske događaje. Takva antitijela (50 – 80 %) reagiraju na 37° C, a uzimajući u obzir da je M antigen dobro razvijen kod rođenja mogu uzrokovati značajnu HBFN. U RhD negativnih trudnica je uočena pojava anti- D protutijela kao rezultat primjene anti- D hiperimunog gamaglobulina- profilakse, koja se u današnje vrijeme rutinski primjenjuje u RhD negativnih trudnica prilikom ginekoloških zahvata (amniocenteza, biopsija korionskih resica, kordocenteze) vaginalnih krvarenja i postpartalno do 72h. Anti-D koji je rezultat profilakse je klase IgG, klinički nije značajno za fetus, sprječava imunizaciju majke kroz 3. mjeseca, nestaje iz cirkulacije i IAT majke postaje negativan. U 3 trudnice je detektirano imuno anti- D protutijelo, jednoj u 26.tjednu trudnoće koja negira imunizacijski događaj, kod koje je moguće da se radi o primarnom imunološkom odgovoru, senzibilizacija kod hiperreaktora. Kod druge trudnice je detektirano u 30.tjednu trudnoće s jednim porodom u anamnezi, kod treće u 14.tjednu je uz anti-D protutijelo prisutno i anti-C uz prethodna tri poroda u anamnezi. Dakle, kod RhD negativnih trudnica bila su zastupljena RhD protutijela što upućuje da je D antigen najjači imunogen od svih eritrocitnih antigena i da je profilaksa hiperimunim anti-D gamaglobulinom apsolutno opravdana. Jedna RhD negativna trudnica je

imala anti-E u 36. tjednu trudnoće u čijoj anamnezi ne postoje nikakvi imunizacijski događaji, te je tada moguće da se radi o prirodnom anti- E protutijelu. U RhD pozitivnih trudnica, uz navedena prirodna protutijela Le^a, zabilježena su i imuna protutijela iz Rhesus sustava krvnih grupa što upućuje da su iza D i Kell antigena, antigeni iz Rhesus sustava značajni prema navedenom redoslijedu jakosti cECe.

Stopa senzibilizacije nakon svakog poroda ili pobačaja raste na ukupno 15 do 20 % (18). Najvažnija je prevencija RhD imunizacije koja se u Republici Hrvatskoj provodi prema određenim smjernicama: nakon amniocenteze, pobačaja i nakon poroda RhD pozitivnog djeteta. Program imunoprofilakse propisan zakonom doveo je do značajnog smanjenja senzibilizacije RhD negativnih žena, ali to ne sprječava pojavu imunizacija na ostale antigene Rh sustava za koje ne postoji imunoprofilaksa. U Republici Hrvatskoj imunoprofilaksa se provodi dosljedno i potpuno te je stopa pojave senzibilizacije znatno smanjena.

Napredak u dijagnostici te sve veća educiranost trudnica o važnosti provođenja imunohematološkog testiranja uvelike su smanjili perinatalnu smrtnost.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci;

- Od ukupno 3519 testiranih trudnica, njih 19 (0,54%) je razvilo aktivnu imunizaciju i to 52,6% na antigene iz Rh- sustava krvnih grupa i 42,1% na antigene ostalih krvno grupnih sustava, a kod 3 trudnice (0,09 %) otkrivena je pasivna imunizacija jer su tijekom trudnoće primile anti-D zaštitu.
- Prema određenom ABO fenotipu najviše su zastupljene nositeljice krvne grupe O (45,5 %), A (36,4 %), a u jednakom postotku (9 %) su zastupljene trudnice krvne grupe B i AB.
- Senzibilizacija je otkrivena u Rh pozitivnih i Rh negativnih trudnica
- HBN uzrokovana nepodudarnošću majke i djeteta u Rh ili drugim krvno grupnim sustavima, javlja se kao posljedica imunizacije majke eritrocitima fetusa ili transfuzijama krvi, odnosno kada majka nema antigen koji je dijete naslijedilo od oca (D,C,c,E,e, Fy, Jk..)
- Tijekom porođaja majčin organizam može stvoriti veću količinu protutijela koja su potencijalno opasna za sljedeće trudnoće.

7. SAŽETAK

CILJ: Ukazati na važnost redovitog imunohematološkog testiranja trudnica radi praćenja tijeka trudnoće imuniziranih trudnica i prevencije teških oblika hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta.

METODE: Analiza rezultata imunohematološkog testiranja trudnica u četverogodišnjem periodu, od 2012. do 2016. godine u OB „Dr Ivo Pedišić“. ABO i RhD krvne grupe i IAT rađeni su od 2012. do ožujka 2016. godine na analizatoru Wadiana, a od ožujka 2016. g. na poluautomatskom analizatoru Twin Sampler Swing. IAT je rađen u gel tehnologiji u DG Gel Coombs i ID LISS/Coombs mikrokarticama. Određivanje specifičnosti protutijela rađeno je ručno u istoj tehnologiji.

REZULTATI: Od 3519 testiranih trudnica samo 19 (0,54 %) je razvilo aktivnu imunizaciju i to: 10 (52,6 %) na antigene iz Rh sustava krvnih grupa, a u 8 (42,1 %) na antigene ostalih krvnogrupnih sustava. Jedna trudnica imala je prisutno nespecifično hladno protutijelo. Tri trudnice (0,09 %) su primile anti-D zaštitu tijekom trudnoće pa je testiranje otkrilo pasivnu imunizaciju.

ZAKLJUČAK: Učestalost imunizacije trudnica od 0,54 % na analiziranom uzorku ukazuje na uspješno provođenje prenatalne i postnatalne zaštite trudnica. Da bi taj broj bio još manji potrebna je daljnja edukacija trudnica i kolega ginekologa.

KLJUČNE RIJEČI: Imunohematološko testiranje, Rh- imunizacija, hemolitička bolest novorođenčeta

8. SUMMARY

AIM: Is to demonstrate the importance of compulsory testing in immunohematology to follow-up the immunized person's pregnancy, and to prevent severe hemolytic disease of fetus and neonate (HDFN).

METHODS: Analysis of immunohematology testing results during pregnancies in a four-year period from 2012 until 2016 at the General hospital „Dr Ivo Pedišić“. ABO and RhD blood groups, and red blood cell antibody screening (IAT) were performed by analyzer Wadiana in the period from 2012 until March 2016, and afterwards by semi-automated analyzer Twin Sampler Swing. IAT was performed by gel microtyping system using DG Gel Coombs and ID-Card LISS/Coombs microcards. Determination of antibody specificity was performed manually by the same technology.

RESULTS: 19 (0.54 %) pregnant women out of 3519 which were tested, were actively immunized 10 (52.6 %) to Rh antigens, but 8 (42.1 %) to other red cell antigens. One woman had unspecified cold agglutinin during her pregnancy. Three women (0.09 %) received anti-D prophylaxis and we actually found passively administered anti-D antibodies.

CONCLUSION: Immunization rate during the pregnancy of 0.54 % on analyzed data shows the successful antenatal and postnatal measures, including immune anti-D prophylaxis. For continuous improvement there is still some space for education of pregnant women, and our gynecologist colleagues.

KEYWORDS: Immunohematology testing, Rh- immunization, hemolytic disease of fetus and newborn.

9. LITERATURA

1. Grgičević D, Vuk T. Imunohematologija i transfuzijska medicina. Poglavlje 12:97-109 Medicinska naklada Zagreb, 2000.
2. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D. Imunologija. Poglavlje 1:2-17; Medicinska naklada Zagreb, 2010.
3. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D. Imunologija. Poglavlje 3:58-78; Medicinska naklada Zagreb, 2010.
4. Qureshi H, Massey E, Kirwan D, Davies T, Robson S, White J, Jones J, Allard S. BCSH guideline for the use of anti-D immunoglobulin for the prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. Transfusion Medicine. 2014;24:8-20
5. Hundrić Hašpl Ž. Poslijetransfuzijske hemolitičke reakcije. Liječ vjesn 136:supplement 1:149-151; ožujak 2014.
6. Daniels Geoff. Human Blood Groups. Chapter 2:11-95; Wiley-Blackwell Publishing. 2013. Third Edition
7. Daniels Geoff. Human Blood Groups. Chapter 5: 182-258; Wiley-Blackwell Publishing. 2013. Third Edition
8. Daniels Geoff. Human Blood Groups. Chapter 7: 278-305; Wiley-Blackwell Publishing. 2013. Third Edition
9. Daniels Geoff. Human Blood Groups. Chapter 8: 306-324; Wiley-Blackwell Publishing. 2013. Third Edition
10. Daniels Geoff. Human Blood Groups. Chapter 9: 325-335; Wiley-Blackwell Publishing. 2013. Third Edition
11. Daniels Geoff. Human Blood Groups. Chapter 3: 96-161; Wiley-Blackwell Publishing. 2013. Third Edition
12. Daniels Geoff. Human Blood Groups. Chapter 6: 259-277; Wiley-Blackwell Publishing. 2013. Third Edition
13. Matijević R., Knežević M. Novije spoznaje u dijagnostici, liječenju i prevenciji RH imunizacije. Gynaecol Perinatol. 2009;18(2):66-71.

14. The importance of immunohematology testing in the neonatal period, http://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/0025-8105/2013/0025-81051308317B.pdf. Datum pristupa: 5.10.2017.
15. Portal hrvatskog društva za ginekologiju i opstetriciju. Dijagnostika i liječenje Rh Imunizacije. Dostupno na adresi: http://www.hdgo.hr/Pages/Print.aspx?sifra Stranica=865&kultura=hr . Datum pristupa: 8.10.2017.
16. Fung Kee Fung K, Eason E, Crane J, Armson A, De La Ronde S, Farine D. Prevention of Rh alloimmunisation. J Obstet Gynecol Can. 2003;25(9):765-73.
17. Hundrić Hašpl Ž. Poslijetransfuzijske hemolitičke reakcije. Liječ vjesn 136:supplement 1:149-151; ožujak 2014.
18. The Use of Anti- D Immunoglobulin for Rhesus D Prophylaxis, 2011. Green- top Guideline No. 22

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i Prezime: Sanja Dujić

Adresa: Andrije Hebranga 21, 44000 Sisak

Telefon: 0995994718

E-mail: sanjad2@net.hr

Datum rođenja: 20.11.1991.

Mjesto rođenja: Zagreb

OBRAZOVANJE:

2015. – 2018. Medicinski fakultet u Osijeku, diplomski studij medicinsko – laboratorijske dijagnostike

2010. – 2013. Zdravstveno veleučilište u Zagrebu, smjer medicinsko – laboratorijske dijagnostike

2006. – 2010. Srednja škola Viktorovac, medicinska sestra

DODATNA ZNANJA:

Znanje engleskog jezika

Pasivno znanje njemačkog jezika u govoru i pismu

Izvrsno poznavanje rada na računalu

Tečaj iz transfuzijske medicine

Vozačka dozvola B kategorije

HOBI I INTERESI:

2004. – 2010. Član odbojkaškog kluba Sisak