



Središnja medicinska knjižnica

Tomičić, Maja (2011) *Serološke, molekularne i kliničke osobine aloimune neonatalne neutropenije [Serological, molecular and clinical characteristics of alloimmune neonatal neutropenia].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/1000>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Maja Tomičić

**Serološke, molekularne i kliničke
osobine aloimune neonatalne
neutropenije**

DISERTACIJA



Zagreb, 2011.

Disertacija je izrađena u Odsjeku za imunogenetiku trombocita, leukocita i hemostazu i Odjelu za molekularnu imunogenetiku, Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, Odjelu za kliničku transfuziologiju i staničnu terapiju i Centru za tipizaciju tkiva Kliničkog bolničkog centra-Zagreb i Klinici za ginekologiju i porodiljstvo Kliničke bolnice "Sestre Milosrdnice", u Zagrebu.

Voditelj rada: Prof.dr.sc. Vesna Brkljačić-Kerhin

Zahvaljujem mojoj mentorici prof.dr.sc. Vesni Brkljačić-Kerhin, na nesebičnoj pomoći i podršci tijekom izrade rada, koja je svojim velikim znanjem i iskustvom u području serologije HLA sustava usmjerila tijek ispitivanja i doprinijela potvrdi hipoteze ovoga rada.

Prof. dr. sc. Zoranu Pišlu zahvaljujem na velikoj pomoći tijekom statističke obrade podataka.

Najsrdahnije zahvaljujem svim djelatnicima Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i djelatnicima Odjela za nedonoščad Kliničke bolnice „Sestre Milosrdnice“, na svesrdnoj pomoći tijekom izrade ovoga rada.

„Razumijevanje = uspješno predviđanje“, Jeff Hawkins

SADRŽAJ		stranica
1.	UVOD	1-2
1.1.	NEUTROFILNI (GRANULOCITNI) ANTIGENI, ANTI-NEUTROFILNA (ANTI-GRANULOCITNA) PROTUTIJELA I NJIHOVO KLINIČKO ZNAČENJE	3-6
1.2.	HUMANI NEUTROFILNI ANTIGENI (HNA)	7-14
1.3.	HUMANI LEUKOCITNI ANTIGENI RAZREDA I (HLA I)	15-18
1.4.	ANTI-HNA PROTUTIJELA	19-21
1.5.	ANTI- HLA I PROTUTIJELA	22-24
1.6.	PREGLED I PRIMJENA METODA ZA ODREĐIVANJE HNA ANTIGENA I PROTUTIJELA	25-28
1.7.	PREGLED I PRIMJENA METODA ZA ODREĐIVANJE HLA I ANTIGENA I PROTUTIJELA	29-32
1.8.	ALOIMUNA NEONATALNA NEURTOPENIJA (ANN)	33-39
2.	CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA	40-40
3.	MATERIJAL I METODE	41-53
4.	REZULTATI	54-95
5.	RASPRAVA	96-112
6.	ZAKLJUČAK	113-114
7.	SAŽETAK	115-116
8.	SUMMARY	117-118
9.	LITERATURA	119-137
	ŽIVOTOPIS	
	PRILOG 1	
	PRILOG 2	

POPIS KRATICA

ABH- eritrocitni krvno-grupni antigeni

ABN= apsolutni broj neutrofila

AHG-anti-humani globulin

ANN-aloimuna neonatalna neutropenija

APC- antigen prezentirajuće stanice (engl. antigen presentation cells)

CCI- korigirani poslijetransfuzijski porast broja trombocita

(engl. corrected count increment)

CD- diferencijacijski biljeg (engl. cluster of differentiation)

DDK- dobrovoljni davatelj krvi

DIK- diseminirana intravaskularna koagulacija

DNK- deoksiribonukleinska kiselina

EDTA- etilen-diamin-tetra-oktenu kiselina

EIA- enzimsko-imunološka pretraga (engl. enzyme-immuno assay)

GIFT- test imunofluorescencije za anti-granulocita protutijela

GP- glikoproteini

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

FITC- fluoroescin-iso-tio-cijanat (fluorescentna boja)

HLA- ljudski leukocitni antigen (engl. human leukocyte antigen)

HNA ljudski neutrofilni antigen (engl. human neutrophil antigen)

HPA- ljudski trombocitni antigen (engl. human platelet antigen)

IF- imunofluorescencija

IgG,IgA,IgM- imunoglobulini klase G,A i M razreda

KP- križna proba

L-leukociti

LAG-test leukoaglutinacije

LIFT-test imunofluorescencije za anti-limfocitna protutijela

MAINA-test imobilizacije neutrofilnih antigena pomoću monoklonalnih protutijela (engl. monoclonal antibody immobilization of neutrophil antigens)

MLCT- test mikro-limfocitotoksičnosti (engl. micro-lymphocytotoxicity test)

PAK 12- enzimsko-imunološka pretraga za antitrombocitna protutijela
(engl. platelet antigen kit)

PBS- puferirana fiziološka otopina (engl. phosphat buffer saline)

PCR- polimerazna lančana reakcija (engl. polimerase chain reaction)

PCR-SSP-metoda u kojoj se koriste obilježivači specifični za sekvencu
(engl. sequence specific primers)

PCR-RFLP-određivanje polimorfizma pomoću restrikcijskih endonukleaza
(engl. restriction fragment length polymorphism)

RNK- ribonukleinska kiselina

rh G-CSF= rekombinantni humani čimbenik poticanja rasta granulocitnih
kolonija (engl. recombinant human granulocyte-colony stimulating factor)

1. UVOD

Aloimuna neonatalna neutropenija (ANN) rezultat je imunizacije majke na fetalne neutrofilne antigene, tijekom trudnoće. Bolest je analogna hemolitičkoj bolesti novorođenčeta. Pasivni prijelaz majčinih specifičnih neutrofilnih protutijela IgG razreda, putem posteljice u fetalni krvotok, uzrokuje oblaganje fetalnih neutrofila, i može uzrokovati tešku neutropeniju u novorođenčeta, slika A. U teškim oblicima bolesti, praćenim bakterijskim infekcijama i sepsom, bolest može imati i smrtni ishod. (1)

Točna učestalost bolesti nije poznata. Procjenjuje se da je učestalost ANN manje od 1 slučaj na 1000 živorođene djece, a učestalost teških oblika bolesti 1 slučaj na 6000 živorođenih. (2, 3)

Sumnja na ANN postavlja se u slučaju izolirane neutropenije (<1500 neutrofila/mm³) u novorođenčeta. Za konačnu potvrdu dijagnoze ANN potrebno je dokazati anti-neutrofilna aprotutijela u krvi majke usmjerena na specifične neutrofilne antigene na neutrofilima djeteta. (4)

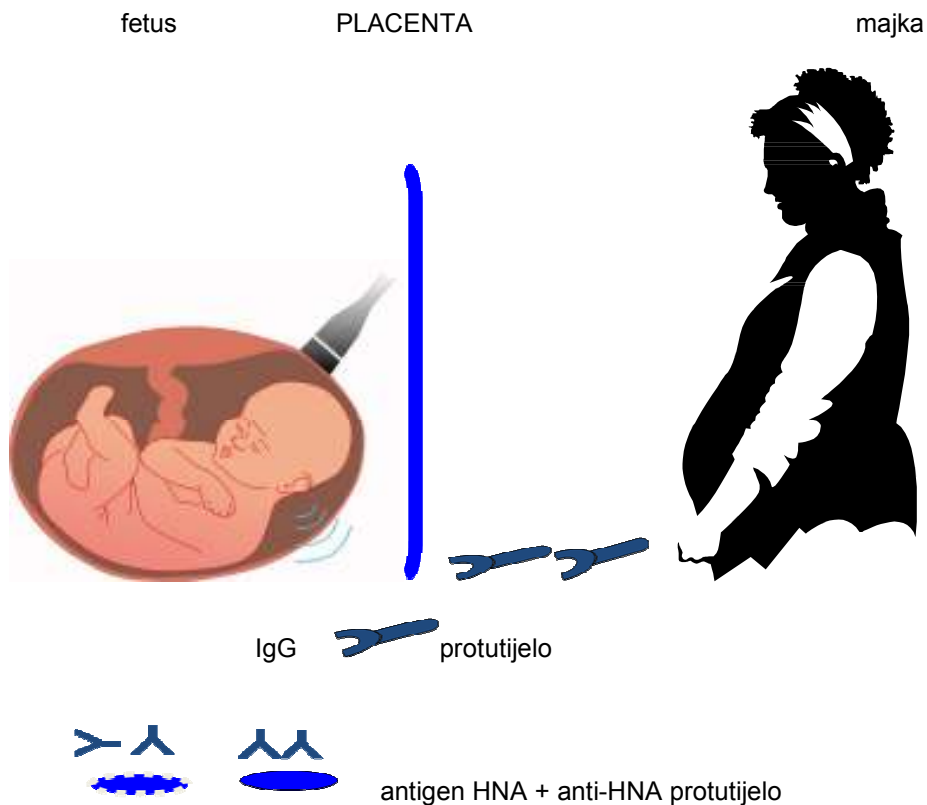
ANN je najčešće uzrokovana aloimunizacijom na specifične humane neutrofilne antigene (human neutrophil antigens, engl.); HNA-1a, HNA-1b i HNA-2a. Anti-HNA-3a i protutijela usmjerena na receptor Fc gama (CD16) rijetko uzrokuju ANN. (5) U oko trećine slučajeva ANN nije moguće odrediti HNA specifičnost protutijela, iako su probirni testovi serološkog ispitivanja za anti-neutrofilna protutijela pozitivni. (5, 6)

U nekim slučajevima u majčinom i djetetovom serumu prisutna su samo anti-leukocitna protutijela razreda I (human leukocyte antigen, engl; HLA), ali njihova uloga u nastanku ANN nije potpuno jasna. (7, 8)

Stoga je u laboratorijskom ispitivanju ANN potrebno primijeniti najosjetljivije i najspecifičnije dostupne testove za anti-neutrofilna i anti-leukocitna protutijela, koji mogu otkriti sva klinički značajna protutijela, te razlučiti anti-HNA od HLA I protutijela. Test križne probe između neutrofila oca/djeteta i seruma majke koristan je u dokazivanju protutijela usmjerenih na rijetke antigene. (9)

Od jednake je važnosti evaluacija kliničkog tijeka bolesti i specifične terapije za povišenje broja neutrofila u krvi djeteta i sprječavanje bakterijskih infekcija. (10)

U Hrvatskoj godišnje bilježimo oko 1-2 zahtjeva za serološkim ispitivanjem aloimune neonatalne neutropenije. Obzirom na oko 45 000 živorođene djece u Hrvatskoj godišnje, uočava se da je učestalost ANN deseterostruko niža od očekivane. Za pretpostaviti je da se serološko ispitivanje ANN provodi samo u teškim oblicima bolesti, dok ostali ostaju ne zamijećeni.



Slika A. Grafički prikaz patomehanizama nastanka aloimune neonatalne neutropenije

1.1. NEUTROFILNI (GRANULOCITNI) ANTIGENI I PROTUTIJELA I NJIHOVO KLINIČKO ZNAČENJE

Još početkom 19. stoljeća opaženo je da serumi politransfundiranih bolesnika, žena nakon trudnoće, bolesnika s neutropenijom i febrilnim poslijetransfuzijskim reakcijama aglutiniraju leukocite drugih osoba. Međutim, tek je 1960. godine Parvis Lalezari opisao prvi slučaj serološki dokazane neonatalne imune neutropenije uzrokovane specifičnim granulocitnim aloprotutijelom. (11) Slijedećih je 15 godina bilo potrebno za uvjerljiv dokaz da je kronična imuna neutropenija uzrokovana specifičnim granulocitnim autoprotutijelima. Studije preživljavanja granulocita obilježenih Indijem-111, McCullougha i suradnika, potvrdile su pretpostavljeni patomehanizam imune neutropenije. (12) 1997. godine van dem Borne i suradnici uvode imunofluorescentni test za antigranulocitna protutijela, što je znatno poboljšalo njihovo otkrivanje. (13)

Prvi neutrofilni (granulocitni) antigen otkrio je Lalezari sa suradnicima 1966. godine i uveo nazivlje za neutrofilne antigene. Neutrofilni antigen označio je s "N", prema neutrofilu. Svaki novi antigeni sistem uz ovu oznaku dobivao je i alfabetsku oznaku prema redoslijedu otkrivanja, a svaki novi alel numeričku oznaku također prema redoslijedu otkrivanja. Naziv prvootkrivenoga antigena bio je NA1. 1971. godine Lalezari i suradnici otkrili su drugi neutrofilni antigen NB1, a 1972. godine NA2 antigen. Navedeni neutrofilni antigeni dobro su istraženi, biokemijski i serološki. Nadalje, još tri neutrofilna antigena djelomično su opisana; 5b, Ond i Mart. Također, pronađena su protutijela usmjerena na još nekoliko neutrofilnih antigena, ali njihova struktura nije potpuno ispitana, a serumi imuniziranih osoba više nisu dostupni što onemogućuje daljnja ispitivanja. (14, 15)

Nova saznanja o biokemijskim i molekularnim osobinama granulocitnih antigena omogućila su razvoj antigen-specifičnih enzimsko-imunoloških testova za određivanje specifičnosti protutijela. Metode temeljene na DNA tehnologiji omogućile su brzo i točno određivanje granulocitnih antigena. Unapređenje granulocitne imunologije i otkrivanje specifičnih granulocitnih protutijela doprinijelo je rasvjetljavanju patofiziologije klinički značajnih sindroma: aloimune neonatalne neutropenije (ANN), transfuzijski posredovane akutne ozljede pluća (TRALI), febrilnih transfuzijskih reakcija, neučinkovitosti granulocitnih transfuzija, aloimune neutropenije nakon transplantacije koštane srži, te primarne i sekundarne autoimune neutropenije. (16)

Na granulocitima se nalaze specifični neutrofilni antigeni (*engl.* human neutrophil antigen- HNA), čija je rasprostranjenost ograničena pretežno na granulocite (neutrofile, eozinofile i bazofile) i antigeni koji se nalaze i na drugim stanicama; humani leukocitni antigeni razreda I (*engl.* human leukocyte antigen- HLA I) i eritrocitni antigeni iz I i P krvno-grupnih sistema. (15) Antigeni ABH i HLA razreda II nisu dokazani na granulocitima. (17, 18)

Iako naziv specifični-neutrofilni antigen ukazuje da se antigen nalazi na neutrofilima, on ne isključuje njihovu pojavu i na drugim stanicama. Kako je određivanje antigena na bazofilima i eozinofilima često otežano zbog malobrojnosti ovih granulocita u krvi, prisutnost većine neutrofilnih antigena na ovim stanicama nije ni testirana. (14)

1998. godine Radna skupina za granulocitnu serologiju Međunarodnog udruženja za transfuziju krvi (*engl.* The Granulocyte Antigen Working Party of International Society of Blood Transfusion, ISBT) sve dobro opisane neutrofilne

antigene uvrstila je u nove HNA sustave, kako bi se ujednačilo označavanje granulocitnih antigena, odnosno antigranulocitnih protutijela. (19)

Nazivlje HNA prema ISBT, iz 1988. godine, prikazano je na tablici A. Ono za razliku od tradicionalnog, osim antigena opisuje i molekule na kojima se nalaze i gene koji kodiraju pojedini alel. Nazivlje je temeljeno na glikoproteinskom smještaju antigena. HNA sustavi označavaju se brojevima, prema vremenskom slijedu otkrivanja, a polimorfizam glikoproteina označava se slovima, (npr. Fc γ Receptor IIIb= HNA-1a, HNA-1b). Aleli genskog lokusa označavaju se prema preporukama "International Workshop on Human Gene Mapping" (npr. HNA-1a - FCGR3*01). (20)

Iako je od 1999. godine u literaturi prihvaćeno HNA nazivlje, i dalje se ujedno koristi i „stari“ naziv granulocitni antigen i anti-granulocitno protutijelo, posebice u povijesnom prikazu otkrivanja antigena i protutijela, te u nazivu seroloških metoda za određivanje granulocitnih antigena i protutijela, koje su uvedene prije 1999. godine. U skladu s preporukom ISBT-a u ovom radu korišteno je HNA nazivlje. Stari nazivi korišteni su samo u slučajevima kada je to bilo neizbježno, kao što je ranije navedeno. (21)

Tablica A. Humani neutrofilni antigeni (HNA) prema International Society of Blood Transfusion, Working Party on Platelet and Granulocyte Serology, 1998. (19)

Antigeni sustav HNA****	Smještaj Glikoprotein (GP) CD****	Antigeni	Genski lokus Aleli	Stari naziv
HNA-1	Fc γ Receptor IIIb CD 16b	HNA-1a HNA-1b HNA-1c	FCGR3*01 FCGR3B*02 FCGR3B*03	NA1 NA2 SH
HNA-2	GP 50 CD 177	HNA-2a	CD177*01	NB1
HNA-3	GP 70-95, CTL2*****	HNA-3a	SLC44A2*****	5b
HNA-4	MAC-1*; CR3** $\alpha_1\beta_2$ -integrin CD11b	HNA-4a	ITGAM*01(230G)	MART
HNA-5	LFA-1***; $\alpha_M\beta$ -integrin CD11a	HNA-5a	ITGAL*01(2372G)	OND

*MAC-1= membrane attack complex ,engl. (membranski lizirajući kompleks sistema komplementa)
 **CR3=C3bi receptor (komponenta sistema komplementa)
 ***LFA-1=leukocyte function antigen-1, engl. (leukocitni antigen)
 ****CD= cluster of differntiation, engl. (diferencijacijski biljeg)
 ****HNA= human neutrophil antigen, engl. (specifični neutrofilni antigen)
 *****CTL2=cholin transporter like protein 2, engl. (protein kolinskog prijenosnika 2)
 *****SLC44A2 prema Curtis BR, Cox NJ, Sullivan MJ, Konkshbaev A, Bowens K, Hansen K, Aster RH. The neutrophil alloantigen HNA-3a (5b) is located on choline transporter-like protein 2 (CTL2) and appears to be encoded by an R>Q154 amino acid substitution. Blood 2010; 115(10): 2073-76.

Tablica je prilagođena prema: Bux J. Human neutrophil alloantigens. Vox Sang, 94;277-285, 2008.

(19)

1.2. HUMANI NEUTROFILNI ANTIGENI (HNA)

HNA-1 SUSTAV

HNA-1 sustav čine aleli HNA-1a, -1b i -1c. Raniji nazivi za HNA-1a i 1b su NA1 i NA2. Treći alel, HNA-1c u starom je nazivlju bio SH. Mali broj osoba na svojim neutrofilima nema ekspresiju antigena HNA-1 i njihov fenotip označava se s HNA-1 null. (22-25)

Antigeni HNA-1 smješteni su na receptoru Fc gama IIIb ($FC\gamma RIIIb$) na neutrofilima, kodiranom od gena $FCGR3B$ na kromosomu 1. $FC\gamma RIIIb$ pripada u imunoglobulinsku superfamiliju i sastoji se od dvije izvan stanične imunoglobulinu G (IgG) slične domene. Gornji membranski dio domene sadrži rezidue ključne za vezanje liganda, dok je uloga donje domene nepoznata. $FC\gamma RIIIb$ pripojen je na granulocitnu membranu preko glikozil-fosfatidil inozitola (GPI) što receptoru daje dobru pokretljivost u vanjskom dijelu fosfolipidnog dvosloja plazmatske membrane. (26). $FCGR3B$ visoko je homologan s drugim genom za Fc gama receptor, $FCGR3A$, međutim proizvod ovoga gena nema ekspresije na neutrofilima. $FC\gamma RIIIb$ nalazi se samo na neutrofilima, s prosječnom brojem kopija od 190000 (od 120000-400000). (14, 15) Monoklonalna protutijela usmjerena na $FC\gamma RIIIb$ jesu CD16b. (22)

Alel HNA-1a, gena za $FCGR3B$, razlikuje se od alela HNA-1b samo u 5 parova baza (bp) kodirajuće regije na mjestima 141, 147, 227, 277 i 349, a označavaju se s $FCGR3B^*1$ odnosno $FCGR3B^*2$. Zamjena četiriju nukleotida uzrokuje zamjenu u slijedu aminokiselina na glikoproteinu na kojemu se nalaze HNA-1a i HNA-1b. Treći alel HNA-1c, ranije je nazivan SH i NF1. Kodirajući gen

za HNA-1c sličan je onome za HNA-1b, a razlikuje se zamjenom C>A na poziciji 266 FCGR3B, koja rezultira A78D zamjenom. Ovaj treći alel označen je kao FCGR3B*3. (27)

Učestalost antigena HNA-1 sustava značajno se razlikuje u različitim populacijama (tablica B). (15) U afričkih crnaca i bijelaca HNA-1b ima višu učestalost od HNA-1a (75-90% odnosno 44-74%). Za razliku od toga, učestalost HNA-1b niža je od učestalosti HNA-1a u Azijata (Kinezi, Japanci i Korejci) i američkih Indijanaca (36-80% odnosno 83-91%). HNA-1c ima najvišu učestalost u populaciji Afrikanaca (20-30%) dok je učestalost u bjelačkoj populaciji niska (5-10%). Nadalje, u populaciji Azijata i američkih Indijanaca (rođenih u Sjevernoj i Južnoj Americi) HNA-1c javlja se samo izuzetno. Fenotip HNA-null rijedak je u Afrikanaca oko 1-2%, vrlo rijedak u bijelaca oko 0.15% i gotovo odsutan u Azijata i američkih Indijanaca. (15, 28)

Tablica B. Učestalost antigena HNA u raznim populacijama (%)

Populacija	HNA-1a	HNA-1b	HNA-1c	HNA-1 null	HNA-2a	HNA-3a	HNA-4a	HNA-5a
Bijelci	57-62	88-89	5	0,15	87-97	89-96	99	86-92
Afrikanci*	44-66	78-84	23-31	4	98	NT	NT	88
Azijati**	88-91	51-54	<1	<1	89-99	NT	NT	81
Američki Indijanci***	83-91	36-80	0-1	<1	NT	NT	>99	79-97

*Afrički i američki crnci
**Kinezi, Japanci, Korejci, Tajvanci

***Sjevernoamerički i južnoamerički Indijanci
NT: nije testirano

Tablica je prilagođena prema: Bux J. Human neutrophil alloantigens. Vox Sang, 94;277-285, 2008. (15)

Funkcija i kliničko značenje:

FC γ RIIIb je receptor slabog afiniteta za IgG1 i IgG3. On se svojom gornjom domenom veže za Fc dio IgG protutijela. Neutrofili u stanju mirovanja primarno koriste FC γ RIIIb za vezanje imunih kompleksa i njihovo uklanjanje iz krvotoka. Ovaj receptor pospješuje fagocitozu opsoniziranih mikroorganizama. (22)

FC γ RIIIb je klinički najznačajniji imunogeni glikoprotein na neutrofilnoj membrani. 30 % granulocitnih autoprotutijela usmjereno je na epitope FC γ RIIIb, najčešće na HNA-1a. Početni poticaj za nastanak antineutrofilnih protutijela u autoimunoj neutropeniji nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavlja se da se radi o neočekivanom imunološkom odgovoru na infekcije. Oslobođeni citokini pojačavaju ekspresiju FC γ RIIIb receptora na neutrofilima i njegovu sekreciju. Na taj način oslobođeni topivi receptor FC γ RIIIb služi kao ligand te modulira limfocitnu proizvodnju IgG protutijela. (26, 29) Mali broj osoba nema ekspresiju receptora FC γ RIIIb na neutrofilima zbog nedostatka gena FCGR3B (HNA-1-null fenotip). Većina ovih osoba ne pati od pojačane sklonosti bakterijskim infekcijama, autoimunim ili bolestima imunih kompleksa. (6) Tijekom trudnoće majka može stvoriti aloprotutijela usmjerena na FC γ RIIIb, koja mogu uzrokovati neonatalnu neutropeniju. (22-25)

HNA-2 SUSTAV

HNA-2 sustav čini samo jedan antigen; HNA-2a. Raniji naziv za HNA-2a bio je NB1. (30)

HNA-2a je glikoprotein relativne molekularne mase od 56 do 64 kDa, koji je preko GPI učvršćen za staničnu membranu. Ovaj glikoprotein sastoji se od dvije cisteinom bogate domene i tri N-vezna glikolizacijska mjesta. Monoklonalna protutijela usmjerena na HNA-2a antigen jesu CD177. (31)

HNA-2a nalazi se isključivo na granulocitima i to na plazmatskoj membrani i membranama sekundarnih granula i sekretornih vezikula. Posebnost za ovaj antigen je njegova heterogena ekspresija na stanicama iste osobe, jer se na jednoj subpopulaciji stanica nalaze HNA-2a antigeni, a na ostalima ne. Ekspresija antigena HNA-2a može biti od 0-100%, prosječno 63% u žena i 53% u muškaraca. Ona se smanjuje sa starenjem u žena, dok u muškaraca ostaje ista, što se može povezati s učinkom estrogena. Ovaj nalaz slaže se s nalazom pojačane ekspresije HNA-2a u trudnoći. (14, 15, 22)

Gen koji kodira HNA-2a nalazi na kromosomu 19q13.2. c-DNA HNA-2a gena sastoji se od 1311 pb, koji kodiraju 437 aminokiselina, uključujući i jedan peptid sastavljen od 21 aminokiseline. HNA-2a null fenotip rezultat je netočnog cijepanja (*engl.* splicing), koje dovodi do nastajanja mRNA sa stopnim kodonom u sekvenci introna. (32)

HNA-2a je antigen visoke učestalosti u populaciji Europljana, Sjeverno-Amerikanaca i Brazilaca (97%), kao i Japanaca (89-99,5%), podaci su prikazani na tablici B. (22, 28)

Funkcija i kliničko značenje:

HNA-2a (CD 177) sudjeluje u adheziji neutrofila za endotelne stanice i njihovom kretanju uzduž endotela, uzrokovanim međudjelovanjem neutrofila i heterofilne domene PECAM (CD31). Povišena količina HNA-2a opažena je bolesnika s bakterijskim infekcijama, mijeloproliferativnim bolestima i davatelja hematopoeznih matičnih stanica stimuliranih faktorom rasta granulocitnih kolonija.

(31)

Aloprotutijela koja nastaju u HNA-2a negativnih osoba mogu uzrokovati aloimunu neonatalnu neutropeniju, transfuzijom posredovanu akutnu ozljedu pluća (TRALI, *engl.* Transfusion Related Acute Lung Injury), autoimunu neutropeniju izazvanu lijekovima i odbacivanje presatka koštane srži. (16)

HNA-3 SUSTAV

Antigen HNA-3a, ranijeg naziva 5b, nalazi na proteinu relativne molekularne mase 70 do 95 kDa. Za razliku od HNA-1 i -2 nije vezan za plazmatsku membranu preko GPI sidra. HNA-3 nalazi se na neutrofilima i limfocitima, dok na trombocitima nije dokazan. (33)

Primarna struktura HNA-3a/b bila je nepoznata sve do nedavno, kada su Curtis i suradnici krajem 2009. godine dokazali da HNA-3a/b fenotip nastaje kao posljedica polimorfizma jednog nukleotida u eksonu 7, gena za kolinski prijenosnik SLC442A (CTL2, *engl.* Cholin Transporter Protein 2).(34) On je uzrokom zamjene aminokiseline u prvoj izvanstaničnoj petlji CTL2 membranskog glikoproteina. HNA-3a fenotip povezan je s R154, a HNA-3b s Q154. (34) Ovaj nalaz potvrdili su Greinacher i suradnici početkom 2010. godine. (35) Molekularna identifikacija

antigena HNA-3 omogućit će razvoj praktičnih metoda za određivanje antigena HNA-3 u bliskoj budućnosti.

HNA-3a je antigen visoke učestalosti u populaciji Europljana (89-99%). (22, 27)

Funkcija i kliničko značenje:

Funkcija antigena HNA-3 nije poznata. Anti- HNA-3a aloprotutijela rijetko uzrokuju febrilne poslijetransfuzijske reakcije i aloimunu neonatalnu neutropeniju, ali su vrlo često uzrokom teških oblika TRALI, koji zahtijevaju intenzivno liječenje mehaničkom ventilacijom pluća, a mogu imati i smrtni ishod. Pasivni prijenos protutijela u plazmi krvnog pripravka u krvotok bolesnika, uzrokuje oblaganje i aktivaciju neutrofila u mikrocirkulaciji pluća (oslobađanje radikala kisika, medijatora, upalnih citokina) i posljedično tome akutnog oštećenja respiratorne funkcije. Težini reakcije znatno doprinosi i leukoaglutinirajuća sposobnost anti-HNA-3a protutijela. (36)

HNA-4 SUSTAV

HNA-4 sustav čini jedan antigen; HNA-4a, ranijeg naziva Mart. Nalazi se na alfa M beta2 podjedinici (α M β 2, CD11b/18) leukocitne familije integrina, odnosno na receptoru za C3bi komponentu komplementa (CR3). (15) Antigen HNA-4a nalazimo na neutrofilima, monocitima i NK (natural killer, engl.) stanicama.

Frekvencija antigena HNA-4a u bijelaca je >90%. (37)

Antigen HNA-4a rezultat je zamjene jednog nukleotida (A>G) na poziciji 230 kodirajuće sekvence za α M (CD11b) podjedinicu, što uzrokuje zamjenu histidina s argininom na poziciji 61 peptidnog lanca. (38, 39)

Funkcija i kliničko značenje:

Antigen HNA-4a ima značajnu ulogu u adheziji leukocita na endotelne stanice i trombocite, a također i u fagocitozi. Nije poznato utječe li CD11b/18 polimorfizam na funkciju stanica. Anti-HNA-4a protutijela mogu uzrokovati autoimunu i aloimunu neutropeniju. Opaženo je da anti-HNA-4a aloprotutijela koja uzrokuju neonatalnu neutropeniju i autoprotutijela usmjerena na kompleks CD11b/18 ujedno interferiraju s adhezijom neutrofila. Za razliku od toga aloprotutijela koja ne uzrokuju neutropeniju nemaju učinka na adhezijsku funkciju neutrofila. (22, 40)

Nadalje, opisana su dva tipa anti-HNA-4a aloprotutijela koja se razlikuju u sposobnosti neutrofila u pospješivanju respiratornog izgaranja. (15)

HNA-5 SUSTAV

HNA-5 sustav čini jedan antigen; HNA-5a, ranijeg naziva OND. Nalazi se na alfa L podjedinici beta2 integrina leukocitnog funkcijskog antigena-1 (α L β 2 LFA-1, CD11a/18). Nalazi se granulocitima, limfocitima i monocitima. (22)

Učestalost antigena HNA-5a je 92% prema rezultatima serološkog određivanja antigena. Međutim, rezultati HNA-5a genotipizacije ukazuju na učestalost od 79 do 88% (tablica 2.) Razlog ovakvom nalazu mogla bi biti prisutnost različitih antileukocitnih protutijela u poliklonalnom humanom Ond serumu s kojim je učinjena fenotipizacija. (15, 38)

Antigen HNA-5a rezultat je zamjene jednog nukleotida (C>G) na poziciji 237 kodirajuće sekvence za CD11a, što uzrokuje zamjenu treonina s argininom na poziciji 766 peptidnog lanca. (38, 39)

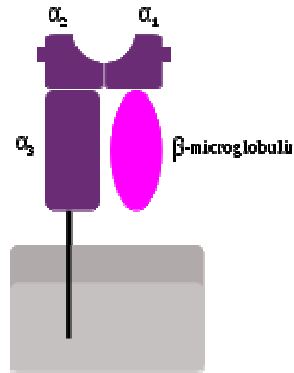
Funkcija i kliničko značenje:

CD 11a/18 kompleks ima ekspresiju na svim leukocitima i ima ulogu leukocitne adhezijske molekule. Nije poznato ima li HNA-5a polimorfizam učinka na funkciju ovog neutrofilnog integrina. Do sada nisu opisana anti-HNA-5a kao uzrok imune neutropenije. Anti-HNA-5a aloprotutijela dokazana su u bolesnika s aplastičnom anemijom, politransfundiranog eritrocitnim i trombocitnim krvnim pripravcima, u kojeg je opaženo dugotrajno preživljavanje kožnog presatka HLA neidentičnog davatelja. Ono bi se moglo objasniti prisutnošću anti-HNA-5a protutijela u serumu bolesnika koja su mogla spriječiti leukocitne interrekcije u presatku. (15, 41)

1.3. HUMANI LEUKOCITNI ANTIGENI RAZREDA I (HLA I)

Glavni sustav tkivne snošljivosti (engl, major histocompatibility complex-MHC) ili sustav HLA (engl, human leucocyte antigens), nalazi se na kraćen kraku kromosoma 6 i obuhvaća skupinu usko vezanih gena. On obuhvaća približno 4 milijuna parova baza i dijeli se u tri regije (razreda). Antigeni HLA razreda I jesu: klasični geni (HLA-A, HLA-B i HLA-Cw), neklasični geni HLA (HLA-E, HLA-F i HLA-G) i pseudogeni ili dijelovi gena (HLA-S/17, HLA-X, HLAN/30 i drugi). Geni HLA u cis-položaju na kromosomu 6 tvore haplotip i nasljeđuju se u bloku, što je posljedica vrlo male udaljenosti između pojedinih lokusa HLA, i sukladno tomu, izuzetno rijetke pojave zamjene genetičkog materijala (engl. crossing over) između njih. (42, 43)

Molekula HLA razreda I građena je od dvaju glikoproteinskih lanaca, međusobno povezanih nekovalentnim vezama. Teški lanac (α -lanac), molekularne mase od približno 24 kD, kodiran je genima HLA razreda I (HLA-A, HLA-B, HLA-Cw) i prolazi kroz staničnu membranu. Nasuprot tomu, laki lanac (β_2 -mikroglobulin), molekularne mase od približno 12 kD, nije kodiran HLA genima, nego genom na kromosomu 15 i ne prolazi kroz staničnu membranu. Izvanstanični dio teškog lanca ima tri domene koje su kodirane egzomima 2, 3 i 4 gena HLA razreda I, transmembranski dio molekule kodira egzon 5, dok su za citoplazmatski dio odgovorni egzoni 6 i 7. Preostala dva egzona gena HLA razreda I kodiraju vodeću sekvencu (egzon 1) i stopni kodon (egzon 8). Izvanstanične domene (α_1 i α_2) teškog lanca tvore bočne strane tzv. pukotine u koje se vežu peptidi, dijelovi stranih antigena, a dno pukotine ograđuju α_3 domena i β_2 -mikroglobulin, slika B. (15)



Slika B. Grafički prikaz građe molekule HLA I (15)

Antigeni HLA razreda I (HLA I) nalaze se na membranama stanica s jezgrom, ali ne s jednakom zastupljenošću na pojedinim stanicama. Koncentracija antigena HLA na staničnim membranama ovisi o ulozi tih stanica, tako je ona veća na limfocitima nego na neutrofilima. Također nije podjednaka zastupljenost pojedinih antigena različitih lokusa HLA na staničnim membranama. Poznato je primjerice, da je koncentracija antigena HLA-Cw na staničnim membranama desetak puta manja nego zastupljenost HLA-A ili HLA-B, slika C. (42, 43)

Antigeni HLA I nalaze se i na trombocitima, pretežno HLA-A i HLA-B, dok je HLA-Cw slabo izražen. Na eritrocitima se nalaze HLA-B7, HLA-B17 (B57 ili B58) i HLA-A28 (A68 ili A69), koji su ranije nazivani Bg^a , Bg^b , Bg^c , (Bennett-Goodspeed-Bg). (43)

Za razliku od navedenih klasičnih antigena HLA razreda I, koji su široko rasprostranjeni na somatskim stanicama, neklasični antigeni HLA razreda I (HLA-E, HLA-F i HLA-G) imaju slabiju i ograničenu ekspresiju i još uvijek nejasnu ulogu. Prisutnost HLA-G na stanicama ekstraviloznog citotrofoblasta ljudske placente, već u početku gestacije, može ukazivati na njegovu ulogu u mehanizmu majčinog prihvatanja fetalnog alografta. (44)

Kombinacija velikog broja lokusa HLA i velikog broja različitih alela na njima, čini sustav HLA najpolimorfnijim genskim sustavom u čovjeka. Do lipnja 2010. godine, ukupan broj alela HLA razreda I bio je 3411. Najpolimorfniji je lokus *HLA-B* s 1605 alela, zatim lokus *HLA-A* s 1001 alela i lokus *HLA-C* s 690 alela. (45) Upravo radi toga je Međunarodno udruženje za HLA nazivlje, pod pokroviteljstvom Svjetske zdravstvene organizacije (engl, Nomenclature Committee for factors of the HLA system, World Health Organization-WHO NC) prvi put je uspostavilo nazivlje HLA sistema još 1968. godine . (43, 46)

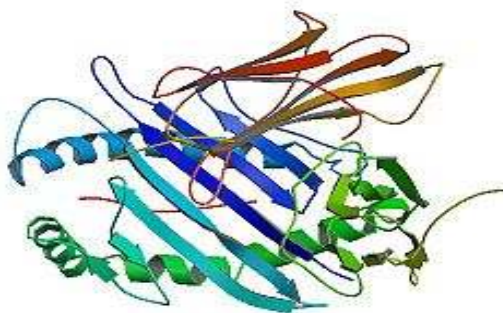
Nazivlje se redovito dopunjuje i opće je prihvaćeno. Ono obuhvaća; HLA lokus, serološku specifičnost i molekularno tipiranje alela. Antigeni HLA označeni su velikim slovom i brojem koji označava pojedini niz alela (npr. HLA-A1, HLA-B8). Aleli su označeni kosim slovom i zvjezdicom, a sadrže kod od četiri do osam znamenki, ovisno o grupi alela i sekvenci gena. Prve dvije znamenke označavaju grupu alela. Treća i četvrta označavaju razliku u sekvenci DNK, koja uzrokuje razliku u sekvenci aminokiselina u proteinu. Peta i šesta znamenka označavaju razliku u sekvenci gena koja nema za posljedicu promjenu u slijedu aminokiselina u proteinu. Sedma i osma znamenka označavaju razliku u sekvenci unutar introna koji se ne prepisuje. Npr. *B*2704*, označava HLA-B lokus, serološke specifičnosti B27, i četvrti alel opisan u toj familiji. (47)

Kako svakodnevno raste broj novootkrivenih alela, radi sve češće primjene molekularnih metoda za određivanje alela HLA, Međunarodno udruženje za HLA nazivlje ima značajnu ulogu u stalnom stručnom nadzoru nad primjenom nazivlja. Ono je zaduženo za uvrštavanje novih alela, sustavno i redovito obnavljane liste antigena, prema redoslijedu njihova otkrivanja i donošenje preporuka za uporabu nazivlja. Podaci su dostupni na web stanicama. (46) Prema novim preporukama

WHO NC, prihvaćenim u siječnju 2010. godine, između para znamenki za alel dodaje se oznaka (:), kako bi se polja odvojila, npr. *A*01010101* postaje *A*01:01:01:01*. Nadalje, ukida se oznaka „w“ za *HLA-C* alele, ali *Cw* ostaje oznaka za antigene, kako bi se izbjegla zamjena sa čimbenicima komplementa označeni s C1-C9 (npr. *Cw*0103* potaje *C*01:03*). Također, oznaka „Q“ (*engl.* Questionable) dodaje se na kraju oznake para znamenki za alel, kako bi se označilo da je ekspresija tog alela upitna, npr. *A*23:19Q*. (46)

Funkcija i kliničko značenje:

Glavna uloga antigena HLA I jest u imunološkom prepoznavanju stranih antigena koji dopijevaju u naš organizam i poticanje imunološke reakcije za njihovo odbacivanje, kao i u razlikovanju vlastitih stanica od tuđih. Molekule HLA I predočuju unutarstanične antigene (npr. viruse) citotoksičnim T limfocitima. Analiza gena sustava HLA primjenjuje se u transplantacijskoj imunologiji, populacijskim istraživanjima, sudskoj medicini (identifikacija osoba i slučajevi spornog očinstva), u transfuzijskom liječenju bolesnika refraktornih na transfuzije trombocita i dijagnostičkom postupku procjene relativnog rizika za nastanak autoimunih, reumatskih, upalnih i drugih bolesti. (42-43, 48-49)



Slika C. Grafički prikaz 3D strukture molekule antigena HLA-A2 (www.ndm.ox.ac.uk/principal-investigator)

1.4. ANTI-HNA PROTUTIJELA

Anti-neutrofilna protutijela mogu biti autoprotutijela, aloprotutijela i izoprotutijela. Autoprotutijela su usmjerena na neutrofilne antigene na vlastitim stanicama bolesnika. Ona mogu uzrokovati primarnu i sekundarnu autoimunu neutropeniju, te neutropeniju posredovanu lijekovima. (50, 51) Autoprotutijela u bolesnika s autoimunom idiopatskom neutropenijom (AIN) mogu se dokazati u većine bolesnika, 74-100%. (52) U oko 35% slučajeva autoprotutijela su usmjerena na antigene HNA-1. (52) AIN je rijetka u novorođenačkoj dobi. Najmlađi opisani slučaj imao je 3 tjedna. (53) McCullough i suradnici opisali su dva slučaja kongenitalne AIN, što dokazuje da se AIN može javiti već u prijenatalnom razdoblju. (54)

Sekundarna autoimuna neutropenija javlja se uz druge autoimune bolesti (Evansov sindrom, sistemski lupus eritematosus i druge), tijekom virusnih infekcija (Epstein-Barr virus, respiratorni sincicijalni virus, virus influence A i B, viruse hepatitisa, parvovirus B19 i drugi), te bakterijski uzrokovanoj sepsi. U neutropeniji izazvanoj lijekovima (antibiotici, protuupalni lijekovi, antikonvulzivni i drugi) lijek služi kao haptent i potiče stvaranje autoprotutijela. (51, 52)

Aloprotutijela nastaju nakon izlaganja stranim neutrofilnim aloantigenima, koji se ne nalaze na vlastitim stanicama. Aloimunizacija na antigene HNA može nastati tijekom trudnoće, nakon transfuzija krvi i krvnih pripravaka, te nakon transplantacije tkiva i organa i uzrokovati aloimunu neonatalnu neutropeniju (ANN), transfuzijski uzrokovanu akutnu ozljedu pluća (engl. transfusion related lung injury-TRALI), febrilne poslijetransfuzijske reakcije, neučinkovitost

granulocitnih transfuzija i aloimunu neutropeniju nakon transplantacije koštane srži . (55-56)

Specifičnost anti-HNA aloprotutijela najčešće je usmjerena na HNA-1a, HNA-1b, HNA-2a i HNA-3a, dok se anti-HNA-4a i HNA-5a nalaze samo izuzetno. (57, 58)

Anti-HNA-2a protutijela dokazana su u plazmi bolesnika nakon transplantacije koštane srži i posljedica su sindroma putujućih limfocita. Limfociti s pamćenjem prisutni u presatku nastavljaju proizvoditi anti-neutrofilna protutijela i uzrokuju neutropeniju rezistentnu na terapiju granulocitnim faktorom rasta. (59)

Anti-HNA-3a i anti-HNA-2a aloprotutijela najznačajnija su u patogenezi imunološki izazvanog akutnog oštećenja pluća (TRALI). Ova protutijela nakon vezanja za neutrofilne antigene u mikrocirkulaciji pluća uzrokuju njihovu aglutinaciju, zatim degranulaciju i oslobađanje sadržaja granula i citokina, te poticanje upalnog imunološkog odgovora, što uzrokuje akutni respiratorni distress sindrom. Reakcija može imati i smrtni ishod. (60) TRALI se obično javlja nakon transfuzije krvnih pripravaka koji sadrže više od 50 ml plazme. Najčešće je uzrokovan anti-neutrofilnim protutijelima pasivno transfundiranim bolesniku s krvnim pripravkom. U rijetkim slučajevima TRALI mogu uzrokovati bolesnikova aloprotutijela (oko 6% slučajeva), međutim njihova je uloga upitna, obzirom na mali broj stranih antigena prisutnih na neutrofilima u krvnom pripravku, osobito u pripravcima sa smanjenim brojem leukocita. (61) Izuzetno rijetko TRALI nastaje zbog nepodudarnosti neutrofilnih antigena i protutijela između davatelja, ukoliko se transfundira nekoliko pripravaka istodobno. (61).

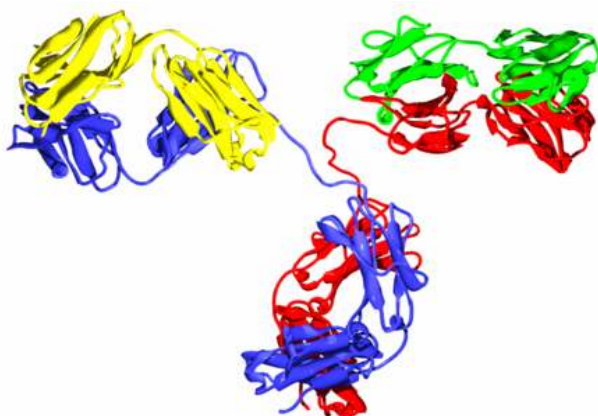
Rijetki uzrok izoimune neutropenije su izoprotutijela usmjerena na receptor Fc gama III (CD16), nastala u osoba na čijim granulocitima nedostaje Fc γ R III (NA-null fenotip). (43)

Strauss i suradnici dokazali su prisutnost anti-HNA i anti-HLA I protutijela u 13% (4 od 30%) višekratno transfundirane novorođenčadi. U 3 novorođenčeta dokazana su anti-HLA I, a u 1 anti-HNA protutijela, što ukazuje da je novorođenče sposobno stvoriti aloprotutijela na neutrofilne i antigene HLA. (62)

Učestalost anti-HNA protutijela u osoba koje nisu bile izložene stranim aloantigenima HNA vrlo je mala, 0,1%. (63)

1.5. ANTI-HLA I PROTUTIJELA

Anti- HLA I protutijela nastaju imunizacijom na tuđe antigene HLA. Ona mogu nastati u trudnoći, nakon transfuzije ili nakon presadbe tkiva i organa. Protutijela HLA I najčešće pripadaju IgG imunoglobulinima i aktiviraju komplement, ali ima i protutijela koja pripadaju razredu IgM imunoglobulina, slika D. (42) Protutijela anti-HLA I koja nastaju tijekom trudnoće imunološki su odgovor na strane antigene HLA I djeteta, naslijeđene od oca, u pravilu ne oštećuju plod. Uloga anti-HLA protutijela u nastanku neonatalne neutropenije i trombocitopenije još uvijek nije razjašnjena, iako je dokazan transplacentarni prijelaz ovih protutijela. (64, 65) Pojedinačni opisani slučajevi u kojima su dokazana samo anti-HLA I protutijela govore u prilog tvrdnji da anti-HLA I protutijela sama mogu uzrokovati neonatalnu neutropeniju i trombocitopeniju. (66) Postavlja se međutim pitanje niske učestalosti neonatalne neutropenije i trombocitopenije, obzirom da se anti-HLA protutijela mogu dokazati u 1,7-33,2% trudnica, bez učinka na razvoj bolesti. (65, 67)



Slika D. Grafički prikaz 3D strukture molekule imunoglobulina G1 (www.ks.uiuc.edu/Research/smd_imd/titiu/)

Anti-HLA I protutijela (najčešće anti-HLA-A2) mogu uzrokovati poslijetransfuzijske reakcije: TRALI i febrilne poslijetransfuzijske reakcije. (61) One se javljaju u tijeku ili 2 do 6 sati nakon ABO podudarne, ali HLA nepodudarne transfuziju pune krvi, plazme, trombocita, eritrocita ili leukocita. Anti-HLA I protutijela i imunološki posredovana neučinkovitost trombocitnih transfuzija (refraktornost) nastaju u 20-71% bolesnika višekratno liječenih transfuzijama staničnih krvnih pripravaka. (43, 63) Primarna HLA aloimunizacija najčešće nastaje nakon trombocitnih transfuzija, iako se na njima nalaze samo antigeni HLA I. Aloimunizacija je posljedica transfuzija davateljevih leukocita na kojima se nalaze antigeni i HLA I i HLA II, nužni za aloimunizaciju. Sprječavanje nastanka anti-HLA I protutijela uspješno se provodi smanjivanjem broja leukocita u staničnim krvnim pripravcima (leukofiltracija, UV-zračenje). Pristup transfuzijskom liječenju bolesnika koji su prije transplantacije već bili imunizirani, treba biti restriktivan, kako bi se smanjilo izlaganje stranim aloantigenima HLA i anamnestički imuni odgovor. (43, 68)

Bolesnici koji su primili presadak tkiva ili organa također imunološki reagiraju stvaranjem HLA I protutijela, što može bitno otežati njihovo daljnje liječenje. (68-71) U prospektivnim studijama dokazano je da 44% bolesnika nakon transplantacije koštane srži ili matičnih stanica stvara anti-HLA protutijela. (69) Pozitivna križna reakcija (engl. cross match), ukoliko su u serumu primatelja prisutna anti-HLA protutijela koja reagiraju s HLA antigenima davatelja presatka, umnogome otežava odabir organa u bolesnika predviđenih za transplantaciju bubrega. (43)

Studija Bedford-Russelove i suradnika u kojoj je prospektivno praćen nastanak anti HLA I protutijela nakon eritrocitnih transfuzija u 42 prijevremeno

rođene djece, pokazala je da je neonatus sposoban imunološki odgovoriti stvaranjem protutijela na antigene HLA I. Za razliku od ranijih studija u kojima protutijela nisu dokazana, u navedenoj studiji anti-HLA I protutijela dokazana su u 7 od 23 neonatusa koji su primali nefiltrirane eritrocitne krvne pripravke. U skupini neonatusa koja je primala eritrocitne krvne pripravke sa smanjenim brojem leukocita (filtrirane) niti jedno od 19 nije stvorilo anti-HLA I protutijela. (72)

U studiji Trilutzija i suradnika, prevalencija anti-HLA protutijela u muških netransfundiranih davatelja krvi bila je 1,0%, a u transfundiranih 1,7%. Anti HLA protutijela dokazana su u 17,3% žena davateljica krvi. Prevalencija anti-HLA protutijela značajno je rasla s brojem prethodnih trudnoća (1,7% s 0 trudnoća, 11,2% s jednom, 22,5% dvije, 27,5% tri i 32,2% s 4 i više trudnoća). Podaci o prevalenciji HLA protutijela u davatelja krvi važni su u procjeni rizika imunološki uzrokovanog TRALI i odluci o uvođenju mjera za njegovo sprječavanje. (67)

1.6. PREGLED I PRIMJENA METODA ZA ODREĐIVANJE HNA ANTIGENA I PROTUTIJELA

Neutrofilni antigeni i aleli određuju se serološkim i molekularnim metodama. Serološke metode temelje se na principu indirektnog antiglobulinskog testa, uz uporabu specifičnih poliklonalnih ili monoklonalnih protutijela. Najčešće se primjenjuje imunofluorecentna metoda (engl. immunofluorescence test, IF) i enzimsko-imunološka metoda uz imobilizaciju neutrofilnih antigena pomoću monoklonalnih protutijela (engl. monoclonal immobilization of neutrophil antigens-enzyme immuno assay, MAINA-EIA). (73-75)

Neutrofilni antigeni s poznatom primarnom strukturom; HNA 1a, -1b i 1c, -4a i 5a, određuju se molekularnim metodama, najčešće lančanom reakcijom polimeraze sa začetnicima specifičnim za sekvencu (engl. polymerase chain reaction- sequence specific primers, PCR-SSP) i lančanom reakcijom polimeraze s restrikcijским enzimima (engl. polymerase chain reaction-restriction length polymorphism PCR-RFLP). (80-81)

Prednosti molekularnih metoda u odnosu na serološko određivanje antigena su brojne. One omogućuju točnije određivanje neutrofilnih antigena u velikog broja ispitanika iz male količine uzorka krvi (1-2 ml) potrebnog za izolaciju DNA. Molekularno ispitivanje nije ograničeno dostupnošću specifičnih poliklonalnih anti-seruma imuniziranih bolesnika ili davatelja, odnosno monoklonalnih protutijela, koji se koriste u serološkim metodama. (82, 83) Test se može učiniti i u teškoj neutropeniji, za razliku od seroloških metoda kada broj izoliranih stanica obično nije dostatan za analizu. Nadalje, molekularno ispitivanje može se učiniti iz pohranjenih uzoraka, dok je za serološko ispitivanje potreban

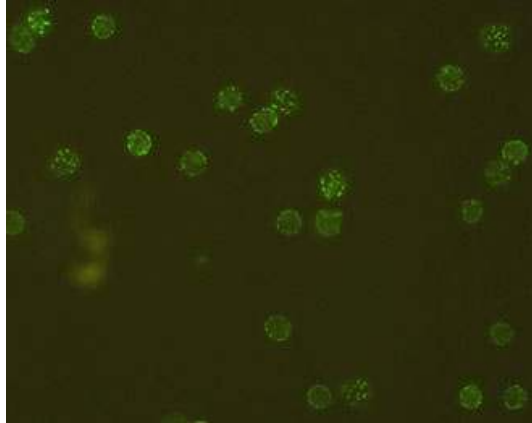
uzorak krvi starosti do 24 sata od trenutka vađenja krvi. To je od osobite važnosti za laboratorijsko ispitivanje ANN. (76-82)

Većina antineutrofilnih aloprotutijela otkrivena je metodom leukoaglutinacije (LAG), kojom se dokazuje IgM i IgG razred protutijela, slika E. Metodu je uveo Lalezari 1960. godine, a kasnije je modificirana u mikro-leukoaglutinacijski test u mikrotitarskim pločama. (11)



Slika E. Slika pozitivnog rezultata testa leukoaglutinacije, svjetlosna mikroskopija, Odsjek za imunogenetiku trombocita, leukocita i hemostazu, HZTM

Druga skupina metoda temelji se na prilagođenom antiglobulinskom testu, u kojima je antihumani globulin (AHG) obilježen fluorescentnom bojom, enzimom, radioaktivnim materijalom ili drugim biljegom). Najčešće se primjenjuje mikroimunofluorescentni test za antigranulocitna protutijela (GIFT), uz uporabu AHG obilježenog fluorescentnom bojom. Test se izvodi kao direktni, kojim se dokazuju antigranulocitna protutijela vezana na granulocite ispitanika i indirektni test kojim se dokazuju slobodna antigranulocitna protutijela u plazmi ispitanika. Rezultat reakcije analizira se uz pomoć mikroskopa s fluorescentnim izvorom svjetla ili protočnom citometrijom. Ovim testom dokazuju se protutijela IgG i IgM razreda, slika F. (84, 85)



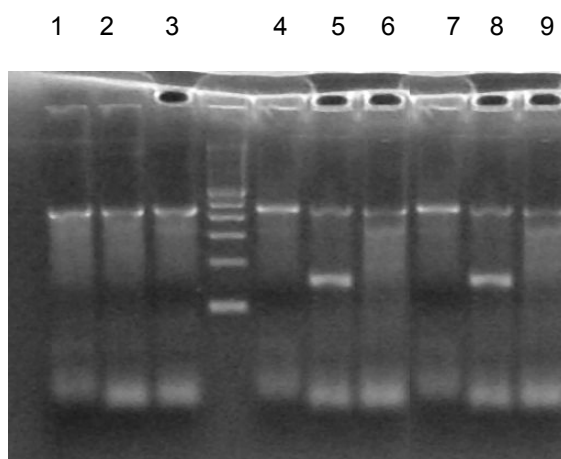
Slika F. Slika pozitivnog rezultata testa imunofluorescencije za antigranulocitna protutijela, fluorescentna mikroskopija, Odsjek za imunogenetiku trombocita, leukocita i hemostazu, HZTM

Trećom skupinom metoda određuje se specifičnost antigranulocitnih protutijela. Najčešće se primjenjuju MAINA-EIA i imunoblot test. MAINA je enzimsko-imunološki test kojim se pomoću monoklonalnih protutijela i HNA tipiziranih testnih granulocita određuje specifičnost antigranulocitnih protutijela i razlučuje istovremena prisutnost HLA I protutijela. (86)

U laboratorijskom ispitivanju primarne i sekundarne autoimune neutropenije (AIN) najčešće se primjenjuju direktni i indirektni imunofluorescentni test. U slučaju kada je potrebno odrediti specifičnost antineutrofilnih protutijela najčešće se koristi MAINA test. U cikličkoj neutropeniji test treba ponavljati nekoliko puta u razmacima od 2-4 tjedna. Sekundarna AIN često se nalazi u autoimunih bolesti (sistemski lupus erythematosus, Evansov sindrom, Sjögrenov sindrom, primarnu bilijarnu cirozu, Gravesovu bolest), te limfoproliferativne bolesti (Hodgkinov limfom, T- γ limfocitozu). Lijekovima potaknuta neutropenija najčešće se javlja tijekom liječenja antibioticima (penicilin, cefalosporini), analgeticima (metamizol), antiaritmecima (prokainamid, kinidin), antimalaricima (kinin). Serološko ispitivanje

AIN uzrokovano lijekovima treba provesti uz dodatak lijeka, jer su inače rezultati ispitivanja negativni. (50-55)

Laboratorijsko ispitivanje aloimune neonatalne neutropenije (ANN) obuhvaća ispitivanje seruma i neutrofila majke i novorođenčeta na prisutnost antigranulocitnih protutijela IgG razreda. Najčešće se primjenjuje imunofluorescentni test za antigranulocitna protutijela (GIFT-direktni i indirektni), test leukoaglutinacije (LAG) za probirno ispitivanje, te MAINA i imunoblot za određivanje specifičnosti antigranulocitnih protutijela. Ukoliko je probirno ispitivanje pozitivno, a najosjetljivijim metodama nije moguće dokazati anti-HNA protutijela, ispitivanje se može nastaviti određivanjem anti-HLA I protutijela, uz primjenu najosjetljivijih dostupnih metoda. Određivanje specifičnih granulocitnih antigena majke, oca i novorođenčeta i križna proba između seruma majke (novorođenčeta) i očevih granulocita, nije obvezno za serološku potvrdu dijagnoze ANN, ali je korisno u slučaju aloimunizacije na specifični granulocitni antigen vrlo niske učestalosti u populaciji. Neutrofilni antigeni najčešće se određuju PCR-SSP metodom (slika G) ili serološki MAINA testom. (4-9)



Slika G. Slika gela s rezultatom HNA-1a, -b i -c genotipizacije metodom PCR-SSP (linije 1,2 i 3; HNA-1a=, b=,c=, linije 3,4 i 5; HNA-1a=, b+,c=, linije 7,8 i 9; HNA-1a=, b+,c=), Odjel za molekularnu imunogenetiku, HZTM

U serološkom ispitivanju TRALI potrebno je ispitati uzorak/uzorke krvi svih davatelja doza krvnih pripravaka na koje je bolesnik imao poslijetransfuzijsku reakciju. Ukoliko je ispitivanje negativno, nastavlja se ispitivanjem uzorka krvi bolesnika na prisutnost anti-HNA I HLA protutijela, iako ona rijetko uzrokuju TRALI. TRALI mogu uzrokovati anti HLA I, anti-HLA II i anti-HNA protutijela, što uvjetuje odabir testova. Najčešće se primjenjuju LAG, GIFT, MAINA-EIA, MLCT i EIA-HLA I i II. Za potvrdu dijagnoze korisno je određivanje antigena HNA, odnosno HLA, serološkim (MAINA, MLCT) ili molekularnim metodama (PCR-SSP). U oko 1/3 bolesnika s kliničkom slikom TRALI dijagnoza nije serološki potvrđena, a pretpostavlja se da je uzrokovan lipidima oslobođenih tijekom čuvanja trombocitnih i eritrocitnih koncentrata u kojima nije smanjen broj leukocita, koji se vežu na granulocite i uzrokuju njihovu pojačanu razgradnju.

(60-63, 87)

1.7. PREGLED I PRIMJENA METODA ZA ODREĐIVANJE HLA I ANTIGENA I PROTUTIJELA

Antigeni i aleli HLA I određuju se serološkim i molekularnim metodama. Molekularne metode imaju brojne prednosti pred serološkim. One su visoke osjetljivosti i specifičnosti, zahtijevaju male količine uzorka za ispitivanje, imaju kraće vrijeme izvođenja, nisu uvjetovane vijabilnim testnim stanicama i ne ovise o antigenoj ekspresiji na staničnoj membrani. Serološkim metodama može se razlučiti samo određeni broj specifičnih HLA I antigena, a molekularnim DNK metodama visoke rezolucije mogu se odrediti svi poznati aleli. (42, 43)

Molekularna metoda polimerazne lančane reakcije (*engl.* polymerase chain reaction-PCR) omogućuje umnožavanje (amplifikaciju) velike količine određenog ciljnog segmenta genoma DNK. Metode niske i srednje rezolucije otkrivaju serološki ekvivalent HLA antigena s većom točnošću, dok metode visoke rezolucije razlikuju pojedine alele. Najčešće se primjenjuje PCR metoda uz uporabu oligonukleotidnih proba. U ovoj metodi HLA genotip određuje se uz pomoć oligonukleotidnih proba nanešenih na čvrstu podlogu (npr. mikrokuglice) i enzimsko-imunološkog eseja. (43, 88)

Druga molekularna metoda je PCR sa začetnicima specifičnim za sekvencu (*engl.* sequence specific primers-SSP). U ovoj metodi, nakon višekratnih PCR ciklusa u kojima je svaka reakcija specifična za pojedini alel, slijedi prikaz umnoženih alela uz pomoć elektroforeze u agaroznom gelu. Kako obilježivači imaju strogo specifičan cilj vezanja, prisutnost umnoženog materijala znači prisutnost odgovarajućeg alela. Setovi parova obilježivača dostupni su za sve poznate HLA-A, -B i C allele, pa se ova metoda najčešće koristi. Metode

sekvenciranja DNK (*engl.* sequence-based typing) visoke rezolucije, omogućuju određivanje novih alela. (89)

Serološka metoda za određivanje HLA I antigena, koja se najčešće primjenjuje je test mikrolimfocitotoksičnosti (*engl.* microlymphocytotoxicity test-MLCT). U testu se koriste limfociti, a ne granulociti, radi njihove jednostavnije izolacije iz uzorka periferne krvi. Također se mogu koristiti i limfociti izolirani iz limfnih čvorova ili slezene. Specifični antiserumi potrebni za HLA tipizaciju u ovoj metodi najčešće su poliklonalni i dobivaju se od žena koje su više puta bile trudne, ali postoje i mišji monoklonalni antiserumi. U MLCT testu HLA antiserumi poznatih specifičnosti, suspenzija limfocita ispitanika i komplement kuniča nanose se u jažice mikrotitarske ploče. Reakcija limfocitotoksičnosti, odnosno oštećenje stanične membrane, uzrokovano stvaranjem kompleksa antigen-protutijelo, dokazuje se dodavanjem boje, koja ulazi samo u oštećene stanice. Stanice se analiziraju uz pomoć mikroskopa s faznim kontrastom. Test se može izvesti uz pomoć fluorescentnih boja, a rezultat analizirati pomoću mikroskopa s fluorescentnim izvorom svjetla. (43, 90)

Izuzetni polimorfizam HLA I sistema, razlike u učestalosti pojedinih antigena u raznim populacijama, biološko podrijetlo antiseruma i ciljnih stanica pridonose poteškoćama u točnom serološkom određivanju HLA I antigena. Radi toga većina laboratorija danas koristi molekularne metode za određivanje HLA I alela.

HLA I antigeni i aleli određuju se za potrebe transplantacije hematopoeznih matičnih stanica (iz koštane srži, periferne krvi ili umbilikalne krvi) i solidnih organa (bubrega, jetre, tankog crijeva, srca i pluća), procjene relativnog rizika za nastanak autoimunih, reumatskih, upalnih i drugih bolesti (sistemski lupus

eritematosus, IgA imunodeficijencija, celijakija, ankilozantni spondilitis, reumatoidni artritis, dijabetes tipa I, mijastenija gravis, progresija HIV infekcije i druge). (43, 91)

Također, HLA I antigeni i aleli određuju se u svrhu potvrde rezultata serološkog ispitivanja aloimunih neutropenijskih sindroma (TRALI, neučinkovitosti trombocitnih transfuzija, aloimune neonatalne neutropenije i trombocitopenije) i odabiru davatelja antigen negativnih koncentrata trombocita za liječenje HLA imuniziranih bolesnika. (49, 56, 63-64)

MLCT test također se koristi i za serološko određivanje anti-HLA I protutijela. U testu se tada ispituje serum ispitanika, a dodaje se suspenzija testnih limfocita s poznatim HLA I antigenima. MLCT se rutinski primjenjuje za test križne reaktivnosti (*engl.* crossmatch), koji se izvodi sa serumom bolesnika, potencijalnog primatelja i limfocitima potencijalnog davatelja organa. U prilagođenom obliku MLCT testa s antiglobulinskim reagensom, postiže se veća osjetljivost testa križne reaktivnosti. (90, 91) Primjena metode protočne citometrije značajno povećava osjetljivost testa za određivanje anti-HLA I protutijela. Najosjetljivija metoda za određivanje anti-HLA I protutijela danas je multiplex tehnologija (primanje višestrukih signala iz istog izvora), uz analizu mjerenja na Luminex analizatoru. U testu se mikrokuglice obložene HLA antigenima razreda I, obojene s dva fluorokroma različitoga spektra pomiješaju s plazmom (serumom) ispitanika. Nakon dodavanja sekundarnog protutijela obilježenog fitoeritinom, konačna koncentracija protutijela određuje se u Luminex analizatoru, mjerenjem fluorescencijske emisije svake mikrokuglice, prolaskom kroz dvije laserske zrake (crvenu i zelenu) koje ekscitiraju fluorescentne boje. (92)

Za praćenje HLA aloimunizacije u bolesnika koji čekaju presadak solidnih organa, MLCT test izvodi se s panelom od 30 do 60 različitih testnih stanica i serumom ispitanika. U istu svrhu koristi se metoda protočne citometrije i multiplex-Luminex tehnologija. Postotak stanica u panelu na koje je bolesnik stvorio anti-HLA I protutijela označava se s PRA (engl. panel reactive antibody). (88, 89, 92)

MLCT test koristi se također za određivanje anti-HLA I protutijela u serološkom ispitivanju TRALI, febrilnih poslijetransfuzijskih reakcija, neonatalne trombocitopenije i neutropenije, te dijagnostici i liječenju bolesnika s neučinkovitim trombocitnim transfuzijama (refraktornost). U slučaju sumnje na aloimunu neonatalnu trombocitopeniju i neutropeniju, kada specifična antitrombocitna ili antineutrofilna protutijela nisu dokazana, a probirno je serološko ispitivanje pozitivno, probirno ispitivanje i određivanje specifičnosti anti-HLA I protutijela važno je za konačnu potvrdu dijagnoze. Primjena najosjetljivije dostupne metode za određivanje anti-HLA I protutijela (npr. multiplex- Luminex metode) značajna je u dokazivanju niskog titra protutijela u djetetovoj plazmi, i konačnoj serološkoj potvrdi dijagnoze ANN. (92, 93) Nadalje, neučinkovite trombocitne transfuzije u politransfundiranih bolesnika s trombocitopenijom, najčešće su posljedica aloimunizacije na HLA I antigene, a MLCT test koristi se u odabiru HLA I podudarnog ili antigen negativnog trombocitnog krvnog pripravka, pripremljenog od HLA I tipiziranog davatelja. (43, 63)

1.8. ALOIMUNA NEONATALNA NEUTROPENIJA (ANN)

Aloimuna neonatalna neutropenija (ANN) nastaje aloimunizacijom majke tijekom trudnoće, fetalnim neutrofilnim antigenima naslijeđenim od oca, koji se ne nalaze na majčinih neutrofilima. Majčina anti-neutrofilna protutijela IgG razreda putem posteljice prelaze u fetalnu cirkulaciju. Neutropenija u novorođenčeta posljedica je pojačane razgradnje fetalnih neutrofila obloženih majčinih IgG protutijelima. Bolest je analogna hemolitičkoj bolesti novorođenčeta, ali za razliku od nje može se javiti u prvorodnog djeteta. Obzirom da ne postoji prijenatalno probirno laboratorijsko ispitivanje za ANN, pojava bolesti u prvoga je djeteta u obitelji neočekivana. (2, 94)

ANN je najčešće uzrokovana aloimunizacijom na specifične humane neutrofilne antigene; HNA-1a, HNA-1b i HNA-2a. Anti-HNA 3a, -4a i protutijela usmjerena na Fc receptor (CD16), kao i majčina antineutrofilna IgG autoprotutijela rijetko uzrokuju ANN. (5, 25)

Prema podacima iz literature, ANN je rijetka bolest. Procjenjuje se da je učestalost ANN manje od 1 slučaj na 1000 živorođene djece, a učestalost teških oblika bolesti 1 slučaj na 6000 živorođenih. (2, 3) Točna učestalost bolesti nije poznata, jer se prijavljeni slučajevi odnose uglavnom na referentne centre pojedinih zemalja kojima je dostupno specifično serološko i molekularno ispitivanje neutrofilnih protutijela i antigena, kojim se potvrđuje dijagnoza bolesti. (2)

Sumnja na ANN postavlja se u slučaju izolirane neutropenije (<1500 neutrofila/ mm^3) u novorođenčeta. Neutropenija može biti blaga (broj neutrofila u krvi od 1000 do $1500/\text{mm}^3$), umjerena (od 500 do $1000/\text{mm}^3$) ili teška (manje od

500 /mm³). Tijek trudnoće je uredan, majka ima normalan broj neutrofila, a trudnoća nije praćena češćom pojavom bakterijskih infekcija. Klinički tijek bolesti je samoograničavajući, prosječnog trajanja oko 7 tjedana. Neutropenija obično nestaje u dobi od 2 do 3 mjeseca, obzirom da je poluživot IgG protutijela oko 5 do 6 tjedana. Obično se javljaju samo blaže bakterijske infekcije. (4) U teškim oblicima bolesti, praćenim sepsom, bolest može imati i smrtni ishod. (5-7)

Za konačnu potvrdu dijagnoze ANN potrebno je laboratorijsko serološko ispitivanje za antineutrofilna protutijela iz uzorka krvi majke i novorođenčeta. Također, treba isključiti ostale uzroke neonatalne neutropenije.

Diferencijalna dijagnoza:

Neutropenija je česta u novorođenačkoj dobi. U studiji A. Funke i suradnika učestalost neutropenije u novorođenčadi u jedinici intenzivnog liječenja bila je 8.1%. 72% novorođenčadi nije imalo znakova bakterijske infekcije u trenutku laboratorijskog ispitivanja. Rizik nastanka bakterijske infekcije u kasnijem tijeku bolesti bio je 9%, usprkos dugotrajno sniženom broju neutrofila. Infekcija se javila samo u prijevremeno rođene djece. U skupini novorođenčadi sa sepsom neutropenija je bila prisutna u 38% ispitanika i trajala je manje od 24 sata u 73% ispitanika. (94)

Uzroci neutropenije u novorođenačkoj dobi mogu biti: pojačana razgradnja neutrofila zbog imunoloških i neimunoloških razloga, smanjeno stvaranje stanica i sekvestracija stanica. Neutropenija može biti nasljedna ili stečena. (95, 96, 97) Imuna neonatalna neutropenija, najčešće je uzrokovana aloprotutijelima i izoprotutijelima (ANN), a rijetko autoprotutijelima. Autoprotutijela IgG razreda, prisutna u krvotoku majke s autoimunom primarnom ili sekundarnom neutropenijom (sistemske autoimune i hematološke bolesti, seropozitivni

reumatoidni artritis, Feltyjev sindrom), pasivno prelaze posteljicu, vežu se za djetetove neutrofile i uzrokuju njihovu pojačanu razgradnju. Vrlo rijetko se primarna autoimuna neutropenija (AIN) javlja u novorođenačkoj dobi. Opisani su pojedinačni slučajevi AIN u dobi od 3 do 8 tjedana starosti djeteta. (53, 54) Neutropenija može biti potaknuta lijekovima (antibiotici, protu-upalni, antipiretici). U tom slučaju lijek služi kao nosač (haptent), uzrokujući nastajanje protutijela, a neutropenija nestaje 1 do 2 tjedna nakon prestanka uzimanja lijeka. (95)

Teški oblik kongenitalne nasljedne (Kostmanov sindrom) i nenasljedne neutropenije, te kongenitalni sindromi povezani s imunodeficijencijom i anomalijama raznih organa (Shwachman-Diamond, Fanconi, Blackfan-Diamond, Chediack Higashi, Barth, Wiscott-Aldrich), javljaju se vrlo rijetko, u 1 od 100000 novorođenčadi). (94, 95)

Za razliku od imunih neutropenija u kojima je nalaz koštane srži uredan ili je pojačana mijelopoeza, u većini navedenih sindroma prisutne su patološke promjene u koštanoj srži, najčešće zastoj u sazrijevanju mijeloidne loze, te povećani rizik za nastanak leukemije (5-15%). Broj neutrofila manji je od $500/\text{mm}^3$, tijek bolesti je kroničan i progresivan, praćen učestalim teškim oblicima bakterijskih infekcija i sepsom, za razliku od ANN u kojoj je stupanj neutropenije i tijek bolesti blaži i samoograničavajući. (95, 96, 97)

U Kostmanovom sindromu nalazi se mutacija HAX1 gena, koja uzrokuje zastoj u sazrijevanju mijeloidne loze u koštanoj srži u stadiju promijelocita. Neutropenija se javlja neposredno nakon rođenja, teškog je stupnja i praćena je učestalim i teškom oblicima bakterijske infekcije, koje ne odgovaraju na antibiotsku terapiju. (97)

Neimune sekundarne neutropenije u novorođenčeta posljedica su prolazne supresije koštane srži tijekom virusnih infekcija (respiratorni sincicijalni virus, Epstein-Bar, virus influence A i B, hepatitisa, varicella, rubella i drugih) ili teških bakterijskih infekcija. (95) Neutropenija se javlja u prvih nekoliko dana od početka infekcije, obično traje 3 do 8 dana i blagog je do umjerenog stupnja. (98)

Neutropenija u novorođenčeta može nastati kao posljedica bolesti majke tijekom trudnoće; hipertenzije, infekcija (HIV, CMV) ili uzimanja lijekova. Neutropenija je u navedenim slučajevima najčešće blagog stupnja, prolazna i kratkotrajna. (98, 99)

Laboratorijska dijagnostika:

Cilj je laboratorijskog ispitivanja aloimune neonatalne neutropenije dokazati anti-neutrofilna alopolutijela u krvi majke, usmjerena na specifične neutrofilne antigene na neutrofilima djeteta/oca, koja su uzrokovala pojačanu imunu razgradnju stanica u novorođenčeta.

Ono obuhvaća ispitivanje seruma i neutrofila majke i novorođenčeta na prisutnost antineutrofilnih protutijela IgG razreda. Najčešće se primjenjuje imunofluorescentni test za anti-neutrofilna (granulocita) protutijela (GIFT-direktni i indirektni) i test leukoaglutinacije (LAG) za probirno ispitivanje, te MAINA i imunoblot za određivanje specifičnosti anti-neutrofilnih protutijela. Probirno serološko ispitivanje ANN je pozitivno ukoliko je pozitivan direktni test za anti-neutrofilna protutijela s neutrofilima djeteta i pozitivan indirektni test sa serumom majke. Direktni test s neutrofilima majke je negativan. Pozitivan indirektni test sa serumom djeteta nije uvjet za postavljane dijagnoze, jer je u većine ispitanika negativan zbog niskog titra protutijela i male količine uzorka za ispitivanje. U tom slučaju korisno je dodatno serološko ispitivanje primjenom križne probe s neutrofilima oca i serumom majke (djeteta). (5, 6)

Majčina antineutrofilna autoprotutijela IgG razreda rijetko mogu uzrokovati neutropeniju u novorođenčeta. U tom slučaju antineutrofilna autoprotutijela prisutna su na neutrofilima i u plazmi majke (pozitivan direktni i indirektni GIFT), za razliku od aloimune neutropenije kada je direktni test s neutrofilima majke negativan. Vrlo rijetko dijete stvara vlastita autoprotutijela (AIN). Tada je majčin direktni i indirektni test za antineutrofilna protutijela negativan, a djetetov direktni i indirektni test pozitivan. (52, 98)

U oko trećine slučajeva kliničke sumnje na ANN, ni najosjetljivijim metodama nije moguće dokazati anti-HNA protutijela, iako su pregledni testovi serološkog ispitivanja za antineutrofilna protutijela pozitivni. Tada se ispitivanje može nastaviti određivanjem anti-HLA I protutijela, uz primjenu najosjetljivijih dostupnih metoda. (7, 92, 93)

Određivanje specifičnih granulocitnih antigena majke, oca i novorođenčeta i križna proba između seruma majke (novorođenčeta) i očevih granulocita, nije obvezno za serološku potvrdu dijagnoze ANN, ali je korisno u slučaju aloimunizacije na specifični granulocitni antigen vrlo niske učestalosti u populaciji. Neutrofilni antigeni najčešće se određuju PCR-SSP metodom ili serološki MAINA testom. (73, 80)

Liječenje:

U liječenju ANN primjenjuju se antibiotici (preventivno ili prema antibiogramu), intravenozni gamaglobulini i granulocitni faktor rasta (*engl.* recombinant human - granulocyte colony stimulating factor, rh-GCSF), a rijetko granulocitne transfuzije i plazmafereza. U većine bolesnika bolest je blagotijeka i ne zahtjeva medikamentozno liječenje, osim održavanja općih higijenskih uvjeta u okolišu novorođenčeta i sprječavanju izloženosti bakterijskim infekcijama. (95)

Primjena antibiotika u cilju sprječavanja bakterijskih infekcija opravdana je samo u slučaju izloženosti infekciji iz okoline (npr. hospitalnih infekcija), što uvjetuje i odabir antibiotika. U slučaju pojave bakterijske infekcije i sepse u novorođenčeta, liječenje se provodi antibioticima prema nalazu antibiograma, u propisanim dozama i trajanju. Terapija za povišenje broja neutrofila u krvi novorođenčeta s ANN, u cilju sprječavanja bakterijskih infekcija, nema opravdanja i primjenjuje samo u teškom obliku bakterijske infekcije ili sepse kada je liječenje antibioticima prema antibiogramu neučinkovito. Najčešće se primjenjuje rh-GCSF u dozi od 5 do 10 μ gr/kg tjelesne težine, a rjeđe intravenozni gamaglobulini (IVIG) u dozi od 0,4-1 gr/kg tjelesne težine, tijekom 3 do 5 dana. (96, 100)

Za razliku od navedenoga, primjena rh G-CSF za sprječavanje bakterijske sepse opravdana je u liječenju teških oblika kongenitalnih neutropenija, npr. Kostmanovog sindroma. Usprkos potencijalnom riziku primjene faktora rasta u ovim bolestima (maligna transformacija), primjena rh G-CSF znatno je smanjila smrtnost od sepse, na manje od 1%. (95, 97)

Granulocitne transfuzije primjenjuju se vrlo rijetko, samo u slučaju sepse i neučinkovitosti antibiotske terapije. (94-98)

Liječenje je uvijek individualno, temeljeno na kliničkom tijeku bolesti, iskustvima iz literature ili rjeđe vlastitim iskustvima, obzirom da je bolest rijetka a podaci o uspješnosti i dugotrajnom učinku terapije oskudni, posebno u slučaju primjene rh-GCSF. (101-103)

2. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

„Tko spasi i jedan ljudski život, kao da je spasio cijelo čovječanstvo“, citat, Tora

Primarni ciljevi ovoga istraživanja jesu:

- 1) Prepoznati aloimunu neonatalnu neutropeniju (ANN) sustavnim pristupom kliničara u postavljanju dijagnoze ANN
- 2) Procijeniti učestalost ANN u Hrvatskoj
- 3) Analizirati serološka, molekularna i klinička obilježja ANN u Hrvatskoj

Dodatni cilj istraživanja je temeljem kliničkih podataka slučajeva ANN predložiti algoritam dijagnostike, posebno za slučaj kada rutinskom dijagnostikom nisu dokazana anti-HNA protutijela koja su najčešći uzrok ANN.

Hipoteza:

Anti-HLA I protutijela sama mogu uzrokovati aloimunu neonatalnu neutropeniju. Dodatno serološko ispitivanje za anti-HLA I protutijela, opravdano je u cilju serološke potvrde dijagnoze u slučaju kliničke sumnje na ANN kada rutinskim ispitivanjem anti-HNA protutijela nisu dokazana.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Prospektivnim istraživanjem određena je učestalost izolirane neutropenije svoj novorođenčadi rođenoj u Rodilištu Kliničke bolnice „Sestre Milosrdnice“ (KB SM), tijekom 2007. i 2008. godine.

3.1.2. Epidemiološki podaci o broju živorođene djece u Republici Hrvatskoj (RH) i živorođenih u Rodilištu KB SM, za razdoblje od 1998. do 2008. godine prikupljeni u Zavodu za javno zdravstvo RH.

3.1.3. Svi zahtjevi za laboratorijsku dijagnostiku sumnje na ANN, prikupljeni su u Odsjeku za imunogenetiku trombocita, leukocita i hemostazu, Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM) i Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra „Zagreb“ (KBC-Zagreb), u razdoblju od 1998.- do 2008. godine.

Podaci za razdoblje od 1998.do 2006. prikupljeni su retrospektivno, a za razdoblje od 2007. do 2008. godine prospektivno.

3.1.4. Uzorci krvi za laboratorijsko ispitivanje:

- a) uzorak venske krvi djeteta: 1 uzorak od 3,5 mL uzet na antikoagulantnu otopinu EDTA (za ispitivanje plazme, izolaciju neutrofila, limfocita i DNA)
- b) uzorci venske krvi majke i oca (ako je dostupan): 1 uzorak od 7 mL uzet na antikoagulantnu otopinu EDTA i 1 uzorak od 5 mL bez antikoagulantne otopine (za ispitivanje seruma).
- c) zamrznuti uzorci seruma, plazme i DNA (čuvani na -80°C)

Arhivirani uzorci seruma, plazme i DNA majke, djeteta (oca), kojima je učinjeno laboratorijsko ispitivanje ANN u HZTM.

Uzorci su korišteni za dodatno ispitivanje specifičnosti anti-HNA i anti-HLA I protutijela i HNA i HLA I genotipizaciju, u slučaju kada je probirno serološko ispitivanje ANN bilo pozitivno, a HNA specifičnost protutijela nije određena.

3.2. Metode

3.2.1. Učestalost ANN u RH procijenjena je temeljem podataka o broju zahtjeva za laboratorijsku dijagnostiku ANN i broja serološki potvrđenih slučajeva ANN u odnosu na broj živorođene djece u RH i Rodilištu KB SM, u razdoblju od 1998. do 2008. godine.

3.2.2. Kliničko-laboratorijski podaci prikupljeni su iz povijesti bolesti, zahtjevnica za laboratorijsko ispitivanje, usmenim kontaktom s neonatolozima i upisani u „Upitnik za kliničko-laboratorijske podatke za aloimunu

neonatalnu neutropeniju“ (prilog 1). Oni su obuhvaćali slijedeće podatke o novorođenčetu i majci: dob, broj neutrofila u krvi, prisutnost infekcije, medikamentozna terapija, opće kliničko stanje, ostali laboratorijski nalazi, dosadašnji tijek bolesti, rezultati serološkog za aloimunu neonatalnu neutropeniju. Analizirani su i statistički obrađeni kliničko-laboratorijski podaci 23 slučaja sumnje na ANN. Uspoređen je tijek bolesti, stupanj i trajanje neutropenije, učestalost i težina bakterijskih infekcija, specifičnost protutijela, te učinkovitost liječenja u serološki pozitivnim slučajevima ANN u odnosu na serološki negativne.

3.2.3. U svim slučajevima sumnje na ANN (apsolutni broj neutrofila $<1500/\text{mm}^3$) u novorođenčadi rođene u Rodilištu KB SM, u razdoblju od 2007. 2008. godine učinjeno je:

* Probirno ispitivanje seruma majke i djeteta na prisutnost anti-HNA i HLA razreda I

* U serološki pozitivnim slučajevima ANN, određivana je HNA specifičnost protutijela.

* U slučaju kada anti-HNA protutijela nisu dokazana, serološko ispitivanje nastavljeno je probirnim ispitivanjem seruma majke i djeteta na prisutnost anti-HLA I protutijela, primjenom najosjetljivije dostupne metode, multiplex-*Luminex*, te određena njihova specifičnost.

* U slučaju kada su anti-HLA I protutijela dokazana, učinjen je test križne reaktivnosti između granulocita/limfocita oca i adsorbiranog majčinog seruma.

* Rezultati serološkog ispitivanja potvrđeni su HNA odnosno HLA I genotipizacijom uzoraka krvi majke i djeteta/oca.

3.2.4. Naknadno su laboratorijski ispitani dostupni zamrznuti uzorci seruma, plazme i DNA, serološkim i molekularnim metodama za određivanje HLA I protutijela i antigena, u svim serološki pozitivnim slučajevima ANN, kada HNA protutijela nisu dokazana.

3.2.5. Pojedinačno je prikazano 4 slučaja serološki potvrđene ANN uzrokovane samo anti-HLA I protutijelima, koristeći elemente procjene temeljene na slučaju.

3.2.6. Predložen je algoritam serološkog i molekularnog ispitivanja ANN (prilog 2).

3.2.7. Metode laboratorijskog ispitivanja

- a) Test imunofluorescencije za anti-neutrofilna (granulocitna) protutijela (IF); direktni i indirektni test (90, 104)

Direktni i indirektni IF test primijenjeni su za probirno laboratorijsko ispitivanje plazme i neutrofila ispitanika za antineutrofilna protutijela. Indirektni IF test primijenjen je za križnu probu između neutrofila oca (djeteta) i seruma majke (nativni ili adsorbiran s očevim trombocitima). Indirektni IF test sa specifičnim

humanim poliklonalnim anti-serumima (anti-HNA-2a i anti-HNA-3a primijenjen je za serološko određivanje HNA-2a i HNA-3a antigena).

Princip testa:

Imunofluorescentni test za antineutrofilna protutijela je prilagođeni antiglobulinski test. Antihumani globulin (AHG) obilježen je fluorescentnom bojom; fluorescein-iso-tio-cijanatom (FITC), što omogućuje da se vezano protutijelo može analizirati pomoću mikroskopa s fluorescentnim izvorom svjetla. U indirektnom testu dokazuju se anti-neutrofilna protutijela u plazmi ispitanika. U direktnom testu dokazuju se anti-neutrofilna protutijela vezana za neutrofile ispitanika.

Postupak je slijedeći:

U indirektnom testu kao testne stanice koriste se neutrofilni izdvojeni iz sloja leukocita i trombocita ("buffy coat") iz uzorka krvi izvađenog u epruvetu s antikoagulantnom otopinom (EDTA) od 4 dobrovoljna davatelja krvi, krvne grupe "O". Nakon sedimentacije stanica, izdvaja se sloj leukocita i trombocita, u centrifugira uz dodatak otopine Lymphodex (Density gradient for isolation of lymphocytes), Inno-train Diagnostik, Njemačka. Ostatni eritrociti u talogu neutrofila liziraju se u otopini amonijevog klorida (NH_4Cl). Nakon toga testne stanice se fiksiraju u 1% otopini paraformaldehida. Slijedi inkubacija testnih stanica s plazmom ispitanika. Nakon pranja dodaje se monospecifični anti-humani globulin (AHG) obilježen fluorescein-izo-tio-cijanatom (FITC), anti-IgG (Fab2 fragment), u razrjeđenju 1:80, prema uputi proizvođača (Jackson Immuno Research, Baltimore, SAD). Nakon inkubacije, dodaje se 33% glicerol. Jedna kap suspenzije stavlja se na predmetno staklo i pokrije pokrovnim staklom. Rezultat testa analizira se pomoću mikroskopa s Xenon-ovom lampom, Leitz-Laborlux s, Leica, uz objektiv povećanja 50x i vodenu imerziju. Rezultat testa je pozitivan ako

se na više od 20% stanica u vidnom polju opaža prstenasta fluorescencija na staničnoj površini. Pozitivan rezultat označava prisutnost antineutrofilnih protutijela IgG razreda u plazmi ispitanika.

U direktnom IF testu kao testne stanice koriste se neutrofilni izdvojeni iz sloja leukocita i trombocita ("buffy coat") iz uzorka krvi ispitanika izvađenog u epruvetu s EDTA antikoagulantnom otopinom. Nakon sedimentacije stanica, priprema suspenzije stanica ispitanika i izvođenje testa jednako je kao u indirektnom testu.

Pozitivan rezultat testa označava prisutnost protutijela IgG razreda, vezanih za vlastite stanice ispitanika (koja su prešla posteljicu i vezala se za stanice novorođenčeta).

Testovi su učinjeni u "Odsjeku za imunogenetiku trombocita i leukocita i hemostazu", HZTM, prema standardnom postupku.

- b) Test imunofluorescencije za anti-limfocitna protutijela; indirektni test (90, 104)

Test je primijenjen za probirno ispitivanje plazme ispitanika za anti-HLA I protutijela i križnu probu između limfocita oca (djeteta) i seruma majke (nativni ili adsorbiran s očevim trombocitima).

Princip testa i postupak jednaki su indirektnom IF testu za anti-neutrofilna protutijela, osim što su testne stanice limfociti.

Test je učinjen u "Odsjeku za imunogenetiku trombocita i leukocita i hemostazu", HZTM, prema standardnom postupku.

c) Test leukoaglutinacije (LAG); indirektni test (105)

Indirektni LAG test sa specifičnim humanim poliklonalnim anti-serumima (anti-HNA-2a i anti-HNA-3a primijenjen je za serološko određivanje HNA-2a i HNA-3a antigena.

Princip testa: LAG test temelji se na imunološkoj reakciji između anti-leukocitnih protutijela i leukocitnih antigena na površini testnih stanica. Vežanje protutijela IgG i/ili IgM razreda, uzrokuje aktivaciju leukocita, pružanje izdanaka stanične membrane (pseudopodija) i aktivno nakupljanje stanica, odnosno aglutinaciju.

Postupak je slijedeći:

U indirektnom LAG testu kao testne stanice korišteni se neutrofili ispitanika, izdvojeni iz sloja leukocita i trombocita ("buffy coat") iz uzorka krvi izvađenog u epruvetu s antikoagulantnom otopinom (EDTA). Nakon sedimentacije stanica uslijed dodavanja makromolekularne otopine Soludex 80 (proizvođač PLIVA, Zagreb, Hrvatska), izdvaja se sloj leukocita. Suspenzija se inkubira sa specifičnim anti-serumom. Nakon inkubacije se jedna kap suspenzije stavlja na predmetno staklo i analizira pomoću svjetlosnog mikroskopa. U slučaju da se na stanici ispitanika nalazi specifični antigen, na koji je usmjereno protutijelo u testnom serumu, nastaje nakupljanje stanica (aglutinacija). Ukoliko specifični antigen nije prisutan na stanici ispitanika, ne dolazi do vežanja protutijela i stanice ostaju slobodne u suspenziji.

Test je učinjen u "Odsjeku za imunogenetiku trombocita i leukocita i hemostazu", HZTM, prema standardnom postupku.

d) Test mikro-limfocitotoksičnosti (MLCT) (106)

Test je primijenjen za probirno ispitivanje seruma ispitanika za anti-HLA I protutijela i određivanje specifičnosti anti-HLA I protutijela.

Princip testa:

U MLCT testu serum ispitanika i suspenzija testnih limfocita s poznatim HLA I antigenima nanose se u jažice mikrotitarske ploče. Nakon inkubacije se dodaje zečji komplement. Ukoliko se dovoljna količina protutijela iz seruma ispitanika vezala za limfocitnu membranu, aktivira se slijed komplementa do točke aktivacije komplementa koji oštećuje staničnu membranu, odnosno odvija se reakcija limfocitotoksičnosti. Oštećenje stanične membrane dokazuje se dodavanjem boje. Stanice koje nemaju vezanih protutijela, niti aktiviranog komplementa nemaju oštećenu staničnu membranu pa boja nemože ući u stanicu. Suprotno tome, u stanice s oštećenom membranom ulazi boja. Stanice se analiziraju uz pomoć mikroskopa s faznim kontrastom. Test se izvodi s panelom od 30 do 60 različitih testnih limfocita. Usporedbom rezultata testa u pojedinim jažicama s antigramom određenih HLA I antigena u mikrotitarskoj ploči, određuje se specifičnost protutijela.

Test je učinjen prema standardnoj metodi u "Centru za tipizaciju tkiva, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC-Zagreb".

e) Test imobilizacije neutrofilnih antigena pomoću monoklonalnih protutijela, (engl. monoclonal antibody immobilization of neutrophil antigens- MAINA), indirektni test (107)

Test je primijenjen za određivanje specifičnosti anti-HNA protutijela.

Princip testa:

MAINA test je prilagođeni antiglobulinski test. Neutrofilni antigeni na testnim stanicama izdvajaju se uz pomoć monoklonalnih protutijela usmjerenih na pojedine CD biljege i vežu u imune komplekse s anti-neutrofilnim protutijelima iz plazme ispitanika. Sekundarno protutijelo je antihumani globulin (AHG) obilježen enzimom, koji omogućuje nakon dodavanja supstrata, spektrofotometrijsku analizu intenziteta razvijene boje. U indirektnom MAINA testu ispituje se plazma ispitanika na prisutnost antineutrofilnih protutijela usmjerenih na pojedine glikoproteinske komplekse (CD biljege) neutrofilne membrane. Ako je test pozitivan s jednim ili više biljega, ispitivanje se nastavlja s panelom HNA tipiranih stanica, kako bi se odredila specifičnost protutijela.

Postupak je slijedeći:

U testu se plazma ispitanika istovremeno inkubira s različitim monoklonalnim protutijelima usmjerenim na CD biljege neutrofilne membrane i testnim neutrofilima (mješavina stanica ili HNA tipiranim stanicama). Nakon inkubacije, stanične membrane liziraju se uz pomoć deterdženta (Triton X 100, Sigma, SAD). Slijedi nanošenje dijelova staničnih antigena na čvrstu podlogu, dno jažice mikrotitarske ploče. Imobilizacija imunih kompleksa, posljedica je njihova vezanja za protutijela usmjerena na monoklonalna protutijela za pojedine CD biljege (Goat-anti-mouse IgG-fC γ fragment specific, Jackson ImmunoResearch, Baltimore, SAD), kojima je ploča obložena. U ovom ispitivanju korištena su monoklonalna protutijela usmjerena na CD16 (Fc γ RIIIb; HNA-1a, -b, -c); CD177 (HNA-2a), CD11a (HNA-5a); CD11b (HNA-4a) te β 2 mikroglobulin (HLA I), prema uputama proizvođača; Monoclonal antibody CD16 (IgG1 mouse, clone 3G8, Immunotech, Marseille, France), Purified mouse anti-human monoclonal antibody

CD177-NB1 (IgG1, clone MEM-166, BD Pharmingen, Biosciencias, SAD), Purified mouse anti-human monoclonal antibody CD11a/LFA-1 (IgG2a, clone G43-25B, BD Pharmingen, Biosciencias, SAD), Purified mouse anti-human monoclonal antibody CD11b/Mac-1 (IgG1, clone ICRF44, BD Pharmingen, Biosciencias, SAD) i Mouse monoclonal antibody to beta 2 Microglobulin -ab759 (IgG2a, clone B2M-01, Abcam, Cambridge, UK). Nakon dodavanja sekundarnog protutijela, AHG obilježen enzimom (Peroxidase-conjugated-affinity pure goat anti-human IgG, Fc γ fragment specific, Jackson Immuno Research, Baltimore, SAD) i supstrata (o-phenylenediamine-dihydrochloride-OPD, Sigma, SAD), razvija se boja, ukoliko su u plazmi ispitanika prisutna anti-HNA protutijela (pozitivan rezultat). Ako u plazmi ispitanika nisu prisutna anti-neutrofilna protutijela, jažice ostaju nebojane (negativan rezultat). Intenzitet boje analizira se spektrofotometrijski (OD), na spektrofotometru Anthos III, Biotest, Njemačka. Specifičnost protutijela određuje se analizom pozitivnih i negativnih reakcija dobivenih s određenim testnim stanicama prema antigramu primijenjenog panela.

Test je učinjen u “Odsjeku za imunogenetiku trombocita i leukocita i hemostazu”, HZTM, prema standardnom postupku.

f) Multiplex-Luminex metoda (108)

Test je primijenjen za probirno ispitivanje prisutnosti anti-HLA I protutijela u plazmi majke i djeteta, u slučaju kada je probirno serološko ispitivanje za ANN bilo pozitivno, a anti-HNA protutijela nisu dokazana.

Princip testa:

U testu se koristi multiplex tehnologija (primanje višestrukih signala iz istog izvora), uz analizu mjerenja na Luminex analizatoru. Mikrokuglice obložene HLA

antigenima razreda I, obojene s dva fluorokroma različitoga spektra (crveni i infracrveni) pomiješaju se s plazmom ispitanika. Zatim se dodaje sekundarno protutijelo obilježeno fikoeritinom. Konačna koncentracija protutijela određuje se u Luminex analizatoru mjerenjem fluorescencijske emisije svake mikrokuglice, prolaskom kroz dvije laserske zrake (crvenu i zelenu), koje ekscitiraju fluorescentne boje. Rezultat testa izražen je u % PRA (panel reactivity antibody, *engl*). Cut off vrijednost izračunava se za svaku seriju testova na temelju standarda. U ovom ispitivanju rezultat testa bio je pozitivan kada je PRA vrijednost bila > 7%.

Test je učinjen prema standardnoj metodi u "Centru za tipizaciju tkiva, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC-Zagreb". Za ispitivanje je korišten kit za određivanje specifičnosti anti-HLA protutijela razreda I, prema uputi proizvođača, Labscreen Mixed Class I, Biomedica, Biomedica gruppe, Graz, Austrija.

g) Metoda lančane reakcije polimeraze uz uporabu grupno specifičnih početnica (primer)- PCR-SSP (109,110)

Test je primijenjen za:

- molekularno određivanje HNA-1a, -1b i -1c alela, majke, djeteta (oca) u svrhu potvrde nalaza serološkog ispitivanja anti-HNA protutijela
- HNA-1a, -1b i -1c genotipizaciju dobrovoljnih davatelja krvi u svrhu pripreve panela testnih stanica za MAINA test za određivanje specifičnosti anti-HNA protutijela
- molekularno određivanje HLA-A, -B i -C alela, majke, djeteta (oca) u svrhu potvrde nalaza serološkog ispitivanja anti-HLA I protutijela.

Princip testa:

U PCR-SSP metodi, nakon izolacije DNA iz uzorka venske krvi, slijedi niz PCR ciklusa, u kojima je svaka reakcija specifična za pojedini alel. U ovom ispitivanju korišteni su setovi parova obilježivača za HLA-A, -B i C i HNA-1a, -1b i -1c alele. Po završetku ciklusa umnožavanja DNA, slijedi prikaz umnoženih alela, uz pomoć elektroforeze u agaroznom gelu. Kako obilježivači imaju strogo specifičan cilj vezanja, prisutnost umnoženog materijala znači prisutnost odgovarajućeg alela.

Ispitivanje je učinjeno u "Odsjeku za molekularnu imunogenetiku", HZTM, prema standardnoj metodi.

3.2.8. Statistička analiza podataka

Statistička analiza rezultata ispitivanja izvedena je programskim sustavom „Statistica“, verzija 9,0 (StatSoft, SAD), licenciranom za analizu podataka u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

Podaci su prikazani tablično, a za grafički prikaz rezultata korišten je stupčasti histogram i dijagram raspodjele u obliku pite.

U ovom radu učinjena je deskriptivna analiza podataka s prikazanim minimumom, maksimumom, medijanom i aritmetičkom sredinom.

Podaci su prikazani frekvencijom i udjelom. Razlike između udjela dvaju skupina testirane su pomoću testa razlike proporcije. Hi kvadrat testom uz Yatesovu korekciju ispitivana je razlika između utvrđenih i očekivanih frekvencija. Fisherov egzaktni test primijenjen je za nezavisne uzorke u kontingencijskoj 2x2 tablici, kada je jedna od opaženih frekvencija bila mala ili jednaka 0.

Razina značajnosti na kojoj se određivala statistička značajnost bila je $p < 0,05$.

U analizi podataka korišteni su elementi procjene na temelju prikaza bolesnika (*engl*, case-based-reasoning).

4. REZULTATI

U ovom istraživanju prikupljeni su i analizirani rezultati serološkog i molekularnog laboratorijskog ispitivanja i klinički podaci za 23 slučaja sumnje na aloimunu neonatalnu neutropeniju (ANN), koji su upućeni na laboratorijsko ispitivanje ANN u Odsjek za imunogenetiku trombocita, leukocita i hemostazu, Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu u Zagrebu (HZTM) i Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i staničnu terapiju Kliničkog bolničkog centra- Zagreb u Zagrebu (KBC-ZAGREB), u razdoblju od 1998. do 2008. godine. Retrospektivno su analizirani podaci od 1998. do 2006. godine, a prospektivno su prikupljeni podaci u 2007. i 2008. godini.

Obzirom da je u Republici Hrvatskoj (RH) serološko ispitivanje ANN moguće učiniti samo u navedena dva sub-specijalistička laboratorija, prikupljeni su svi slučajevi sumnje na ANN u RH za koje je traženo serološko ispitivanje u navedenom razdoblju. Prikupljeni podaci laboratorijskog ispitivanja su objedinjeni i dopunjeni epidemiološkim i kliničkim podacima iz povijesti bolesti i kliničkim podacima prikupljenim usmenim kontaktom s neonatolozima iz bolnica koje su zahtjeve uputile. Podaci su upisani u „Upitnik za kliničko-laboratorijske podatke za aloimunu neonatalnu neutropeniju (ANN)“, prilog 1.

4.1. Analiza epidemioloških podataka

4.1.1. Analiza podataka o broju zahtjeva za serološko ispitivanje i broju serološki potvrđenih ANN u odnosu na broj živorođene djece u RH, u razdoblju od 1998. do 2008. godine

Prema podacima Zavoda za javno zdravstvo RH, u razdoblju od 1998. do 2008. godine ukupno je bilo 466 656 živorođene djece. Prosječno godišnje bilo je 42 423 živorođene djece. Na tablici 1. prikazan je broj živorođene djece, broj zahtjeva za serološko ispitivanje i broj serološki potvrđenih slučajeva ANN u RH, prema godinama. Podaci za razdoblje od 1998.do 2006. prikupljeni su retrospektivno, a za razdoblje od 2007. do 2008. godine prospektivno. Ukupan broj zahtjeva za laboratorijsko ispitivanje ANN u RH u jedanaestogodišnjem razdoblju bio je 23. U 15/23 slučaja laboratorijsko ispitivanje ANN bilo je pozitivno, čime je dijagnoza ANN serološki potvrđena.

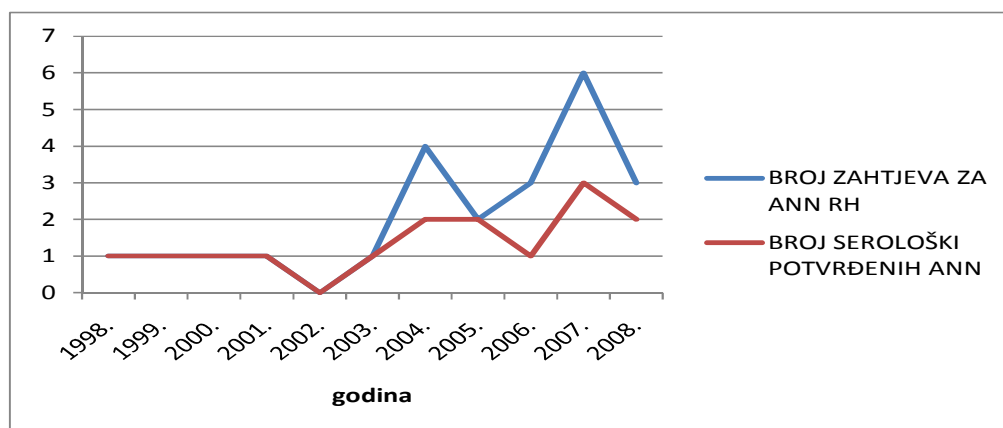
Tablica 1. Broj živorođene djece u RH u razdoblju od 1998. do 2008., broj zahtjeva za serološko ispitivanje ANN i broj serološki potvrđenih slučajeva

	Razdoblje (godine)		
	1998.-2006.	2007.-2008.	1998.-2008.
BROJ ŽIVOROĐENE DJECE U RH	380993	85663	466656
prosječan broj godišnje (\bar{x})	42332	42831	42423
raspon (min.-max.)	39668-47068	41910-43753	39668-47068
BROJ ZAHTJEVA ZA ANN U RH	14	9	23
prosječan broj godišnje (\bar{x})	1,5	4,5	2
raspon (min.-max.)	0-4	3-6	0-6
BROJ SEROLOŠKI POTVRĐENIH ANN U RH	10	5	15
prosječan broj godišnje (\bar{x})	1,1	2,5	1,4
raspon (min.-max.)	0-2	2-3	0-3

Analiza retrospektivno prikupljenih podataka za razdoblje od 1998. do 2006. godine pokazuje da je učestalost serološki potvrđene ANN u RH 1 slučaj na 38099 živorođene djece. U razdoblju od 2007. do 2008. godine u kojem su podaci prikupljeni prospektivno, broj serološki potvrđenih slučajeva ANN bio je dvostruko veći, 1:17323 živorođenih.

Grafički prikaz odnosa broja zahtjeva za laboratorijsko ispitivanje ANN prema broju serološki potvrđenih slučajeva sumnje na ANN u RH, u razdoblju od 1998. do 2008. nalazi se na slici 1.

Slika 1. Odnos broja serološki potvrđenih slučajeva ANN i broja zahtjeva za serološko ispitivanje ANN u RH u razdoblju od 1998. do 2008. godine



Iako je broj zahtjeva za serološko ispitivanje ANN u razdoblju prospektivnog prikupljanja podataka bio trostruko veći od razdoblja u kojem su podaci prikupljeni retrospektivno, a broj serološki potvrđenih ANN udvostručen, i dalje je višestruko manji od očekivanog. Ovi podaci ukazali su na potrebu dodatnih aktivnosti u cilju boljeg prepoznavanja i serološke dijagnostike ANN.

4.1.2. Analiza podataka o broju zahtjeva za serološko ispitivanje i broju serološki potvrđenih ANN u odnosu na broj živorođene djece u Rodilištu Kliničke bolnice „Sestre Milosrdnice” (KB SM) u razdoblju od 1998. do 2008. godine

Prospektivna pilot studija koja je obuhvaćala praćenje broja neutrofila u krvi svoj novorođenčadi između 1. i 3. dana života, provedena je u Rodilištu Kliničke bolnice „Sestre Milosrdnice” (KB SM), u dvogodišnjem razdoblju (2007. i 2008. godina). U svim slučajevima kada je apsolutni broj neutrofila u krvi novorođenčeta bio <1500 u mm^3 učinjeno je probirno serološko ispitivanje uzorka krvi majke i novorođenčeta za ANN. Ako je probirno ispitivanje bilo pozitivno, nastavljeno je s određivanjem specifičnosti anti-neutrofilnih protutijela. Također, praćen je tijek i ishod bolesti, te primijenjeno liječenje. Podaci su uspoređeni s retrospektivno prikupljenim podacima o broju živorođene djece, broju zahtjeva za serološko ispitivanje i broju serološki potvrđenih slučajeva ANN u ovom Rodilištu, u razdoblju od 1998. do 2006. godine i prikazani na tablici 2.

Prema podacima Zavoda za javno zdravstvo RH, u razdoblju od 1998. do 2008. godine u Rodilištu KB SM ukupno je bilo 25405 živorođene djece. Prosječno godišnje bilo je 2310 živorođenih. U razdoblju od 1998. do 2006. godine bilo je 19720 živorođene djece, uz prosječan broj godišnje od 2191. U razdoblju od 2007. do 2008. godine bilo je 5685 živorođene djece, uz prosječan broj godišnje od 2843.

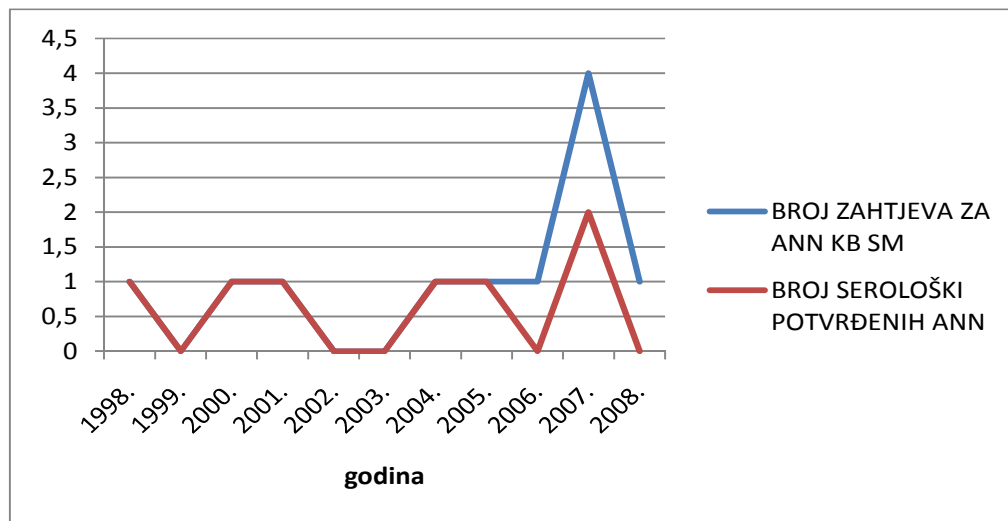
Tablica 2. Broj živorođene djece u Rodilištu KB SM od 1998. do 2008., broj zahtjeva za serološko ispitivanje i broj serološki potvrđenih slučajeva ANN

	Razdoblje (godine)		
	1998.- 2006.	2007.- 2008.	1998.- 2008.
BROJ ŽIVOROĐENE DJECE U KB SM	19720	5685	25405
prosječan broj godišnje (\bar{x})	2191	2843	2310
raspon (min.-max.)	1865-3118	2567-3118	1865-3118
BROJ ZAHTJEVA ZA ANN U KB SM	6	4	11
prosječan broj godišnje (\bar{x})	0,7	2,5	1
raspon (min.-max.)	0-1	1-4	0-4
BROJ SEROLOŠKI POTVRĐENIH ANN U RH	5	2	7
prosječan broj godišnje (\bar{x})	0,6	0-2	0-2
raspon (min.-max.)	0-1	1	0,6

U prospektivnoj studiji od 2007. do 2008. godine broj zahtjeva za serološko ispitivanje ANN bio je 4. U 2 od 4 slučajeva ANN je serološki potvrđena, odnosno otkriven je 1 slučaj ANN na 2843 živorođene djece. U retrospektivnoj studiji od 1998. do 2006. godine broj zahtjeva za serološko ispitivanje ANN bio je 6. U 5 od 6 slučajeva ANN je serološki potvrđena, odnosno otkriven je 1 slučaj ANN na 3944 živorođene djece, što odgovara podacima iz literature.

Grafički prikaz podataka o broju zahtjeva za laboratorijsko ispitivanje ANN u odnosu na broj serološki potvrđenih slučajeva sumnje na ANN u KB SM, u razdoblju od 1998. do 2008., nalazi se na slici 2.

Slika 2. Odnos broja serološki potvrđenih slučajeva ANN i broja zahtjeva za serološko ispitivanje ANN u KB SM u razdoblju od 1998.-2008. godine



U razdoblju prospektivnog praćenja uz primjenu probirnog laboratorijskog ispitivanja ANN u novorođenčadi s brojem neutrofila <1500 u mm^3 , uočeno je povećanje broja zahtjeva za laboratorijsko ispitivanje i broja serološki potvrđenih slučajeva ANN.

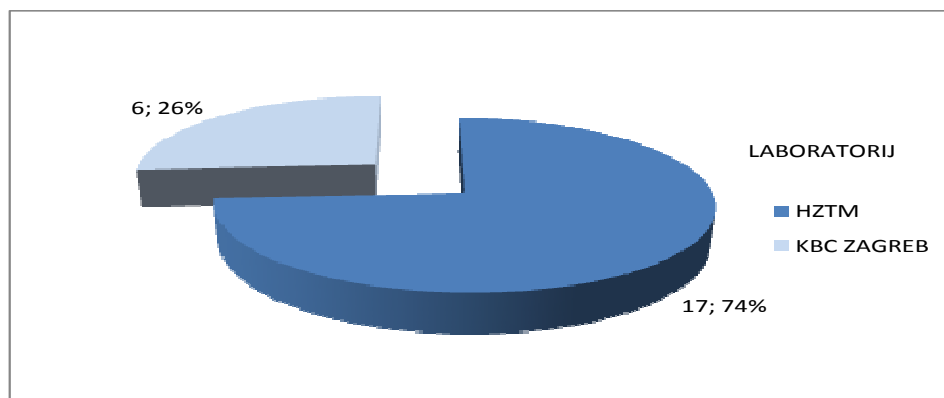
4.2. Analiza kliničko-laboratorijskih podataka o ispitivanju 23 slučaja sumnje na ANN u RH u razdoblju od 1998. do 2008.

4.2.1. Analiza općih podataka

Laboratorijsko ispitivanje ANN učinjeno je u dva subspecijalistička laboratorija: u Odsjeku za imunogenetiku trombocita, leukocita i hemostazu, Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM) u Zagrebu i Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i staničnu terapiju, Kliničkog bolničkog centra- Zagreb (KBC-ZAGREB), slika 3.

Slika 3. Raspodjela ispitanika prema laboratoriju u kojem su učinjena laboratorijska ispitivanja

N=23

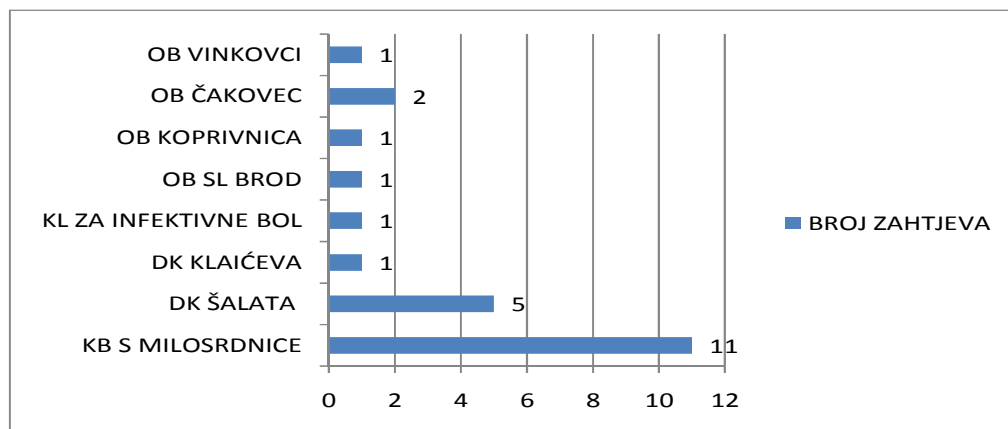


Laboratorijsko ispitivanje je u 17 od 23 (74%) slučajeva učinjeno u laboratoriju HZTM, a u 6 od 23 (26%) u laboratoriju KBC-ZAGREB.

Na slikama 4 i 5 prikazana je raspodjela zahtjeva za laboratorijskim ispitivanjem ANN prema bolnicama iz kojih su upućeni, te pripadnosti zagrebačkoj ili ostalim regijama.

Slika 4. Raspodjela zahtjeva za laboratorijskim ispitivanjem ANN prema bolnicama iz kojih su zahtjevi upućeni

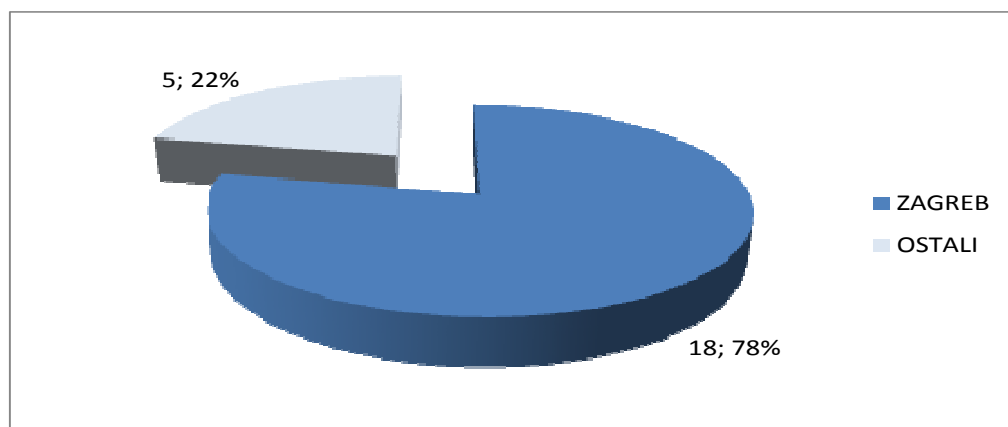
N=23



Najviše zahtjeva za laboratorijsko ispitivanje ANN, 11 od 23 (48%) upućeno je iz Kliničke bolnice "Sestre Milosrdnice", Zagreb.

Slika 5. Raspodjela zahtjeva za laboratorijskim ispitivanjem ANN prema ustanovama iz kojih su upućeni prema pripadnosti zagrebačkoj ili ostalim regijama

N=23



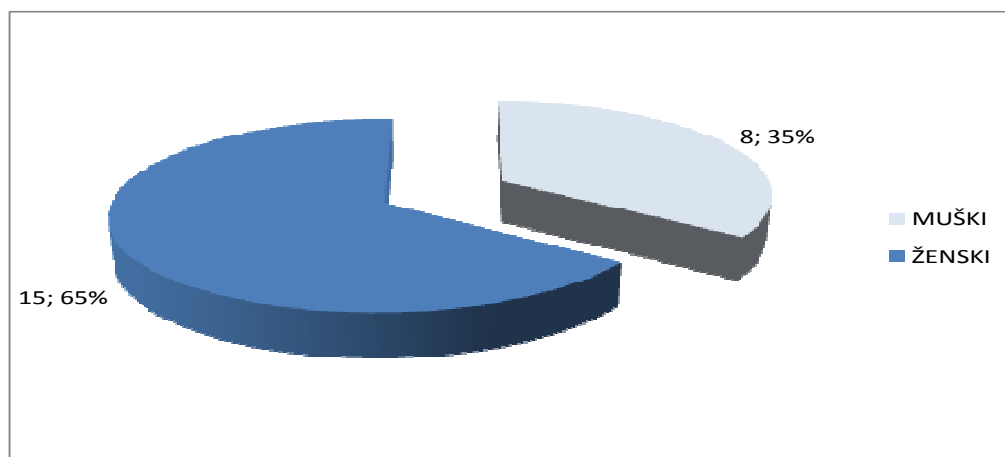
18 od 23 (78%) zahtjeva upućeno je iz zagrebačkih bolnica.

4.2. 2. Analiza kliničkih podataka

Raspodjela novorođenčadi prema spolu, dobi ispitanika u trenutku laboratorijskog ispitivanja ANN, uputnoj dijagnozi, stupnju neutropenije, trajanju neutropenije, prisutnosti bakterijske infekcije, terapiji, broju trudnoća majke, te ishodu bolesti, za 23 novorođenčeta u kojih je zatraženo laboratorijsko ispitivanje ANN. Rezultati su prikazani su na slikama 6 do 14.

Slika 6. Raspodjela prema spolu novorođenčeta

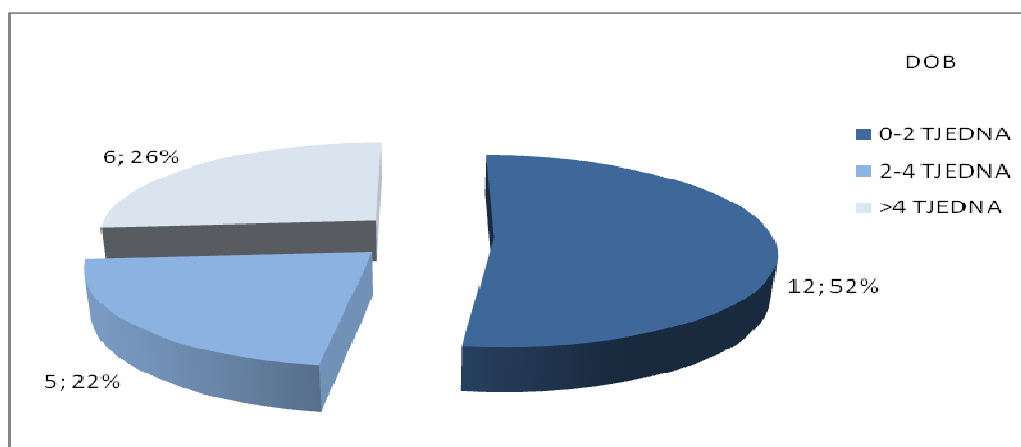
N=23



MUŠKI/ŽENSKI= spol

Ukupno je bilo 15 od 23 (65%) ženske i 8 od 23 (35%) muške novorođenčadi.

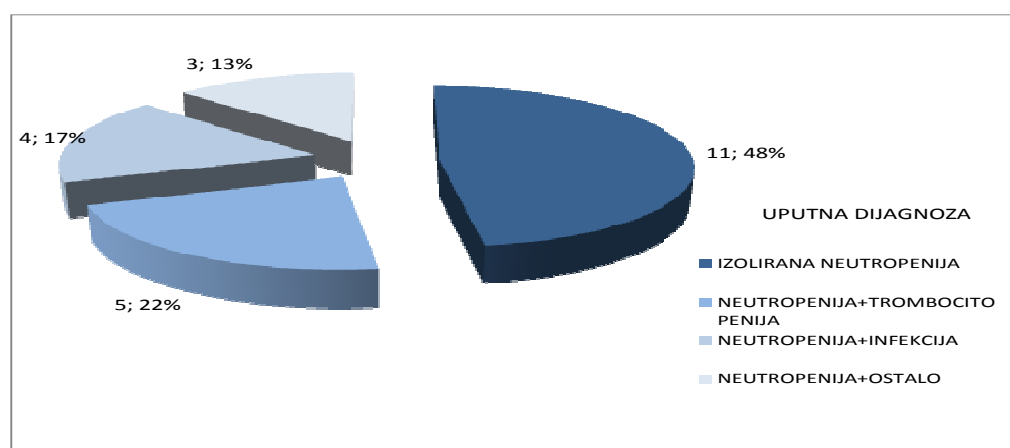
Slika 7. Raspodjela prema dobi novorođenčeta u trenutku laboratorijskog ispitivanja ANN N=23



DOB= dob novorođenčeta u trenutku laboratorijskog ispitivanja

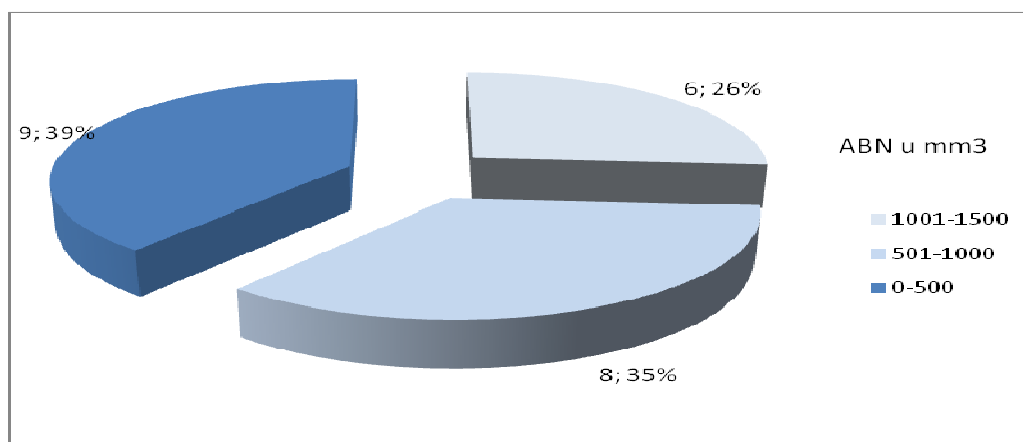
12 od 23 (52%) novorođenčadi u trenutku laboratorijskog ispitivanja bilo je starosti manje od 2 tjedna. Raspon dobi bio je od 1 do 12 tjedana, medijan 2 tjedna.

Slika 8. Raspodjela novorođenčadi prema uputnoj dijagnozi N=23



U 11 od 23 (48%) novorođenčadi razlog laboratorijskog ispitivanja bio je izolirana neutropenija, a u 12 od 23 (52%) uz neutropeniju su bili prisutni trombocitopenija, infekcija ili ostali razlozi.

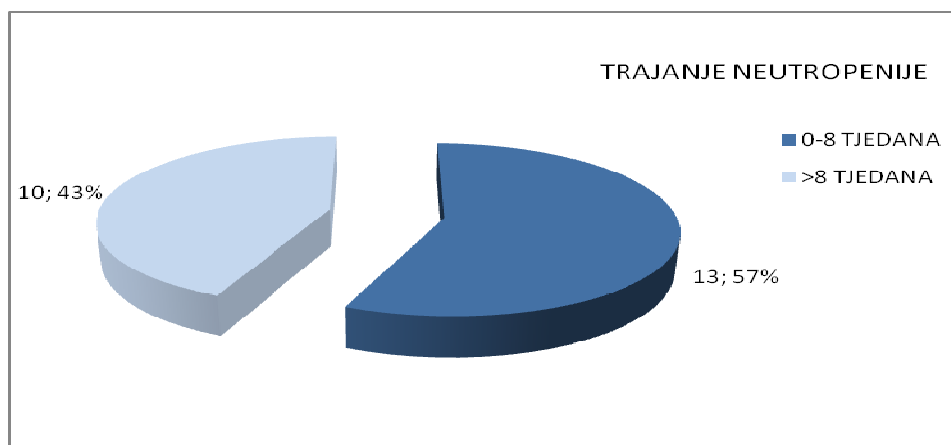
Slika 9. Raspodjela novorođenčadi prema stupnju neutropenije u trenutku laboratorijskog ispitivanja ANN N=23



ABN u mm³= apsolutni broj neutrofila u mm³; 0-500= teška neutropenija, 501-1000= umjerena neutropenija, 1001-1500= blaga neutropenija

9 od 23 (39%) novorođenčadi imalo je teški oblik neutropenije (ABN < 500 u mm³), dok je 15 od 23 (65%) bila prisutna umjerena ili blaga neutropenija (ABN od 500 do 1500 u mm³). Raspon broja neutrofila u mm³ bio je od 0 do 1400, medijan 550.

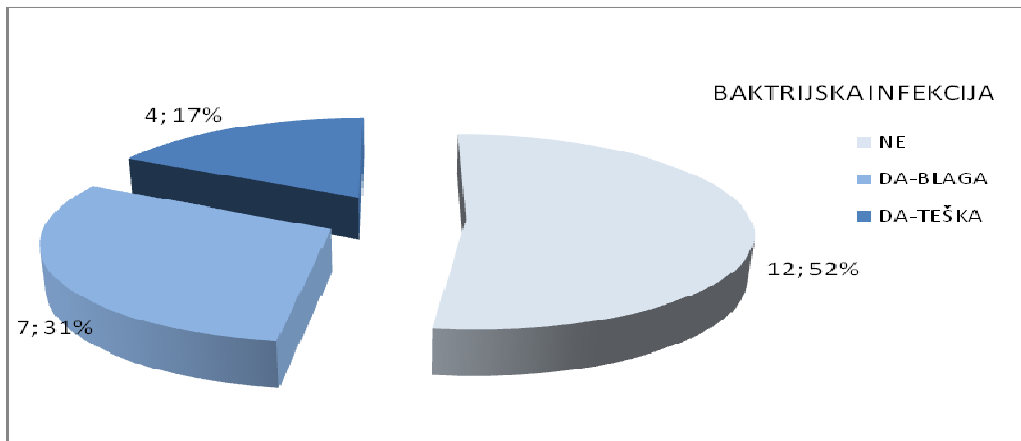
Slika 10. Raspodjela novorođenčadi prema trajanju neutropenije N=23



U 13 od 23 (57%) novorođenčadi neutropenija je trajala do 8 tjedana starosti. Raspon trajanja neutropenije bio je od 1 do 24 tjedna, medijan 8 tjedana.

Slika 11. Raspodjela novorođenčadi prema prisutnosti bakterijske infekcije

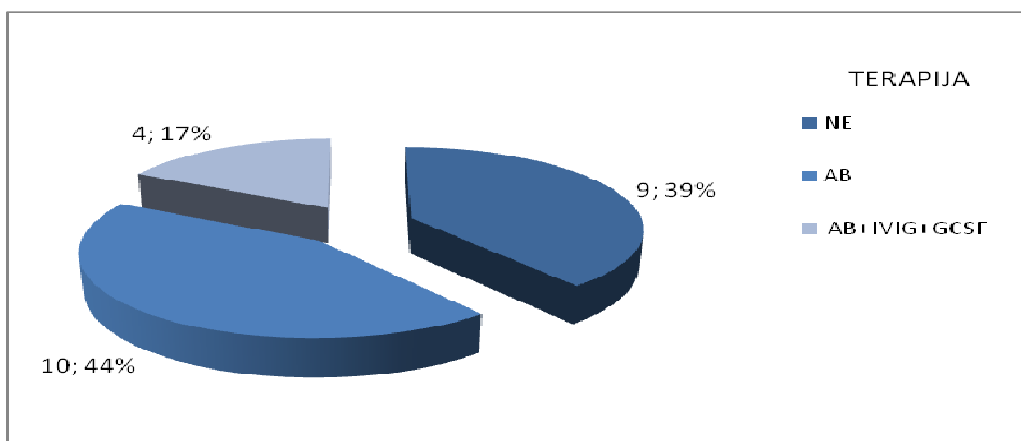
N=23



NE=nije bilo bakterijske infekcije, DA-BLAGA= blaga bakterijska infekcija, DA-TEŠKA=teška bakterijska infekcija

U 12/23 (52%) novorođenčadi nije imalo bakterijsku infekciju. U 7 od 23 (31%) imalo je blagi oblik kožne infekcije (omphalitis), dok je teški oblik bakterijske infekcije imalo 4 od 23 (17%) novorođenčadi.

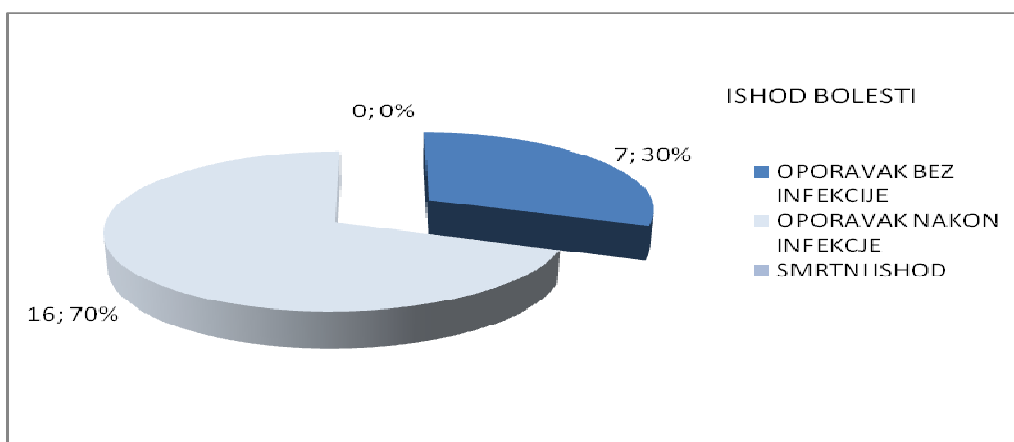
Slika 12. Raspodjela novorođenčadi prema terapiji N=23



NE= bez terapije, AB=antibiotici, IVIG=intravenozni gamaglobulini, G-CSF granulocitni faktor rasta

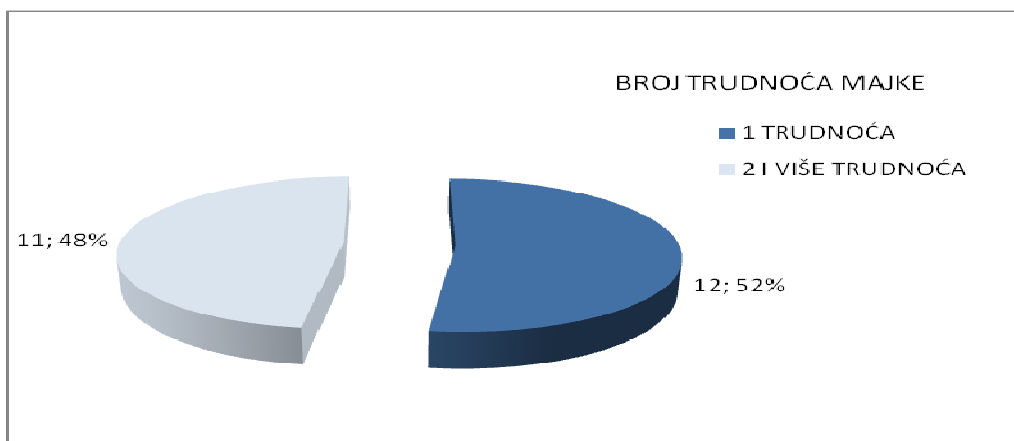
U 9/23 (39%) nije primijenjena nikakva terapija.

Slika 13. Raspodjela novorođenčadi prema ishodu bolesti N=23



U 16/23 (70%) novorođenčadi ishod bolesti bio je potpuni oporavak bez bakterijske infekcije. U 7 od 23 (30%) novorođenčadi potpuni oporavak uslijedio je nakon izlječenja bakterijske infekcije. Nije zabilježen niti jedan smrtni ishod bolesti.

Slika 14. Raspodjela novorođenčadi prema broju trudnoća majke N=23



U 12 od 23 (52%) novorođenčadi rođeno je nakon prve trudnoće, a 11 od 23 (48%) rođeno je nakon dvije ili više trudnoća majke.

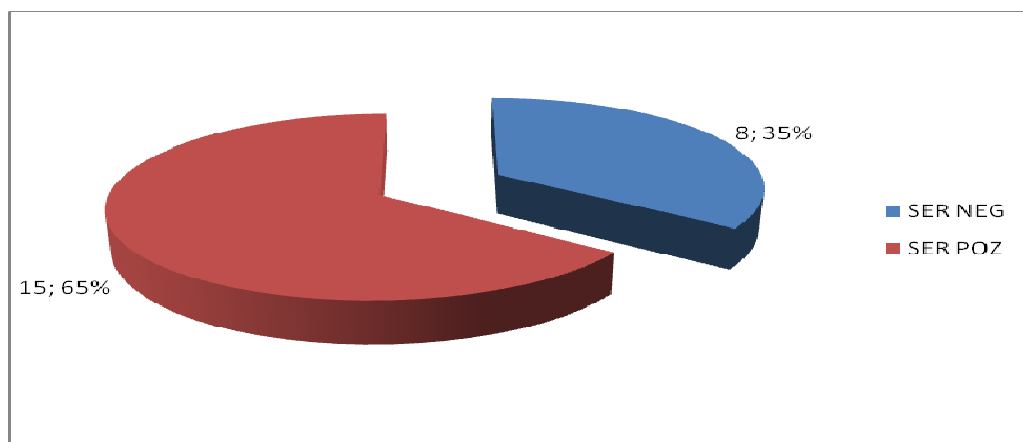
4.2. 3. Analiza podataka laboratorijskog ispitivanja

Laboratorijsko ispitivanje ANN obuhvaćalo je probirno serološko ispitivanje seruma i neutrofila majke i novorođenčeta. Ukoliko je probirno ispitivanje bilo pozitivno testiranje je nastavljeno određivanjem specifičnosti antineutrofilnih protutijela. U slučaju kada nisu dokazana anti-HNA protutijela, slijedilo je probirno ispitivanje za anti-HLA I protutijela. Ako je rezultat bio pozitivan učinjeno je određivanje specifičnosti HLA I protutijela. Za probirno laboratorijsko ispitivanje primijenjena je metoda imunofluorescencije (GIFT), a za određivanje HNA specifičnosti protutijela metoda enzimsko-imunološkog testa, uz imobilizaciju neutrofilnih antigena pomoću monoklonalnih protutijela (MAINA). Probirno serološko ispitivanje za anti-HLA I protutijela učinjeno je metodom mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT) i imunofluorescencije (LIFT, a određivanje specifičnosti anti-HLA I protutijela MLCT metoda.

Ispitivanje je učinjeno prema Algoritmu serološkog ispitivanja ANN, slika 31 str 34.

Rezultati probirnog serološkog ispitivanja ANN prikazani su na slici 15.

Slika 15. Raspodjela novorođenčadi prema rezultatu probirnog serološkog ispitivanja N=23

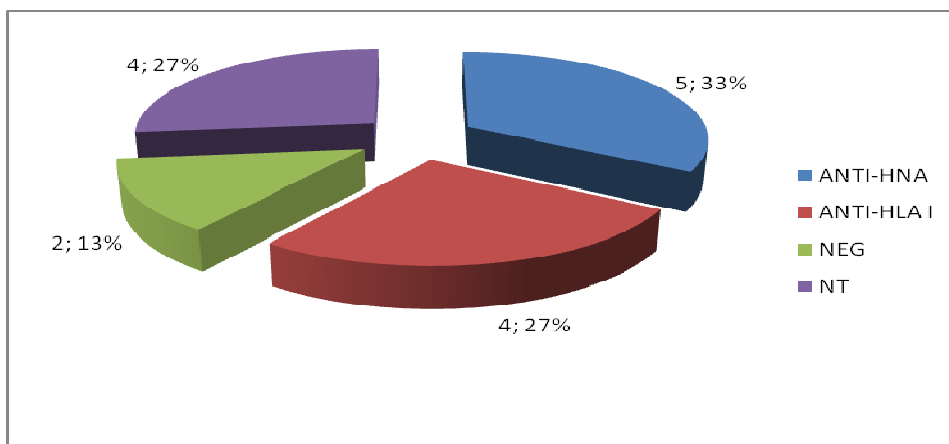


SER NEG= serološko ispitivanje ANN negativno
SER POZ= serološko ispitivanje ANN pozitivno

U 15 od 23 (65%) ispitivanih slučajeva ANN je serološki potvrđena, dok je u 8 od 23 (35%) serološko ispitivanje bilo negativno.

Rezultati određivanja specifičnosti protutijela prikazani su na slici 16.

Slika 16. Raspodjela novorođenčadi prema rezultatu određivanja specifičnosti protutijela N=15



ANTI-HNA= protutijelo usmjereno na specifični specifični neutrofilni antigen
ANTI-HLA I= protutijelo usmjereno na humani leukocitni antigen razreda I
NEG=nisu dokazana specifična neutrofilna niti leukocitna protutijela
NT= nije testirano
(human neutrophil antigen, *engl.*), (human leukocyte antigen, *engl.*)

Određivanje specifičnosti HNA i/ili HLA I učinjeno je u 11 od 15 novorođenčadi u koje je bilo pozitivno probirno serološko ispitivanje ANN. U 5 od 11 slučajeva dokazana su anti-HNA protutijela, a u 4 od 11 dokazana su samo anti-HLA I protutijela. U 2 od 11 slučajeva ispitivanje je bilo negativno.

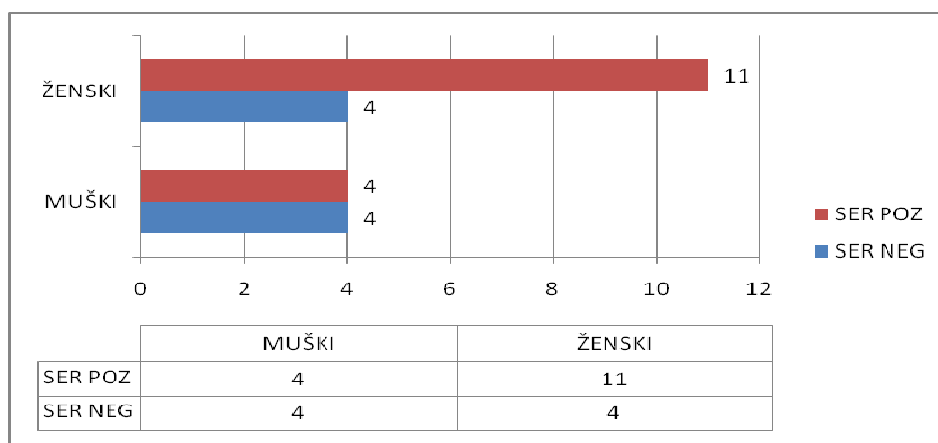
4.2. 4. Statistička analiza podataka o odnosu spola novorođenčeta, uputnoj dijagnozi, dobi u trenutku laboratorijskog ispitivanja, trajanju neutropenije, prisutnosti bakterijske infekcije, broju trudnoća majke, specifičnosti protutijela (anti-HNA i anti-HLA I) prema rezultatu serološkog probirnog ispitivanja za ANN.

Za statističku analizu podataka primijenjen je Hi-kvadrat test uz Yatesovu korekciju i Fisherov egzaktni test, uz razinu statističke značajnosti $p < 0,05$.

Rezultati su prikazani na slikama 17 do 24.

Slika 17. Odnos spola novorođenčeta prema rezultatu serološkog ispitivanja

N=23



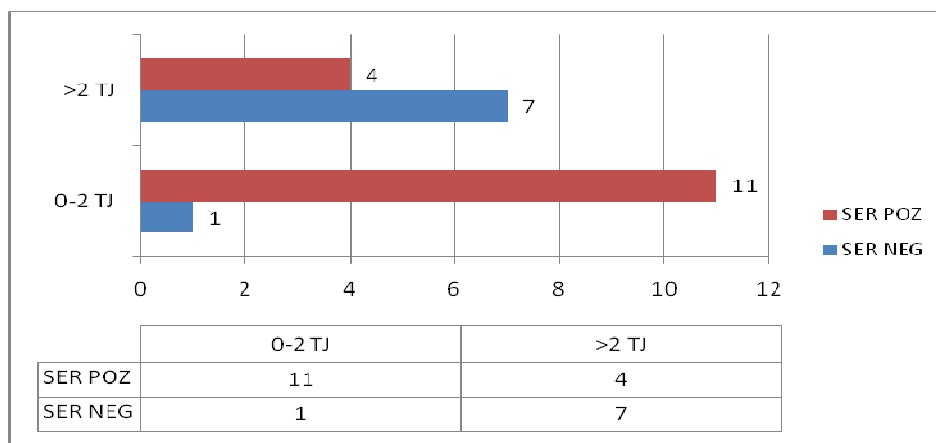
SER POZ=serološko ispitivanje ANN je pozitivno
 SER NEG=serološko ispitivanje ANN je negativno
 MUŠKI/ŽENSKI= spol novorođenčeta

Test	χ^2	p
Hi-kvadrat (χ^2) test uz Yatesovu korekciju	0,435	0,509
Fisherov egzaktni test	-	0,109

Nije bilo statistički značajne razlike u spolu novorođenčeta u odnosu na rezultat serološkog ispitivanja.

Slika 18. Odnos dobi novorođenčeta u trenutku laboratorijskog ispitivanja prema rezultatu serološkog ispitivanja ANN

N=23



SER POZ=serološko ispitivanje ANN je pozitivno

SER NEG=serološko ispitivanje ANN je negativno

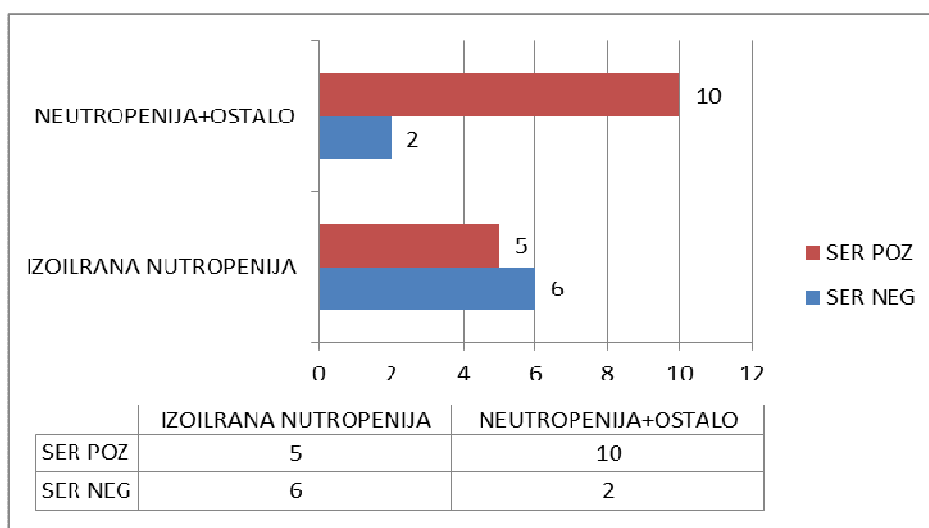
0-2 TJ/>2 TJ= dob novorođenčeta u trenutku lab ispitivanja, u tjednima

Test	χ^2	p
Hi-kvadrat (χ^2) test uz Yatesovu korekciju	5,492	0,019
Fisherov egzaktni test	-	0,009

U skupini novorođenčadi u kojih je ANN serološki potvrđena bilo je 11 od 15 novorođenčadi u dobi manjoj od 2 tjedna u trenutku laboratorijskog ispitivanja. Za razliku od toga, u skupini u kojoj je serološko ispitivanje ANN bilo negativno, samo 1 od 8 novorođenčadi bilo je u dobi manjoj od 2 tjedna u trenutku laboratorijskog ispitivanja, što predstavlja statistički značajnu razliku.

Slika 19. Odnos uputne dijagnoze prema rezultatima serološkog ispitivanja

N=23



SER POZ=serološko ispitivanje ANN je pozitivno

SER NEG=serološko ispitivanje ANN je negativno

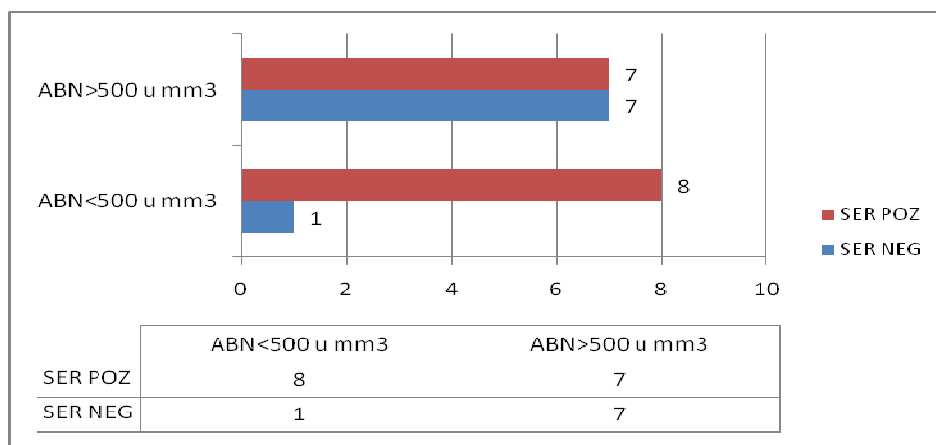
IZOILRANA NEUTROPENIJA/NEUTROPENIJA+OSTALO= uputna dijagnoza

Test	χ^2	p
Hi-kvadrat (χ^2) test uz Yatesovu korekciju	2,152	0,142
Fisherov egzaktni test	-	0,089

Nije bilo statistički značajne razlike između uputne dijagnoze i rezultata serološkog ispitivanja.

Slika 20. Odnos stupnja neutropenije u trenutku laboratorijskog ispitivanja ANN prema rezultatu serološkog ispitivanja

N=23



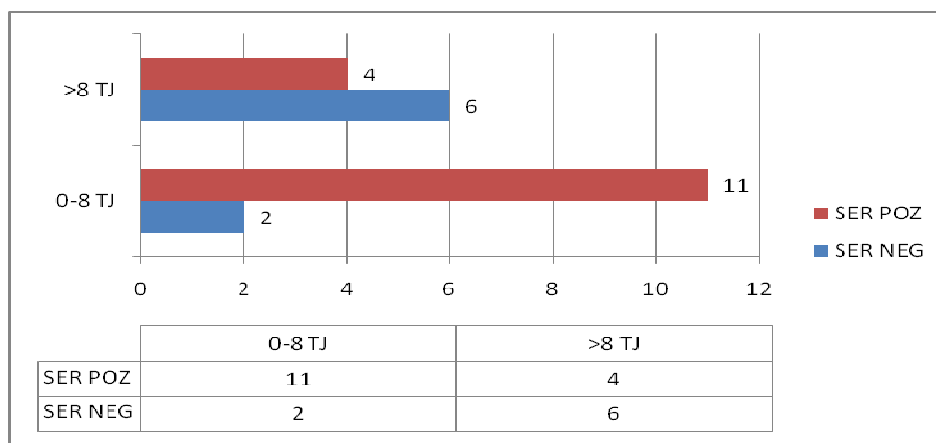
SER POZ=serološko ispitivanje ANN je pozitivno
 SER NEG=serološko ispitivanje ANN je negativno
 ABN= apolutni broj neutrofila u mm³

Test	χ^2	p
Hi-kvadrat (χ^2) test uz Yatesovu korekciju	2,139	0,143
Fisherov egzaktni test	-	0,086

Iako je teški oblik neutropenije opažen u 8 od 15 novorođenčadi sa serološki pozitivnom ANN, a samo u 1 od 8 novorođenčadi sa serološki negativnom ANN, nije nađena statistički značajna razlika između stupnja neutropenije i rezultata serološkog ispitivanja.

Slika 21. Odnos trajanja neutropenije prema rezultatu serološkog ispitivanja

N=23



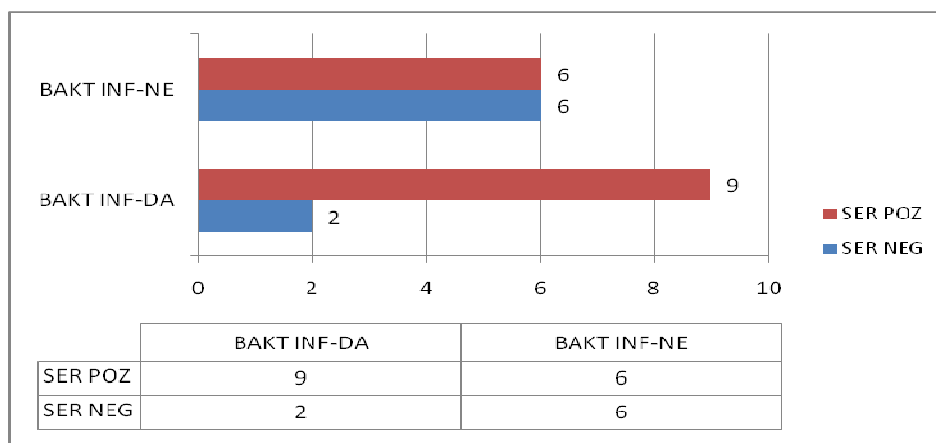
SER POZ=serološko ispitivanje ANN je pozitivno
 SER NEG=serološko ispitivanje ANN je negativno
 0-8 TJ/>8 TJ= trajanje neutropenije u tjednima

Test	χ^2	p
Hi-kvadrat (χ^2) test uz Yatesovu korekciju	3,188	0,074
Fisherov egzaktni test	-	0,039

U 11 od 15 novorođenčadi u kojih je ANN serološki potvrđena, neutropenija je trajala do 8 tjedana starosti novorođenčeta. Za razliku od toga, u skupini u kojoj je serološko ispitivanje ANN bilo negativno, samo u 2 od 8 novorođenčadi dužina neutropenije bila je do 8 tjedana, što predstavlja statistički značajnu razliku.

Slika 22. Odnos prisutnosti bakterijske infekcije prema rezultatu serološkog ispitivanja

N=23



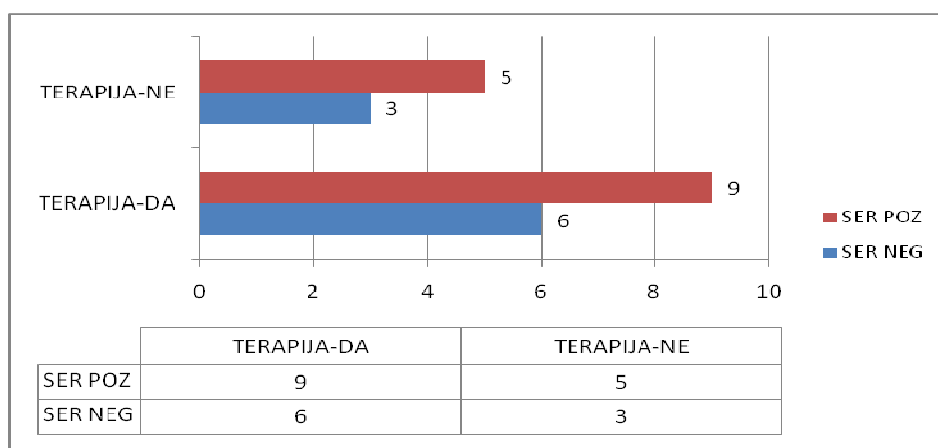
SER POZ=serološko ispitivanje ANN je pozitivno
 SER NEG=serološko ispitivanje ANN je negativno
 BAKT INF DA/NE= prisutnost bakterijske infekcije

Test	χ^2	p
Hi-kvadrat (χ^2) test uz Yatesovu korekciju	1,351	0,245
Fisherov egzaktni test	-	0,193

Nije bilo statistički značajne razlike između pojave bakterijske infekcije i rezultata serološkog ispitivanja.

Slika 23. Odnos terapije prema rezultatu serološkog ispitivanja

N=23



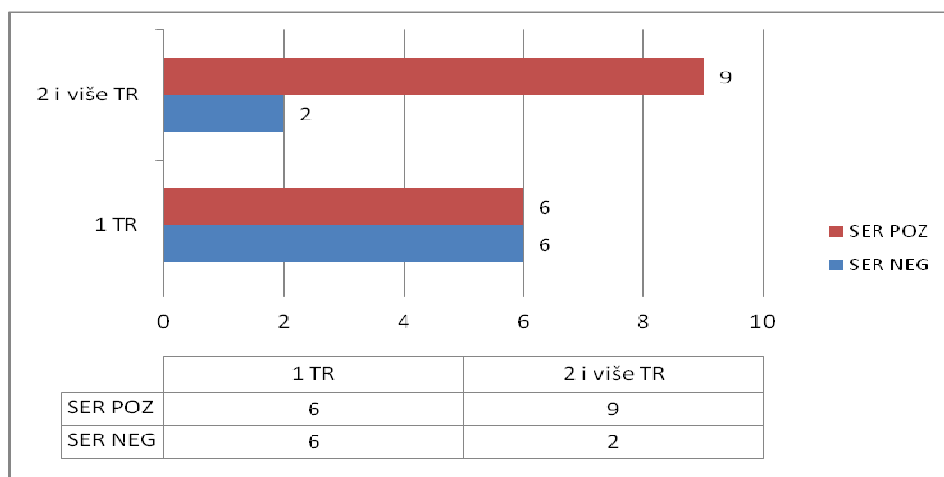
SER POZ=serološko ispitivanje ANN je pozitivno
 SER NEG=serološko ispitivanje ANN je negativno

Test	χ^2	p
Hi-kvadrat (χ^2) test uz Yatesovu korekciju	0,110	0,740
Fisherov egzaktni test	-	1,000

Nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na primjenu terapije i rezultat serološkog ispitivanja.

Slika 24. Odnos broja trudnoća majke i rezultata serološkog ispitivanja

N=23



SER POZ=serološko ispitivanje ANN je pozitivno

SER NEG=serološko ispitivanje ANN je negativno

1 TR/2 i više TR= broj trudnoća majke

Test	χ^2	p
Hi-kvadrat (χ^2) test uz Yatesovu korekciju	1,351	0,245
Fisherov egzaktni test	-	0,193

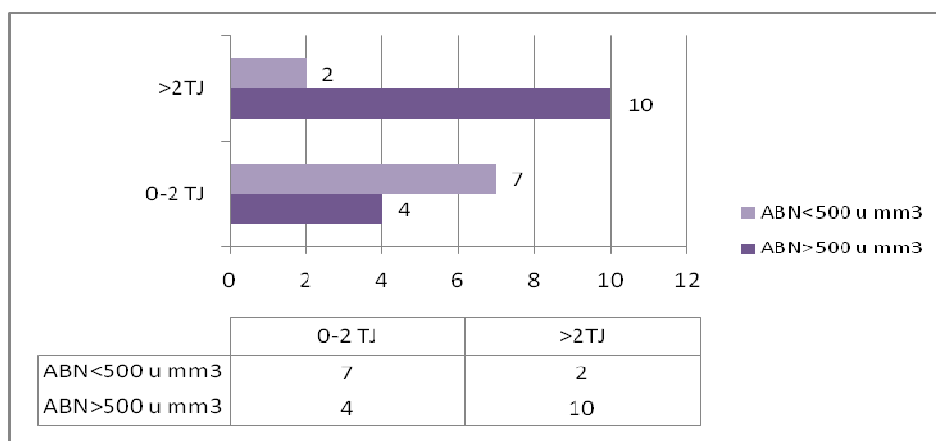
Nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na broj trudnoća majke i rezultat serološkog ispitivanja.

4.2.5. Statistička analiza podataka o odnosu dobi ispitanika u trenutku laboratorijskog ispitivanja, trajanju neutropenije, prisutnosti bakterijske infekcije, specifičnosti protutijela (anti-HNA i anti-HLA I) prema stupnju neutropenije.

Za statističku analizu podataka primijenjen je Hi-kvadrat test uz Yatesovu korekciju i Fisherov egzaktni test, uz razinu statističke značajnosti $p < 0,05$.

Rezultati su prikazani na slikama 25 do 30.

Slika 25. Odnos dobi novorođenčeta u trenutku laboratorijskog ispitivanja ANN prema stupnju neutropenije N=23



ABN= apsolutni broj neutrofila u mm³

ABN < 500 u mm³ = teški stupanj neutropenije

ABN > 500 u mm³ = blagi do umjereni stupanj neutropenije

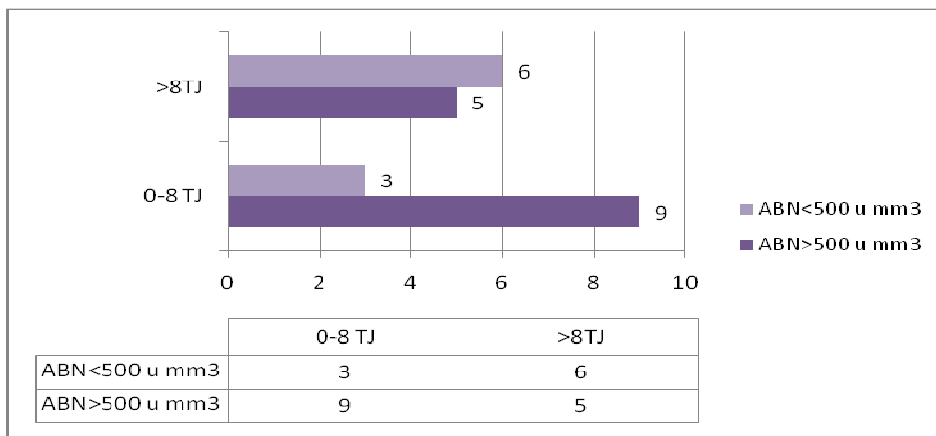
0-2 TJ/>2 TJ= dob novorođenčeta u trenutku lab ispitivanja, u tjednima

Test	χ^2	p
Hi-kvadrat (χ^2) test uz Yatesovu korekciju	3,527	0,06
Fisherov egzaktni test	-	0,036

Samo 2 od 9 novorođenčadi s teškom neutropenijom bilo je serološki negativno više od 2 tjedna u trenutku serološkog ispitivanja ANN. Za razliku od toga, 10 od 14 novorođenčadi sa serološki negativnom ANN imalo je više od 2 tjedna u trenutku serološkog ispitivanja ANN, što je bilo statistički značajno.

Slika 26. Odnos trajanja neutropenije prema stupnju neutropenije

N=23



ABN= apsolutni broj neutrofila u mm³

ABN <500 u mm³ = teški stupanj neutropenije

ABN >500 u mm³ = blagi do umjereni stupanj neutropenije

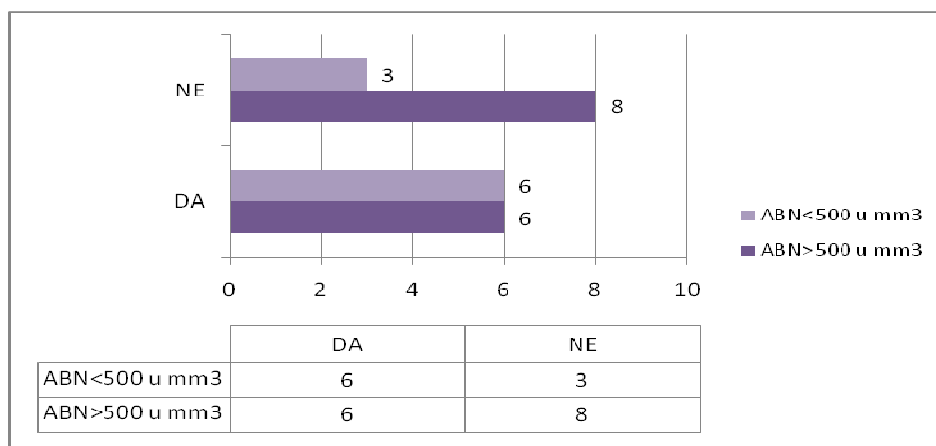
0-8 TJ/>8 TJ= trajanje neutropenije u tjednima

Test	x ²	p
Hi-kvadrat (x ²) test uz Yatesovu korekciju	1,046	0,307
Fisherov egzaktni test	-	0,214

Nije bilo statistički značajne razlike u odnosu duljine trajanja neutropenije i stupnja neutropenije.

Slika 27. Odnos prisutnosti bakterijske infekcije prema stupnju neutropenije

N=23



ABN= apsolutni broj neutrofila u mm³

ABN < 500 u mm³ = teški stupanj neutropenije

ABN > 500 u mm³ = blagi do umjereni stupanj neutropenije

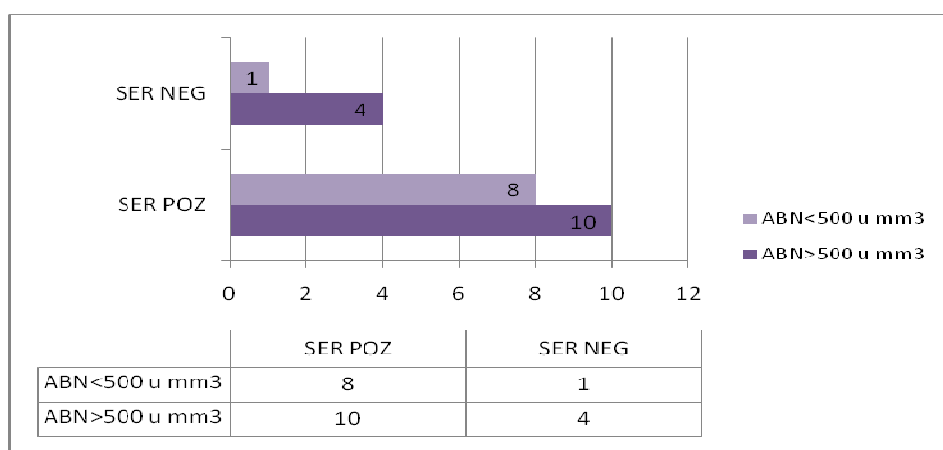
BAKT INF DA/NE= prisutnost bakterijske infekcije

Test	χ^2	p
Hi-kvadrat (χ^2) test uz Yatesovu korekciju	0,473	0,491
Fisherov egzaktni test	-	0,400

Nije bilo statistički značajne razlike u odnosu prisutnosti bakterijske infekcije i stupnja neutropenije.

Slika 28. Odnos rezultata probirnog serološkog ispitivanja prema stupnju neutropenije

N=23



ABN= apsolutni broj neutrofila u mm³

ABN < 500 u mm³ = teški stupanj neutropenije

ABN > 500 u mm³ = blagi do umjereni stupanj neutropenije

SER POZ=serološko ispitivanje ANN je pozitivno

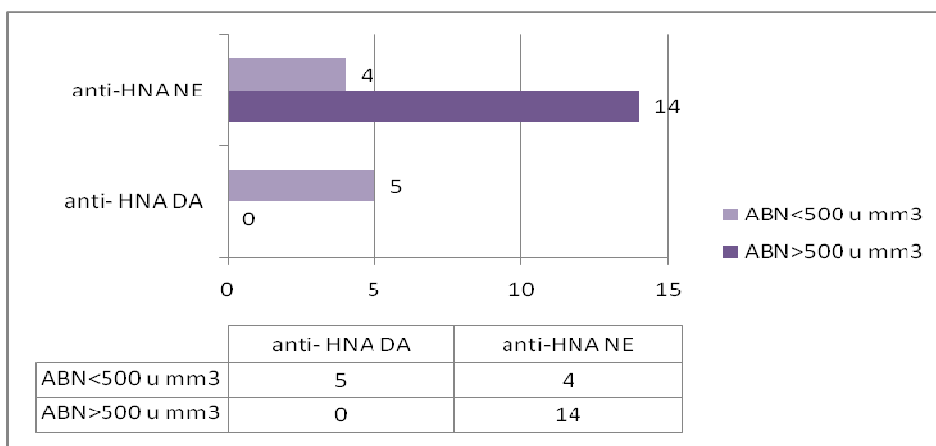
SER NEG=serološko ispitivanje ANN je negativno

Test	x ²	p
Hi-kvadrat (x ²) test uz Yatesovu korekciju	0,224	0,636
Fisherov egzaktni test	-	0,611

Nije bilo statistički značajne razlike u odnosu rezultata probirnog serološkog ispitivanja ANN i stupnja neutropenije.

Slika 29. Odnos prisutnosti anti-HNA protutijela prema stupnju neutropenije

N=23



ABN= apsolutni broj neutrofila u mm³

ABN <500 u mm³ = teški stupanj neutropenije

ABN >500 u mm³ = blagi do umjereni stupanj neutropenije

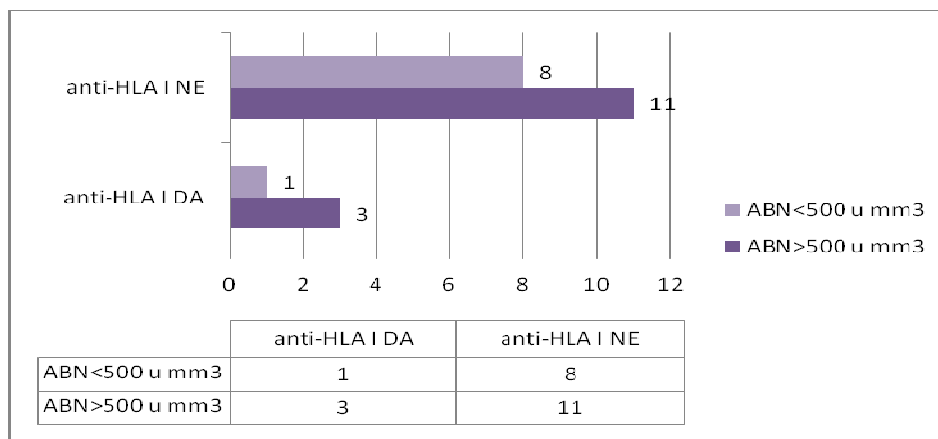
Anti-HNA DA/NE= prisutnost anti-neutrofilnih protutijela

Test	χ^2	p
Hi-kvadrat (χ^2) test uz Yatesovu korekciju	-	-
Fisherov egzaktni test	-	0,003

U skupini novorođenčadi s teškom neutropenijom, anti-HNA protutijela su dokazana u 5 od 9 ispitanika, dok u skupini s blagom i umjerenom neutropenijom anti-HNA protutijela nisu dokazana niti u jednog od 14 novorođenčadi, što je bilo statistički značajno.

Slika 30. Odnos prisutnosti anti-HLA I protutijela prema stupnju neutropenije

N=23



ABN= apsolutni broj neutrofila u mm³

ABN < 500 u mm³ = teški stupanj neutropenije

ABN > 500 u mm³ = blagi do umjereni stupanj neutropenije

Anti-HLA I DA/NE= prisutnost anti-neutrofilnih protutijela

Test	χ^2	p
Hi-kvadrat (χ^2) test uz Yatesovu korekciju	0,005	0,941
Fisherov egzaktni test	-	1,000

Nije bilo statistički značajne razlike u odnosu prisutnosti anti-HLA-I protutijela i stupnja neutropenije.

4.3. Analiza rezultata određivanja specifičnosti protutijela

Laboratorijsko ispitivanje ANN obuhvaćalo je probirno serološko ispitivanje seruma i neutrofila majke i djeteta, metodom direktne i indirektne imunofluorescencije (GIFT). Ukoliko je probirno ispitivanje bilo pozitivno testiranje je nastavljeno određivanjem specifičnosti antineutrofilnih protutijela metodom indirektnog enzimsko-imunološkog testa, uz imobilizaciju neutrofilnih antigena pomoću monoklonalnih protutijela, na panelu HNA tipiranih stanica (MAINA).

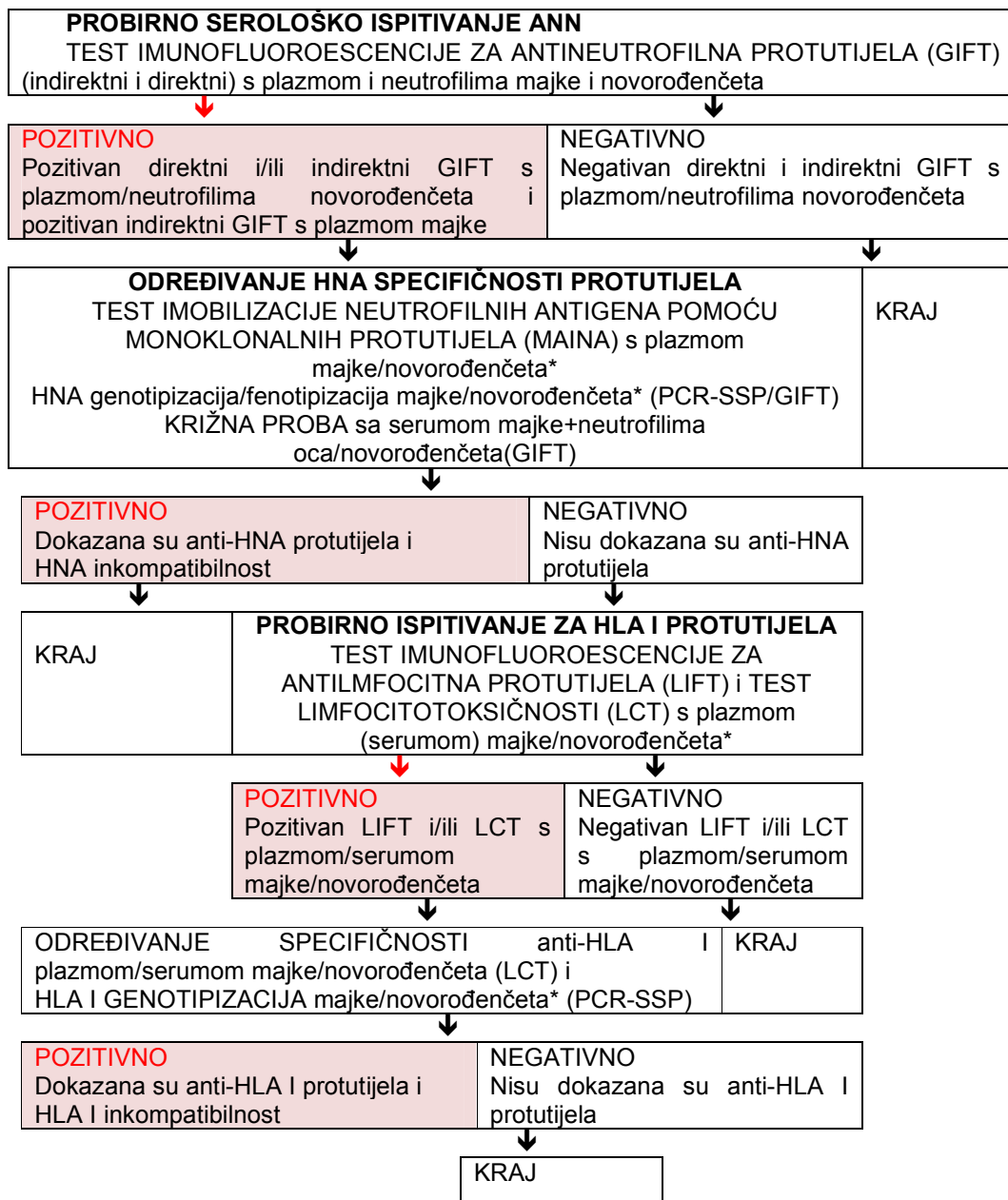
Za probirno serološko ispitivanje seruma i neutrofila majke i djeteta primijenjena je metoda direktne i indirektne imunofluorescencije (GIFT), a za određivanje HNA specifičnosti protutijela metoda indirektnog enzimsko-imunološkog testa, uz imobilizaciju neutrofilnih antigena pomoću monoklonalnih protutijela, na panelu HNA tipiranih stanica (MAINA). Probirno serološko ispitivanje za anti-HLA I protutijela učinjeno je metodom mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT), indirektne imunofluorescencije za anti-limfocitna protutijela (LIFT), a određivanje specifičnosti anti-HLA I protutijela MLCT metodom na panelu HLA tipiranih limfocita.

Za potvrdu seroloških nalaza određivanja specifičnosti protutijela, određeni su neutrofilni antigeni majke i djeteta/oca.

Za određivanje specifičnosti protutijela koristila se plazma /serum majke. Ova ispitivanja nije nužno raditi i s plazmom/ serumom novorođenčeta, osim ako imamo dovoljno primarnog uzorka krvi novorođenčeta. Za određivanje HNA/HLA antigena koristio se uzorak krvi majke i primarni uzorak novorođenčeta, odnosno oca ako iz primarnog uzoraka novorođenčeta nije bila moguća izolacija dovoljne količine DNA ili neutrofila. Ispitivanje je učinjeno prema Algoritmu serološkog i molekularnog ispitivanja ANN, slika 31.

Slika 31. ALGORITAM SEROLOŠKOG I MOLEKULARNOG ISPITIVANJA

ALOIMUNE NEONATALNE NEUTROPENIJE (ANN)



*određivanje specifičnosti protutijela u plazmi novorođenčeta i HNA/HLA tipizacija nije obvezna

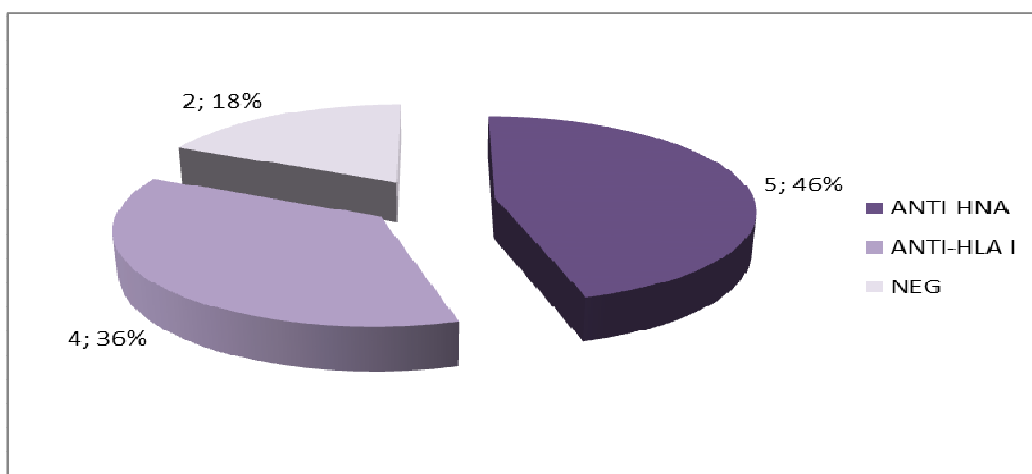
PCR-SSP=polimerazna lančana reakcija-začetnici specifični za sekvencu

Rezultati određivanja specifičnosti anti-HNA i anti-HLA I protutijela i određivanja HNA i HLA I antigena prikazani su na tablicama 3 i 4, te slici 32.

Slika 32

ANTI-HNA i ANTI-HLA I specifičnost protutijela

N=11



U 5 od 11 (46%) slučajeva serološki pozitivne ANN u kojih je učinjeno određivanje specifičnosti protutijela, dokazana su anti-HNA protutijela. U 4 od 11 (36%) dokazana su samo anti-HLA I protutijela, dok se u 2 od 11 (18%) specifičnost protutijela dokazanih u probirnom serološkom ispitivanju nije mogla odrediti.

Tablica 3.

Specifičnost HNA protutijela u plazmi majke i novorođenčeta, HNA-1a, b, c genotip i HNA-2a, 3a fenotip majke i novorođenčeta

N=5

ISPITANIK majka/ novorođenče*	SPECIFIČNOST HNA PROTUTIJELA (plazma)	HNA-1a, b, c GENOTIP (DNK)	HNA-2a, 3a FENOTIP (neutrofili)
majka novorođenče	anti-HNA-2a anti-HNA-2a	HNA-1a , b , c HNA-1a , b , c	HNA-2a = HNA-2a +
majka novorođenče	anti-HNA-2a anti-HNA-2a	HNA-1a , b , c HNA-1a , b , c	HNA-2a = HNA-2a +
majka novorođenče	anti-HNA-1a anti-HNA-1a	HNA-1a=, b , c HNA-1a+ , b , c	HNA-2a , 3a HNA-2a , 3a
majka novorođenče	anti-HNA-1- panreaktivno anti-HNA-1- panreaktivno	HNA-1a=, b=, c= (HNA null) HNA-1a=, b+ , c=	HNA-2a , 3a HNA-2a , 3a
majka novorođenče	anti- HNA-1c anti- HNA-1c	HNA-1a , b , c= HNA-1a , b , c+	HNA-2a , 3a HNA-2a , 3a

*određivanje specifičnosti protutijela u plazmi novorođenčeta i HNA/HLA tipizacija nije obvezna
HNA= humani neutrofilni antigen
DNK= deoksiribonukleinska kiselina

U svim slučajevima rezultati serološkog ispitivanja potvrđeni su HNA genotipizacijom ili fenotipizacijom majke i djeteta i pokazali su inkompatibilnost za odgovarajuće HNA antigene.

Tablica 4.

Specifičnost HLA I protutijela u plazmi majke i novorođenčeta i HLA-A, B, C genotip majke, novorođenčeta i oca

N=4

ISPITANIK	SPECIFIČNOST HLA I PROTUTIJELA (serum)	HLA-A, B, C genotip (DNK)
1 majka novorođenče* otac	anti-HLA-B-49 anti-HLA-B-49 -	A*02/*32 B*40/*40 C ^w *02/*03 A*23/*32 B*40/*4901 C ^w *02/*07 A*02/*23 B*3801/*4901 C ^w *02/*12
2 majka novorođenče*	anti- HLA-A-24, B-27 NT	A*03/*68 B*35/*38 C ^w *04/*12 A*03/*24 B*27/*35 C ^w *04/*05
3 majka novorođenče* otac	anti- HLA-A-2, -B-18 NT -	A*01/*30 B*44/*51 C ^w *04/*12 A*02/*30 B*18/*44 C ^w *04/*07 A*02 B*18/*35 C ^w *04/*07
4 majka novorođenče*	anti- HLA-B-45 NT	A*02/*26 B*18/*38 C ^w *07/*12 A*02 B*18/*45 C ^w *06/*07

*određivanje specifičnosti protutijela u plazmi novorođenčeta i HNA/HLA tipizacija nije obvezna
HLA= humani leukocitni antigen
DNK= deoksiribonukleinska kiselina
NT= nije testirano

U svim slučajevima rezultati serološkog ispitivanja potvrđeni su HLA I genotipizacijom majke i djeteta i pokazali su inkompatibilnost za odgovarajuće HLA I antigene.

4.4. Analiza kliničko-laboratorijskih podataka za četiri novorođenčeta sa serološki potvrđenom ANN uzrokovanom samo anti-HLA I protutijelima

4.4.1. Prikaz novorođenčeta 1

Muško novorođenče, rođeno u terminu, iz druge trudnoće urednog tijeka. Neposredno nakon poroda opažena izolirana umjerena neutropenija s 640 neutrofila u mm^3 . Kretanje broja neutrofila prikazano je na slici 33. Najniži broj neutrofila izmjeren je 16. dana života i bio je 410 neutrofila u mm^3 . Ostali laboratorijski nalazi bili su normalni. Nije bilo kliničkih znakova infekcije neposredno nakon poroda. Majka je imala uredan broj neutrofila u krvi.

Omphalitis je opžen 3. dana života i trajao je 7 dana od uvođenja antibiotske terapije prema antibiogramu. Nakon izliječenja omphalitisa, za vrijeme trajanja neutropenije nije bilo novih bakterijskih infekcija. Usprkos niskom broju neutrofila, novorođenče je 21. dana života otpušteno na kućnu njegu, bez znakova infekcije. Na kontrolnom pregledu s 8 tjedana starosti zabilježen je uredan broj neutrofila u krvi djeteta.

Rezultati serološkog ispitivanja prikazani su na tablici 5. Oni pokazuju prisutnost anti-HLA B49 protutijela u plazmi majke i novorođenčeta. Specifična neutrofilna protutijela (HNA) nisu dokazana. HNA genotip majke je HNA-1a+ , -b+ , -c= i podudaran je s HNA genotipom djeteta.

Na majčinim neutrofilima nisu dokazana antineutrofilna autoprotutijela. Dodatna serološka ispitivanja majčine plazme adsorbirane s HLA- B 49 pozitivnim očevim trombocitima učinjena su u cilju dokazivanja prisutnosti samo HLA I protutijela. Test indirektne imunofluorescencije (križna proba) s neadsorbiranom majčinom

plazmom i očevim granulocitina i limfocitima bili su pozitivni, a s majčinom adsorbiranom plazmom negativni.

Rezultati HLA genotipizacije prikazani su na tablici 4. HLA I genotip potvrđuje HLA B 49 nepodudarnost između majke i djeteta/oca.

Tablica 5: Rezultati serološkog ispitivanja ANN, novorođenče 1

Ispitanik	Test								
	GIFT DT	IT	LIFT IT	Lumi- nex	MAINA CD 16 HNA-1	MAINA CD177 HNA-2	MAINA CD11b/ CD18 HNA-4,-5	MAINA BETA2 MG (HLA I)	MLCT PR ID
Majka	neg	poz	poz	poz	neg	neg	neg	poz	poz anti-HLA B49
Novoro- đenče*	poz	poz	poz	poz	neg	neg	neg	nt	poz anti-HLA B49
Otac HLA-B49	AS NS	KP neg poz	KP neg poz	nt	neg	neg	neg	neg	nt

GIFT= imunofluorescentni test za anti-neutrofilna (granulocitna) protutijela

DT=direktni test, IT=indirektni test

LIFT-IT=indirektni imunofluorescentni test za anti-limfocitna protutijela

Luminex= multiplex-Luminex test za probirno ispitivanje anti-HLA I protutijela

MAINA= indirektni test za antineutrofilna protutijela uz imobilizaciju neutrofilnih antigena pomoću monoklonalnih protutijela usmjerenih na CD 16, CD 177, CD 11b/18 i BETA 2 mikroglobulin

MLCT (PR, ID)= test mikrolimfocitotoksičnosti (probir, identifikacija)

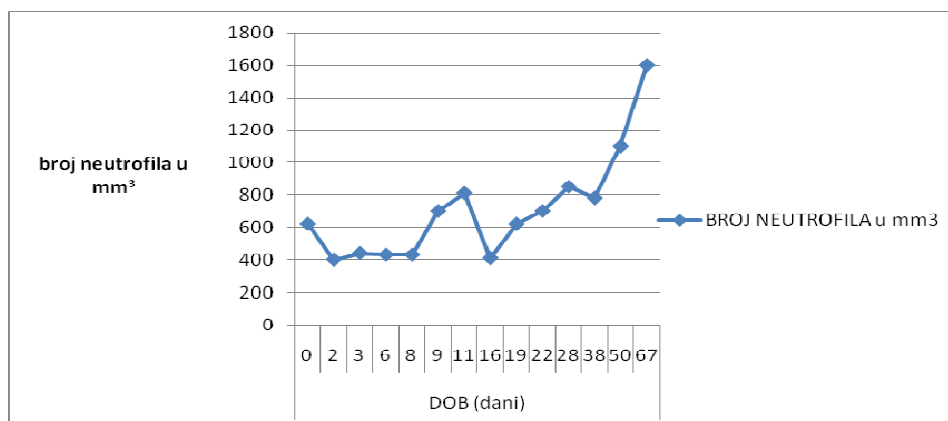
KP= križna proba

poz = pozitivan, neg = negativan, nt= nije testirano

AS= adsorbirani serum, NS= neadsorbirani serum

*određivanje specifičnosti protutijela u plazmi novorođenčeta i HNA/HLA tipizacija nije obvezna

Slika 33 Kretanje broja neutrofila u krvi novorođenčeta 1



4.4.2. Prikaz novorođenčeta 2

Muško novorođenče, rođeno u terminu, iz prve trudnoće urednog tijeka. Serološko laboratorijsko ispitivanje ANN zatraženo je s 4,5 tjedana starosti djeteta, radi perzistentne blage neutropenije, s brojem neutrofila 1400 umm^3 , bez kliničko-laboratorijskih znakova bakterijske infekcije. Dijete nije primalo nikakvu terapiju. Uz neutropeniju dijete je imalo blažu trombocitopeniju. Boj trombocita u krvi novorođenčeta 1. dana života bio je $50 \times 10^9/\text{L}$, uz petehijalna krvarenja, a na dan laboratorijskog ispitivanja $77 \times 10^9/\text{L}$, bez znakova krvarenja. Ostali laboratorijski nalazi uredni. Majka je imala uredan broj neutrofila i trombocita u trenutku laboratorijskog ispitivanja, ali je tijekom trudnoće imala blagu gestacijsku trombocitopeniju.

Na kontrolnom pregledu sa 6 tjedana starosti djeteta, zabilježen je uredan broj neutrofila (3100 u mm^3), te uredn broj trombocita ($190 \times 10^9/\text{L}$).

Rezultati serološkog ispitivanja prikazani su na tablici 6. Oni pokazuju prisutnost anti-HLA-A24 i B27 protutijela u plazmi majke i novorođenčeta. Specifična neutrofilna protutijela (HNA) nisu dokazana. HNA genotip majke je HNA-1a= , -b+, -c+ i podudaran je s HNA genotipom djeteta.

Dodatna serološka ispitivanja majčine plazme adsorbirane s trombocitima HLA-A24 i B27 pozitivnog davatelja krvi potvrdila su prisutnost samo HLA I protutijela. Test indirektno imunofluorescencije (križna proba) s neadsorbiranom majčinom plazmom i HLA-A24 i B27 pozitivnim davateljevim granulocitima i limfocitima bili su pozitivni, a s majčinom adsorbiranom plazmom negativni.

Na majčinim neutrofilima nisu dokazana antineutrofilna autoprotutijela.

Rezultati HLA genotipizacije prikazani su na tablici 4. HLA I genotip potvrđuje HLA- A24 i B27 nepodudarnost između majke i djeteta.

Ispitivanjem uzorka krvi majke za antitrombocitna protutijela dokazana su panreaktivna antitrombocitna autoprotutijela na glikoproteinski kompleks IIb-IIIa i Ia-IIa. Ova protutijela nisu dokazana u plazmi novorođenčeta.

Tablica 6: Rezultati serološkog ispitivanja ANN, novorođenče 2

Ispitanik	Test								
	GIFT DT	IT	LIFT IT	Lumi- nex	MAINA CD 16 HNA-1	MAINA CD177 HNA-2	MAINA CD11b/ CD18 HNA-4,-5	MAINA BETA2 MG (HLA I)	MLCT PR ID
Majka	neg	poz	poz	poz	neg	neg	neg	poz	poz anti-HLA A24, B27
Novoro- đenče*	poz	sl poz	nt	sl poz	neg	neg	neg	nt	nt
DDK HLA- A24 B27	AS NS	KP neg poz	KP neg poz	nt	neg	neg	neg	neg	nt

GIFT= imunofluorescentni test za anti-neutrofilna (granulocitna) protutijela

DT=direktni test, IT=indirektni test

LIFT-IT=indirektni imunofluorescentni test za anti-limfocitna protutijela

Luminex= multiplex-Luminex test za probirno ispitivanje anti-HLA I protutijela

MAINA= indirektni test za antineutrofilna protutijela uz imobilizaciju neutrofilnih antigena pomoću monoklonalnih protutijela usmjerenih na CD 16, CD 177, CD 11b/18 i BETA 2 mikroglobulin

MLCT (PR, ID)= test mikrolimfocitotoksičnosti (probir, identifikacija)

DDK= dobrovoljni davatelj krvi, pozitivan za odgovarajući HLA I antigen

KP= križna proba

poz = pozitivan, sl poz= slabo pozitivan, neg = negativan, nt= nije testirano

*određivanje specifičnosti protutijela u plazmi novorođenčeta i HNA/HLA tipizacija nije obvezna

4.4.3. Prikaz novorođenčeta 3

Muško novorođenče, rođeno u terminu, iz druge trudnoće urednog tijeka.

4. dana života djeteta opažena je izolirana blaga neutropenija s 1300 neutrofila u mm³, bez znakova bakterijske infekcije. Najniži broj neutrofila bio je 1000 u mm³, izmjeren je 6. dana života djeteta. Kretanje broja neutrofila u krvi djeteta prikazano je na slici 34. Ostali laboratorijski nalazi bili su normalni. Majka je imala uredan broj neutrofila u krvi. Na kontrolnom pregledu s 3 tjedana starosti zabilježen je

uredan broj neutrofila u krvi djeteta. Za vrijeme trajanja neutropenije nije bilo infekcija, te nije primijenjeno nikakvo liječenje.

Rezultati serološkog ispitivanja prikazani su na tablici 7. Oni pokazuju prisutnost anti-HLA A2, B18 protutijela u plazmi majke i novorođenčeta. Specifična neutrofilna protutijela (HNA) nisu dokazana. Na majčinim neutrofilima nisu dokazana antineutrofilna autoprotutijela. Dodatna serološka ispitivanja majčine plazme adsorbirane s očevim trombocitima potvrdila su prisutnost samo HLA I protutijela. Rezultati HLA genotipizacije prikazani su na tablici 4. HLA tipiranje potvrđuje HLA A2 i B18 nepodudarnost između majke i djeteta.

Tablica 7: Rezultati serološkog ispitivanja ANN, novorođenče 3

Plazma	Test								
	GIFT DT	IT	LIFT IT	Lumi- nex	MAINA CD 16 HNA-1	MAINA CD177 HNA-2	MAINA CD11b/ CD18 HNA-4,-5	MAINA BETA2 MG (HLA I)	MLCT PR ID
Majka	neg	poz	poz	poz	neg	neg	neg	poz	poz anti-HLA A2, B18
Novoro- đenče*	poz	sl poz	nt	neg	neg	neg	neg	neg	nt
Otac HLA- A2 B18	AS NS	KP neg sl poz	KP neg poz	nt	nt	neg	neg	neg	nt

GIFT= imunofluorescentni test za anti-neutrofilna (granulocitna) protutijela

DT=direktni test, IT=indirektni test

LIFT-IT=indirektni imunofluorescentni test za anti-limfocitna protutijela

Luminex= multiplex-Luminex test (Labscreen HLA I kit) za probirno ispitivanje anti-HLA I protutijela

MAINA= indirektni test za antineutrofilna protutijela uz imobilizaciju neutrofilnih antigena pomoću monoklonalnih protutijela usmjerenih na CD 16, CD 177, CD 11b/18 i BETA 2 mikroglobulin

MLCT (PR, ID)= test mikrolimfocitotoksičnosti (probir, identifikacija)

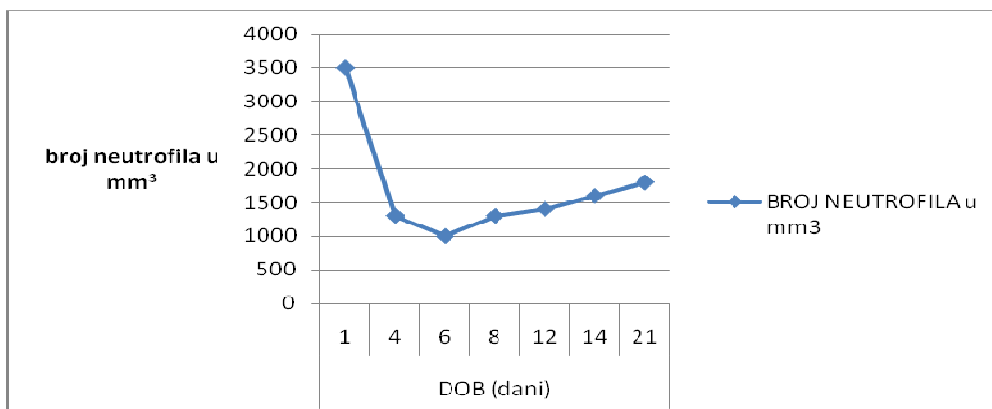
KP= križna proba

poz = pozitivan, sl poz= slabo pozitivan, neg = negativan, nt= nije testirano

AS= adsorbirani serum, NS= neadsorbirani serum

*određivanje specifičnosti protutijela u plazmi novorođenčeta i HNA/HLA tipizacija nije obvezna

Slika 34. Kretanje broja neutrofila u krvi novorođenčeta 3



4.4.4. Prikaz novorođenčeta 4

Žensko novorođenče, rođeno u terminu, iz prve trudnoće urednog tijeka. 7. dana života djeteta opažena je izolirana blaga neutropenija s 1200 neutrofila u mm³, što je bio najniži zabilježeni broj neutrofila. Nije bilo kliničko-laboratorijskih znakova bakterijske infekcije.

Boj trombocita u krvi novorođenčeta 1. dana života bio je $50 \times 10^9/L$, a na dan laboratorijskog ispitivanja $130 \times 10^9/L$, bez znakova krvarenja. Ostali laboratorijski nalazi bili su uredni. Majka je imala uredan broj neutrofila i trombocita u krvi.

Na kontrolnom pregledu s 2 tjedana starosti zabilježen je uredan broj neutrofila u krvi djeteta. Za vrijeme trajanja neutropenije nije bilo infekcija, te nije primijenjeno nikakvo liječenje.

Rezultati serološkog ispitivanja prikazani su na tablici 7. Oni pokazuju prisutnost anti-HLA B45 protutijela u plazmi majke i novorođenčeta. Specifična neutrofilna protutijela (HNA) nisu dokazana. HNA genotip majke je HNA-1a+ , -b+ , -c+ i podudaran je s HNA genotipom djeteta. Na majčinim neutrofilima nisu dokazana antineutrofilna autoprotutijela. Dodatna serološka ispitivanja majčine plazme

adsorbirane s trombocitina HLA-B 45 pozitivnog davatelja krvi potvrdila su prisutnost samo HLA I protutijela. Rezultati HLA genotipizacije prikazani su na tablici 4. HLA tipiranje potvrđuje HLA B45 nepodudarnost između majke i djeteta.

Tablica 8: Rezultati serološkog ispitivanja ANN, novorođenče 4

Ispitanik	Test								
	GIFT DT	IT	LIFT IT	Lumi- nex	MAINA CD 16 HNA-1	MAINA CD177 HNA-2	MAINA CD11b/ CD18 HNA-4,-5	MAINA BETA2 MG (HLA I)	MLCT PR ID
Majka	neg	poz	poz	poz	neg	neg	neg	poz	poz anti-HLA B45
Novoro- đenče*	poz	sl poz	poz	poz	neg	neg	neg	neg	nt
DDK HLA- B45	AS NS	KP neg sl poz	KP neg poz	nt	neg	neg	neg	neg	nt

GIFT= imunofluorescentni test za anti-neutrofilna (granulocitna) protutijela

DT=direktni test, IT=indirektni test

LIFT-IT=indirektni imunofluorescentni test za anti-limfocitna protutijela

Luminex= multiplex-Luminex test (Labscreen HLA I kit) za probirno ispitivanje anti-HLA I protutijela

MAINA= indirektni test za antineutrofilna protutijela uz imobilizaciju neutrofilnih antigena pomoću monoklonalnih protutijela usmjerenih na CD 16, CD 177, CD 11b/18 i BETA 2 mikroglobulin

MLCT (PR, ID)= test mikrolimfocitotoksičnosti (probir, identifikacija)

KP= križna proba

DDK= dobrovoljni davatelj krvi, pozitivan za odgovarajući HLA I antigen

poz = pozitivan, sl poz= slabo pozitivan, neg = negativan, nt= nije testirano

AS= adsorbirani serum, NS= neadsorbirani serum

*određivanje specifičnosti protutijela u plazmi novorođenčeta i HNA/HLA tipizacija nije obvezna

4.4.5. Analiza kliničko-laboratorijskih podataka temeljena na prikazu četiri bolesnika sa serološki potvrđenom ANN, uzrokovanom samo anti-HLA I protutijelima, pokazala je:

- 1) bolest je u svim slučajevima imala blagi tijek
- 2) prosječno trajanje neutropenije bilo je 4,5 tjedana
- 3) bakterijska infekcija (omphalitis) pojavila se u 1 od 4 novorođenčeta, trajala je 7 dana i izliječena je nakon primjene antibiotika prema nalazu antibiograma
- 4) niti jedno novorođenče nije primalo lijekove za podizanje broja neutrofila u krvi
- 5) u svim slučajevima serološkim ispitivanjem dokazana su samo anti-HLA I protutijela, a anti-HNA protutijela nisu dokazana usprkos primjene najosjetljivije metode (MAINA)
- 6) u 3 od 4 novorođenčadi anti-HLA I protutijela dokazana su i u plazmi novorođenčeta, uz primjenu multiplex-Luminex metode.
- 7) u svim slučajevima rezultati serološkog ispitivanja potvrđeni su HLA I genotipizacijom majke i djeteta i pokazali su inkompatibilnost za odgovarajuće HLA I antigene.

5. RASPRAVA

Aloimuna neonatalna neutropenija rezultat je imunizacije majke tijekom trudnoće na neutrofilne antigene naslijeđene od oca. Pasivni prijelaz majčinih specifičnih neutrofilnih protutijela IgG razreda, putem posteljice u fetalnu cirkulaciju i oblaganje fetalnih neutrofila, može uzrokovati tešku neutropeniju u novorođenčeta. (111) Specifičnost aloprotutijela najčešće je usmjerena na HNA-1a, HNA-1b i HNA-2a antigene. Klinička sumnja na ANN postavlja se u slučaju izolirane neutropenije (<1500 neutrofila/ μL) u novorođenčeta. (3, 111, 112) Za konačnu potvrdu dijagnoze ANN potrebno je dokazati anti-neutrofilna aloprotutijela u krvi majke usmjerena na specifične neutrofilne antigene na neutrofilima djeteta/oca. (10) Iako je ANN rijetka bolest, teški oblici povezani s bakterijskim infekcijama i sepsom koji mogu imati smrtni ishod nalažu ranu dijagnostiku i liječenje ove bolesti.

Prema podacima iz literature točna učestalost ANN nije poznata. Procjenjuje se na 1 slučaj na 350 do 2000 živorođene djece, a učestalost teških oblika bolesti 1 slučaj na 1000 do 6000 živorođenih, ovisno o načinu ispitivanja, primjeni laboratorijskog probirnog ispitivanja za anti-neutrofilna protutijela, neutrofilne antigene i broja neutrofila u krvi, te ispitivanoj populaciji. (1-3, 9, 111-114)

Prijavljeni slučajevi ANN odnose se uglavnom na referentne centre pojedinih zemalja, kojima je dostupno specifično serološko ispitivanje anti-neutrofilnih protutijela i antigena, nužno za konačnu potvrdu dijagnoze bolesti. (1)

Prema dostupnim podacima iz literature, učestalost ANN u Hrvatskoj nije ispitivana. Prema podacima Odsjeka za imunogenetiku trombocita, leukocita i hemostazu, Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu u Zagrebu, broj zahtjeva za laboratorijsko ispitivanje ANN iznimno je mali, i iznosi od 0 do 1 godišnje. Za pretpostaviti je da se serološko ispitivanje ANN provodi samo u teškim oblicima bolesti, dok ostali ostaju ne zamijećeni.

U ovom istraživanju prikupljeni su i analizirani rezultati serološkog i molekularnog laboratorijskog ispitivanja i klinički podaci za 23 slučaja sumnje na aloimunu neonatalnu neutropeniju, koji su upućeni na laboratorijsko ispitivanje ANN u Odsjek za imunogenetiku trombocita, leukocita i hemostazu, Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu u Zagrebu i Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i staničnu terapiju Kliničkog bolničkog centra- Zagreb u Zagrebu, u razdoblju od 1998. do 2008. godine. Obzirom da je u Republici Hrvatskoj (RH) serološko ispitivanje ANN moguće učiniti samo u navedena dva sub-specijalistička laboratorija, prikupljeni su svi slučajevi sumnje na ANN u RH za koje je traženo serološko ispitivanje u navedenom razdoblju.

Retrospektivno su analizirani podaci od 1998. do 2006. godine, a prospektivno su prikupljeni podaci u 2007. i 2008. godini. Ukupan broj zahtjeva za laboratorijsko ispitivanje ANN u RH u jedanaestogodišnjem razdoblju bio je 23. U 15/23 slučaja laboratorijsko ispitivanje ANN bilo je pozitivno, čime je dijagnoza ANN serološki potvrđena.

Analiza retrospektivno prikupljenih podataka za razdoblje od 1998. do 2006. godine pokazuje da je učestalost serološki potvrđene ANN u RH 1 slučaj na 38099 živorođene djece. U razdoblju od 2007. do 2008. godine u kojem su podaci

prikupljeni prospektivno, broj serološki potvrđenih slučajeva ANN bio je dvostruko veći, 1:17323 živorođenih.

Učestalost serološki potvrđene ANN u razdoblju retrospektivnog prikupljanja podataka, deseterostruko je niža od podataka iz literature i potvrđuje pretpostavku da se ANN u RH premalo serološki ispituje i da je stvarna učestalost bolesti viša od opažene. Iako je broj zahtjeva za serološko ispitivanje ANN u razdoblju prospektivnog prikupljanja podataka bio trostruko veći od razdoblja u kojem su podaci prikupljeni retrospektivno, a broj serološki potvrđenih ANN udvostručen, i dalje je višestruko manji od očekivanog.

Ovi podaci ukazali su na potrebu dodatnih aktivnosti u cilju boljeg prepoznavanja i serološke dijagnostike ANN. Stoga je provedena prospektivna pilot studija koja je obuhvaćala praćenje broja neutrofila u krvi svoj novorođenčadi između 1. i 3. dana života. Studija je provedena u Rodilištu Kliničke bolnice „Sestre Milosrdnice” (KB SM), u dvogodišnjem razdoblju (2007. i 2008. godina). U svim slučajevima kada je apsolutni broj neutrofila u krvi novorođenčeta bio <1500 u mm^3 učinjeno je probirno serološko ispitivanje uzorka krvi majke i novorođenčeta za ANN. Ako je probirno ispitivanje bilo pozitivno, nastavljeno je s određivanjem specifičnosti anti-neutrofilnih protutijela. Također, praćen je tijek i ishod bolesti, te primijenjeno liječenje. Podaci su uspoređeni s retrospektivno prikupljenim podacima o broju živorođene djece, broju zahtjeva za serološko ispitivanje i broju serološki potvrđenih slučajeva ANN u ovom Rodilištu, u razdoblju od 1998. do 2006. godine.

U prospektivnoj pilot studiji od 2007. do 2008. godine broj zahtjeva za serološko ispitivanje ANN bio je 4. U 2 od 4 slučaja ANN je serološki potvrđena, odnosno otkriven je 1 slučaj ANN na 2843 živorođene djece. U razdoblju od 1998.

do 2006. godine broj zahtjeva za serološko ispitivanje ANN bio je 6. U 5 od 6 slučajeva ANN je serološki potvrđena, odnosno otkriven je 1 slučaj ANN na 3944 živorođene djece. Rezultati prospektivne studije pokazuju da udružena primjena metoda laboratorijskog probira određivanjem broja neutrofila u krvi novorođenčeta i serološkog ispitivanja za anti-neutrofilna protutijela, u slučaju izolirane neutropenije znatno doprinosi pravovremenom otkrivanju ove bolesti.

U studiji Buxa i suradnika provedenoj u skupini od 1016 roditelja, u kojih je ispitivana prisutnost anti-neutrofilnih protutijela u serumu, ista su dokazana u 11 (1,1%) ispitanica, a anti-HNA specifičnost protutijela potvrđena je u 4 (0,4%) ispitanica. Međutim, ni jedno dijete nije imalo sniženi broj neutrofila u krvi, niti znakove bakterijske infekcije. Učestalost ANN procijenjena na manje od 0,1 %. (2)

U studiji Zupanske i suradnika, učestalost ANN ispitivana u 1308 parova majki i novorođenčadi, nakon probirnog određivanja HNA-1 a i 1b genotipa majke, nakon čega je u 195/203 majke homozigotnog genotipa određen HNA-1 a i 1b novorođenčeta. Anti-neutrofilna protutijela otkrivena su u serumu 37/195 (19%) ispitanica. U 9 (4,5%) ispitanica potvrđena je HNA specifičnost protutijela. Niti jedno dijete nije imalo znakova neonatalne neutropenije. Incidencija ANN procijenjena na manje od 1 na 1000 živorođene djece. U ranijoj studiji istih autora incidencija ANN, bez primjene probirnog laboratorijskog ispitivanja za anti-neutrofilna protutijela i neutrofilne antigene bila je 1 na 6000 živorođene djece. (9)

Rezultati obje studije pokazuju da je za populaciju Bijelaca procijenjena učestalost ANN manja od 1 na 1000 živorođene djece, ukoliko se primijeni probirno laboratorijsko ispitivanje za ANN, odnosno 1 na 6000 živorođene djece u slučaju bez probira, što je u skladu s našim podacima.

U studiji Hana i suradnika, koja obuhvaćala 856 novorođenčadi liječenih u Jedinici intenzivnog liječenja u „Sanggye Paik University Hospital“ u Seulu, Korea, tijekom petogodišnjeg razdoblja, neutropenija je bila prisutna u 105 (12,3%) novorođenčadi. U 3 novorođenčeta dokazana su anti-neutrofilna protutijela (2 anti-HNA-1b i 1 anti-HNA-1a). HNA genotipizacijom dokazana je HNA inkompatibilnost između majke i djeteta, čime su potvrđeni rezultati serološkog ispitivanja. Viša učestalost anti-HNA-1b aloimunizacije bila je očekivana, jer je u populaciji Azijata frekvencija HNA-1b antigena viša od HNA-1a za razliku od populacije Bijelaca. Incidencija ANN u ovoj skupini ispitanika procijenjena je na 0,35%, što je znatno više od ostalih studija.(114)

Rezultati navedenih i naše studije potvrđuju pretpostavku da se dijagnoza ANN serološki potvrđuje samo u teškim oblicima bolesti, dok ostali slučajevi ostaju neprepoznati.

Klinička sumnja na ANN postavlja se u slučaju izolirane neutropenije (<1500 neutrofila/ μ L) u novorođenčeta. (3, 111, 112) Bolest je analogna hemolitičkoj bolesti novorođenčeta, ali za razliku HBN može se javiti u prvorodenog djeteta. Obzirom da ne postoji prijenatalni probir za ANN, pojava bolesti u prvog djeteta u obitelji je neočekivana. (2) U diferencijalnoj dijagnozi, potrebno je razmotriti ostale uzroke novorođenačke neutropenije: teški oblik kongenitalne neutropenije (Kostmanov sindrom) i bolesti majke (autoimuna neutropenija i preeklampsija). (115-119) Tijek trudnoće je uredan, majka ima normalan broj neutrofila a trudnoća nije praćena pojačanom učestalošću bakterijskih infekcija. Klinički tijek bolesti je samoograničavajući (prosječno 7 tjedana), obično praćen samo blažim infekcijama. (4, 120-123) U teškim oblicima bolesti, praćenim bakterijskim infekcijama i sepsom bolest može imati smrtni

ishod. (5-7) U liječenju se primjenjuju antibiotici; preventivno ili prema antibiogramu, intravenozni gamaglobulini, kortikosteroidi, granulocitni faktor rasta (recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, engl. rh-GCSF), i rijetko granulocitne transfuzije. (124-127)

Klinička obilježja 23 novorođenčeta sa sumnjom na ANN, u ovom istraživanju pokazuju da se je u većine novorođenčadi radilo o blagom obliku bolesti. Nije bilo smrtnog ishoda bolesti. Potpuni oporavak uslijedio u svih ispitanika, a u 12/23 (52%) tijekom bolesti bio je praćen bakterijskom infekcijom. ANN je serološki potvrđena u 15/23 (65%) ispitanika. Neutropenija je prosječno trajala 8 tjedana (raspon 1 do 24 tjedna). U liječenju su primijenjeni antibiotici u 14/23 (61%) novorođenčadi, a u 4 novorođenčeta su uz antibiotike primijenjeni intravenozni gamaglobulini (IVIG) i granulocitni faktor rasta (hr-GCSF). U 9/23 (39%) nije bilo potrebno medikamentozno liječenje.

Analiza kliničko-laboratorijskih podataka pokazala je statistički značajnu povezanost težine neutropenije s anti-HNA specifičnosti protutijela i dobi novorođenčeta manjoj od 2 tjedna u trenutku zahtjeva za laboratorijsko ispitivanje ANN. Također, uočena je statistički značajna povezanost pozitivnog nalaza serološkog ispitivanja ANN s dobi novorođenčeta manjoj od 2 tjedna u trenutku zahtjeva za laboratorijsko ispitivanje i duljinom trajanja neutropenije manjoj od 8 tjedana. Povezanost pozitivnog nalaza serološkog ispitivanja ANN i broja neutrofila u krvi novorođenčeta manjem od 500 u mm³, kao i uputna dijagnoza izolirane neutropenije bila je na granici statističke značajnosti. Ovi podaci potvrđuju ranije objavljene podatke. (128-132)

U 12/23 (52%) novorođenčadi, uz neutropeniju, bili su prisutni i drugi kliničko-laboratorijski znaci. Najčešće je bila prisutna trombocitopenija, u 5/23

(22%) novorođenčadi. Ovi podaci ukazuju da je serološko ispitivanje ANN u polovine ispitanika učinjeno u svrhu isključivanja ANN, uz prisutnost druge osnovne bolesti, najčešće sumnje na transplacentarnu infekciju i imune ili gestacijske citopenije majke.

U ovom istraživanju nije dokazana statistički značajna povezanost teškog oblika neutropenije (broj neutrofila <math><500\text{ u mm}^3</math>) sa učestalošću bakterijskih infekcija. Razlog tome vjerojatno je mali broj ispitanika u kojih je tijekom bolesti bio praćen teškim oblikom bakterijske infekcije 4/23 (17%).

Liječenje antibioticima prema nalazu antibiograma provedeno je u 4 od 23 novorođenčadi. Ono je bilo uspješno i dovelo je do izlječenja bakterijske infekcije u 3 od 4 novorođenčadi. U jednog novorođenčeta do izlječenja infekcije došlo je tek nakon primjene granulocitnog faktora rasta.

Liječenje antibioticima u cilju sprječavanja bakterijskih infekcija primijenjeno je u 10/23 novorođenčadi, a prosječno trajalo 10 dana. U ostale novorođenčadi nije provedeno preventivno liječenje antibioticima, obzirom da je neutropenija bila blagog stupnja, nije bilo bakterijskih infekcija, djeca su bila dobrog općeg stanja i otpuštena su na kući uz preporuku pojačanih mjera higijensko-epidemiološkog nadzora. Preporuke za primjenu antibiotika širokog spektra djelovanja u svrhu sprječavanja infekcija i njihova primjena u slučaju izolirane neutropenije u novorođenčeta nalažu individualni pristup svakom bolesniku, te procjenu potencijalnih rizika u odnosu na korist njihove primjene. (125)

Specifično liječenje za povišenje neutrofila u krvi djeteta, rekombinantnim faktorom rasta granulocitnih kolonija (rh- G-CSF) primijenjeno je u jednog novorođenčeta. Neupogen je primijenjen od 19 do 23 dana života, u dozi od 5 $\mu\text{g/kg TT/dan}$, uz vrijednost 0 neutrofila u krvi novorođenčeta i tešku bakterijsku

infekciju pupčane ranice, rezistentnu na sedmodnevnu primjenu antibiotika prema nalazu antibiograma. Lijek je bio učinkovit, uz povišenje broja neutrofila na 1970 u mm^3 5. dana liječenja, i izlječenje infekcije. Iako je učinak lijeka na broj neutrofila u krvi djeteta bio prolazan, obzirom da je njihov broj iznosio 760 mm^3 4 dana po prestanku primjene lijeka, konzilij neonatologa donio je odluku da se liječenje Neupogenom odgodi za slučaj ponovne pojave bakterijske infekcije ili sepse.

U ostale novorođenčadi s teškim oblikom neutropenije u našem ispitivanju, granulocitni faktor rasta nije primijenjen. Blagi klinički tijek bolesti u donesene novorođenčadi bez drugih bolesti, usprkos dugotrajne i teške neutropenije, posebno u 2 novorođenčeta s anti-HNA-2a aloprotutijelima, razlogom su odgode primjene faktora rasta granulocitnih kolonija samo za slučaj teške bakterijske infekcije uz neučinkovito liječenje antibioticima prema nalazu antibiograma i pojavu sepse, obzirom na ograničena iskustva i potencijalne neželjene učinke lijeka. (138, 139)

Pitanje odabira i učinkovitosti specifične terapije za povišenje broja neutrofila u krvi u liječenju ANN nije jasno definirano. Iako su klinička iskustva u primjeni rh-GCSF vrlo dobra, ona se većinom odnose na liječenje neutropenije u bolesnika nakon transplantacije koštane srži i matičnih stanica, te sepse u prije vremena rođene djece, dok su iskustva u primjeni rh-GCSF u liječenju ANN malobrojna. Prema podacima iz literature primjena rh-GCSF u liječenju ANN u pravilu je bila učinkovita. Broj neutrofila porastao je za 72 sata od početka liječenja na vrijednosti više od 1000 u mm^3 . U niti jednom slučaju nisu opažene neželjene reakcije, pa se smatra sigurnim i dobrim odabirom u liječenju teške i dugotrajne neutropenije kada je prisutan povećani rizik od nastanka bakterijskih infekcija i sepse. (124-126)

Međutim, u literaturi je opisano nekoliko slučajeva nezadovoljavajućeg odgovora na rh-GCSF, primijenjenog u liječenju ANN. (127,133-137)

U radu Maheshwarija i suradnika opisan je tijek liječenja ANN uzrokovane aloimunizacijom na HNA-2a antigen, rezistentne na standardne doze rekombinantnog faktora rasta granulocitnih kolonija (rh-GCSF). U novorođenčeta je 6 sati nakon rođenja izmjeren apsolutni broj neutrofila od 166 u mm³. Liječenje faktorom rasta provedeno je od 2. do 18. dana života djeteta, u dozi od 10-80 µgr/kg/dan. Doza je postupno povišavana zbog nezadovoljavajućeg učinka lijeka i vrijednost neutrofila 0. 18. dana liječenja dolazi do naglog povišenja broja neutrofila iznad normalnih vrijednosti, te se liječenje prekida. Doze održavanja bile su 10µg/kg/dan dva puta tjedno do 7. tjedna života i jedan puta tjedno do 8. tjedna života, kada je prekinuto liječenje uz broj neutrofila od 1000 u mm³. Autori pretpostavljaju da bi pojava neučinkovitosti liječenja faktorom rasta granulocitnih kolonija mogla biti posljedica učinka lijeka na pojačanu ekspresiju HNA-2a antigena na mijeloidnim prekursorim stanicama i pojačanog afiniteta protutijela za ove stanice. (133)

Ovu postavku podupiru podaci Stronceka i suradnika, koji su pokazali da primjena rh-G CSF u zdravih dobrovoljaca dovodi do pojačane ekspresije NHA-2a antigena, za razliku od smanjenja ekspresije HNA-1a i 1b. Oni su pokazali da nakon početnog porasta ekspresije HNA-2a, slijedi pad na vrijednosti prije primjene rh-GCSF, koji traje 4 dana, te ponovni porast vrijednosti nakon 10 dana.(135) Prilog ovim opažanjima je i rad Pockocka i suradnika u kojem daju prikaz bolesnika s kroničnom mijeloičnom leukemijom, koji je razvio autoimunu neutropeniju nakon transplantacije matičnih stanica od nesrodnog davatelja. Neutropenija je trajala 3 tjedna unatoč terapiji rh-GCSF-om. Serološkim

ispitivanjem za anti-neutrofilna protutijela u serumu bolesnika dokazana su anti-HNA-2a protutijela. Nakon prekida terapije rh-GCSF-om dolazi do povišenja broja neutrofila, a ponovna primjena lijeka uzrokuje ponovno sniženje broja neutrofila. Pretpostavka autora navedenog članka slična je mišljenju Maheshwarija i suradnika, da terapija rh-GCSF-om primijenjena u slučaju HNA-2a imunizacije, potiče pojačanu ekspresiju HNA-2a na cirkulirajućim neutrofilima, te povećava potentnost anti-HNA-2a protutijela. (134)

Podaci o potencijalnom neželjenom učinku lijeka na tkiva u razvoju, obzirom da se lijek rijetko primjenjuje u novorođenčadi, također su nedostadni. Iako je opažena povećana učestalost maligne transformacije (leukemije) u djece s teškim oblikom kongenitalne neutropenije, dugotrajno liječene rh-GCSF radi sprječavanja bakterijske infekcije i sepse, primjena ovog lijeka u ANN zbog malih doza i kratkog trajanja liječenja ne može se usporediti s liječenjem bolesnika sa SCD. (127)

Pitanje odabira i učinkovitosti specifične terapije za povišenje broja neutrofila u krvi novorođenčeta zahtijeva daljnju evaluaciju na većem broju slučajeva i ukazuje na potrebu individualnog pristupa u odabiru načina liječenja.

Laboratorijsko ispitivanje uzoraka krvi majke i novorođenčeta, kojemu je cilj dokazivanje pasivnog prijelaza majčinih specifičnih neutrofilnih protutijela IgG razreda, putem posteljice u fetalnu cirkulaciju i oblaganje fetalnih neutrofila, nužno je za konačnu potvrdu dijagnoze ANN. U laboratorijskom ispitivanju ANN potrebno je primijeniti najosjetljivije dostupne metode za određivanje anti-neutrofilnih protutijela i antigena. Serološko ispitivanje najčešće obuhvaća ispitivanje majčinog i djetetovog seruma imunofluorescentnim testom za anti-neutrofilna (granulocitna)

protutijela (direktnim i indirektnim), imunofluorescentnim testom za antilimfocitna protutijela (direktnim i indirektnim), testom leukoaglutinacije, enzimsko-imunološkim testom vezanja neutrofilnih antigena pomoću monoklonalnih protutijela (monoclonal antibody immobilization of neutrophil antigens-MAINA, engl.) i testom mikrolimfocitotoksičnosti za pregledno i potvrdno određivanje specifičnosti anti-neutrofilnih i anti-HLA protutijela razreda I. (11) U određivanju antigena HNA i HLA razreda I primjenjuju se molekularne i serološke metode. Od molekularnih metoda najčešće polimerazna lančana reakcija s obilježivačima specifičnim za sekvencu (PCR-SSP), a od seroloških MAINA. (12)

U diferencijalnoj dijagnozi, potrebno je razmotriti ostale uzroke novorođenačke neutropenije: teški oblik kongenitalne neutropenije (Kostmanov sindrom) i bolesti majke (autoimuna neutropenija i preeklampsija), koje mogu imati učinak na rezultate serološkog ispitivanja ANN. (115, 116, 117, 118) U Kostmanovom sindromu nalazi se mutacija HAX1 gena, koja uzrokuje zastoj u sazrijevanju mijeloidne loze krvnih stanica u koštanoj srži na razini promijelocita. Neutropenija se javlja neposredno nakon rođenja, teškog je stupnja i praćena je učestalim i teškom oblicima bakterijskih infekcija i sepsom, a serološko ispitivanje za ANN je negativno. (97, 128) Za razliku od toga, ANN obično ima blaži klinički tijek, serološko ispitivanje za ANN je pozitivno, a nalaz koštane srži, ukoliko je učinjen, pokazuje hipercelularnu ili normalnu mijelopoezu. (116)

Neutropenija se javlja u oko 5- 6% djece rođene od majki s preeklampsijom, a u oko 80% slučajeva javlja se u prijevremeno rođene djece, majki s višestrukim trudnoćama. Neutropenija je blagog stupnja, u većine novorođenčadi dolazi do spontanog oporavka do 7. dana života djeteta, a serološko ispitivanje za ANN u pravilu je negativno. (119) Neimune sekundarne

neutropenije u novorođenčeta posljedica su prolazne supresije koštane srži tijekom virusnih infekcija (respiratorni sincicijalni virus, Epstein-Bar, virus influence A i B, hepatitisa, varicella, rubella i drugih) ili teških bakterijskih infekcija. (95) Neutropenija se javlja u prvih nekoliko dana od početka infekcije, obično traje 3 do 8 dana i blagog je do umjerenog stupnja, obično je prisutna i trombocitopenija, a serološko ispitivanje je najčešće negativno (98)

U slučaju kada majka boluje od primarne ili sekundarne autoimune neutropenije potaknute lijekovima koje je majka uzimala tijekom trudnoće (npr, ritodrin), slobodna autoprotutijela IgG razreda, iz majčinog krvotoka mogu prijeći posteljicu, vezati se za neutrofile fetusa i uzrokovati neonatalnu neutropeniju. Također, majčina antifosfolipidna protutijela rijetko mogu uzrokovati neonatalnu neutropeniju. Neutropenija u novorođenčeta u tom slučaju obično je blagog do umjerenog stupnja, kratkotrajna i bez pojave bakterijskih infekcija. U serološkom ispitivanju autoimuna neutropenija razlikuje se od ANN pozitivnim direktnim testom za anti-neutrofilna protutijela s granulocitima majke, a indirektni test za antigranulocitna protutijela je negativan ili se ne može se odrediti HNA specifičnost slobodnih autoprotutijela. Za razliku od toga, u ANN direktni test za anti-neutrofilna protutijela s granulocitima majke je negativan, a specifičnost aloprotutijela usmjerena je na HNA antigene. (115, 117, 140, 141)

U ovom radu laboratorijsko ispitivanje ANN obuhvaćalo je probirno serološko ispitivanje seruma i neutrofila majke i novorođenčeta. Ukoliko je probirno ispitivanje bilo pozitivno testiranje je nastavljeno određivanjem specifičnosti anti-neutrofilnih protutijela. U slučaju kada nisu dokazana anti-HNA protutijela, slijedilo je probirno ispitivanje za anti-HLA I protutijela. Ako je rezultat bio pozitivan učinjeno je određivanje specifičnosti HLA I protutijela. Za probirno

laboratorijsko ispitivanje primijenjena je metoda imunofluorescencije (GIFT), a za određivanje HNA specifičnosti protutijela metoda enzimsko-imunološkog testa, uz imobilizaciju neutrofilnih antigena pomoću monoklonalnih protutijela (MAINA). Probirno serološko ispitivanje za anti-HLA I protutijela učinjeno je metodom mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT) i imunofluorescencije (LIFT), a određivanje specifičnosti anti-HLA I protutijela MLCT metodom. Potvrda rezultata serološkog ispitivanja učinjena je određivanjem HNA antigena majke i djeteta, molekularnom metodom (PCR-SSP) ili serološkom metodom indirektna imunofluorescencije (GIFT).

Udjel serološki potvrđenih slučajeva u ukupnom broju zahtjeva za laboratorijsko ispitivanje ANN bio je 15/23 (65%), u skladu je s podacima iz literature, koji navode dvostruko veći broj zahtjeva u odnosu na broj serološki potvrđenih slučajeva ANN. (2, 9, 114) U oba laboratorija serološko ispitivanje bilo je zadovoljavajuće; s 50 odnosno 70% serološki potvrđenih slučajeva. Ovaj podatak pokazuje da su klinički probir i laboratorijsko ispitivanje sumnje na ANN bili zadovoljavajući.

Većina laboratorijskog ispitivanja 17/23 (74%) učinjena je u laboratoriju HZTM u kojem se uz pregledno ispitivanje radi i određivanje specifičnosti HNA protutijela i HNA genotipizacija. Rezultati pokazuju da je laboratorijsko ispitivanje ANN u većini slučajeva ograničeno na velike kliničke bolnice, kojim je dostupna specifična laboratorijska dijagnostika, što je u skladu s podacima iz literature. (1, 9, 10)

Određivanje specifičnosti anti-neutrofilnih protutijela učinjeno je u 11 od 15 novorođenčadi u koje je bilo pozitivno probirno serološko ispitivanje ANN. U 5 od 11 (46%) slučajeva dokazana su anti-HNA protutijela, a u 4 od 11 (36%)

dokazana su samo anti-HLA I protutijela. U 2 od 11 (18%) slučajeva ispitivanje je bilo negativno. Specifičnost protutijela bila je u dva slučaja anti-HNA-2a, te anti-HNA-1a, -1c i anti-HNA-1 panreaktivna protutijela u po jednom slučaju. Ovi podaci ne razlikuju se od podataka iz literature prema kojima je ANN najčešće uzrokovana aloimunizacijom na HNA-1a, HNA-1b i anti-HNA-2a antigene. (5, 13, 14)

1 od 23 majke imala je autoimunu neutropeniju, uz pozitivan direktni i indirektni test za anti-granulocitna protutijela IgG razreda (anti-HNA specifičnost nije određivana). Dijete je rođeno s neutropenijom umjerenog stupnja, koja je trajala 9 tjedana, blagog kliničkog tijeka, bez pojave bakterijskih infekcija. Dijete je primalo preventivnu terapiju antibioticima, u trajanju od 7 dana. Nalaz potvrđuje da majčina autoprotutijela, ako su IgG razreda mogu prijeći posteljicu i rijetko uzrokovati neutropeniju u novorođenčeta, što je potvrđeno serološkim ispitivanjem. Van Leeuwen i suradnici prvi su opisali i serološki dokazali neonatalnu neutropeniju uzrokovanu pasivnim prijelazom majčinih autoprotutijela IgG razreda. Anti-HNA specifičnost protutijela nije se mogla odrediti. Dijete je rođeno s teškim oblikom neutropenije, s brojem neutrofila manjim od 500 u mm^3 tijekom prva dva tjedna života. Trećeg dana života pojavila se infekcija pupčane ranice uzrokovana *Staphylococcus aureus*, koja je izliječena antibiotikom prema nalazu antibiograma (cephradine). Neutropenija je trajala 16 tjedana. Nove bakterijske infekcije nisu zabilježene, a novorođenče je tijekom razdoblja neutropenije primalo preventivnu antibiotsku terapiju (co-trimoxazole i nystatin) Direktni test za antigranulocitna protutijela bio je pozitivan za vrijeme neutropenije, a negativan sa 16 tjedana kada je izmjeren broj neutrofila u krvi novorođenčeta u granicama normalnih vrijednosti. (140)

U 4 novorođenčeta s pozitivnim probirnim serološkim ispitivanjem za ANN, serološko ispitivanje specifičnosti anti-neutrofilnih protutijela, uz primjenu najosjetljivije metode (MAINA), bilo je negativno. Dodatnim serološkim ispitivanjem seruma majke dokazana su samo anti-HLA I protutijela. Majčin serum adsorbiran s HLA antigen pozitivnim trombocitima dao je negativan rezultat u initektnom imunofluorescentnom testu za anti-granulocitna protutijela. U 3 od 4 novorođenčadi anti-HLA I protutijela dokazana su i u plazmi novorođenčeta, uz primjenu najosjetljivije dostupne multiplex-Luminex metode.

U svim slučajevima rezultati serološkog ispitivanja potvrđeni su HLA I genotipizacijom majke i djeteta i pokazali su inkompatibilnost za odgovarajuće HLA I antigene.

Analiza kliničko-laboratorijskih podataka 4 novorođenčeta sa serološki potvrđenom ANN, uzrokovanom samo anti-HLA I protutijelima, pokazala je da je bolest u svim slučajevima imala blagi tijek, prosječno trajanje neutropenije bilo je 4,5 tjedana, bakterijska infekcija (omphalitis) pojavila se u 1 od 4 novorođenčeta, trajala je 7 dana i izliječena je nakon primjene antibiotika prema nalazu antibiograma. Nadalje, niti jedno novorođenče nije primalo lijekove za povišenje broja neutrofila u krvi.

Prema podacima iz literature uloga anti-HLA I protutijela u nastanku ANN nije jasno definirana. U oko trećine slučajeva kliničke sumnje na ANN nije moguće odrediti HNA specifičnost protutijela, iako su pregledni testovi serološkog ispitivanja za anti-neutrofilna protutijela pozitivni (pozitivan direktni test za antineutrofilna protutijela s neutrofilima djeteta, pozitivan indirektni test sa serumom majke i pozitivna križna proba s neutrofilima oca i serumom majke). (15) Serološko ispitivanje često je otežano istovremenom prisutnošću anti-HLA

protutijela razreda I. U nekim slučajevima u majčinom i djetetovom serumu prisutna su samo anti-HLA I protutijela, ali se serološko ispitivanje kojim bi se dokazalo da je ANN uzrokovana samo anti-HLA I protutijelima u većini slučajeva ne nastavlja. (16)

Prema podacima iz literature opisano je nekoliko slučajeva ANN u kojima je potvrđena izolirana prisutnost samo -HLA protutijela razreda I.

Bux i suradnici opisali su dva slučaja neonatalne neutropenije i trombocitopenije. Broj neutrofila bio je 200 odnosno 300 u mm^3 , a broj trombocita bio je 37 odnosno $57 \times 10^9/\text{L}$. Nadalje, u oba slučaja, u majčinom serumu metodom imunofluorescencije dokazana su samo anti-HLA protutijela, dok specifična neutrofilna protutijela nisu bila prisutna. HLA protutijela dokazana su u serumu jednog novorođenčeta. (17)

Hagimoto i suradnici opisali su slučaj ANN uzrokovan anti HLA-A2 protutijelima. Majčin serum bio je reaktivan s očevim neutrofilima, limfocitima i trombocitima. Nakon adsorpcije majčinog seruma s očevim trombocitima izgubila se reaktivnost s pacijentovim neutrofilima. Anti-HLA-A2 protutijela dokazana su u majčinom i djetetovom serumu. Anti-HNA-1 i HNA-2 protutijela su isključena. HLA tipizacijom obitelji potvrđeni su serološki nalazi. (7)

Iako je transplacentarni prijelaz anti-HLA protutijela dokazan nije sasvim jasna njihova uloga u nastanku ANN. Naime, niska učestalost ANN u usporedbi s učestalošću HLA protutijela u serumu trudnica od 2-15%, ali bez razvoja ANN i dalje je predmet rasprave. (64, 142) Neki autori mišljenja su da je malo vjerojatno da HLA protutijela uzrokuju ANN jer majčina HLA protutijela bivaju adsorbirana na HLA antigene izražene na tkivima fetalne posteljice pa tako ne dolaze u fetalnu cirkulaciju u dovoljnim količinama koje bi mogle uzrokovati uništenje fetalnih

neutrofila. Čimbenici koji određuju učinkovitost posteljice u ovom procesu nisu točno definirani, ali IgG podrazred i relativni afinitet protutijela za placente HLA antigene mogu biti od važnosti u objašnjenju ovog fenomena. (20, 64, 143-150)

U ovom istraživanju u 4 novorođenčeta s pozitivnim probirnim ispitivanjem za ANN, dokazana su samo anti-HLA I protutijela, dok anti-HNA protutijela nisu dokazana usprkos primjene najosjetljivije metode za određivanje specifičnosti anti-neutrofilnih protutijela. Ovi rezultati potvrđuju postavljenu hipotezu da anti-HLA I protutijela sama mogu uzrokovati ANN. Dodatno serološko i molekularno ispitivanje anti-HLA I protutijela i antigena opravdano je u slučaju kada je probirno ispitivanje pozitivno, a anti-HNA protutijela nisu dokazana. Primjena osjetljive serološke metode za probirno ispitivanje anti-HLA I protutijela u plazmi majke i novorođenčeta znatno doprinosi konačnoj potvrdi dijagnoze ANN.

Analiza seroloških i molekularnih osobina u 23 novorođenčeta, u kojih je ispitivana sumnja na ANN, omogućila je uspostavu prijedloga algoritma serološke i molekularne dijagnostike ANN, koji je uspješno primijenjen u ovome radu.

6. ZAKLJUČAK

1. Rezultati retrospektivne analize podataka o ANN u RH u razdoblju od 1988. do 2006. godine pokazuju da je opažena učestalost serološki potvrđene ANN u RH deseterostruko niža od navedenih podataka iz literature i potvrđuju pretpostavku da se ANN premalo serološki ispituje, te da je stvarna učestalost bolesti viša od opažene.
2. Rezultati prospektivne studije provedene od 2007. do 2008. godine pokazuju da sustavno laboratorijsko praćenje broja neutrofila u krvi novorođenčeta i serološko ispitivanje ANN u slučaju izolirane neutropenije, uz trajnu edukaciju neonatologa i transfuziologa, trostruko povećava broj zahtjeva za serološko ispitivanje ANN i znatno doprinosi pravovremenom otkrivanju ove bolesti.
3. Klinička obilježja 23 novorođenčeta sa sumnjom na ANN pokazuju da se je u većine novorođenčadi radilo o blagom obliku bolesti, uz rijetku prisutnost bakterijske infekcije i nije bilo smrtnog ishoda bolesti. U većini novorođenčadi nije bilo potrebno medikamentozno liječenje, a primjena antibiotika prema nalazu antibiograma i specifičnog lijeka za podizanje broja neutrofila u krvi novorođenčeta (rh- G-CSF) bila je učinkovita.
4. Analiza kliničko-laboratorijskih podataka pokazala je statistički značajnu povezanost težine neutropenije s anti-HNA specifičnosti protutijela i dobi novorođenčeta manjoj od 2 tjedna u trenutku zahtjeva za laboratorijsko ispitivanje ANN. Također, uočena je statistički značajna povezanost pozitivnog nalaza serološkog ispitivanja ANN s dobi novorođenčeta manjoj od 2 tjedna u trenutku zahtjeva za laboratorijsko ispitivanje i duljinom

trajanja neutropenije manjoj od 8 tjedana. Povezanost pozitivnog nalaza serološkog ispitivanja ANN i broja neutrofila u krvi novorođenčeta manje od 500 u mm^3 , kao i uputna dijagnoza izolirane neutropenije bila je na granici statističke značajnosti.

5. Blagi klinički tijek bolesti u donesene novorođenčadi bez drugih bolesti, usprkos dugotrajne i teške neutropenije, posebno u slučaju anti-HNA-2a aloimunizacije, potvrđuje opravdanost primjene faktora rasta granulocitnih kolonija (rh G-CSF) samo u slučaju teške bakterijske infekcije i sepse uz neučinkovito liječenje antibioticima prema nalazu antibiograma, obzirom na ograničena iskustva i potencijalne neželjene učinke lijeka.
6. Udjel serološki potvrđenih slučajeva u ukupnom broju zahtjeva za serološko ispitivanje ANN 15/23 u skladu je s podacima iz literature. Ovaj podatak pokazuje da su primijenjene serološke i molekularne metode za laboratorijsko ispitivanje sumnje na ANN bile zadovoljavajuće.
7. Rezultati ispitivanja potvrđuju hipotezu postavljenu u ovome istražvanju, da anti-HLA I protutijela sama mogu uzrokovati ANN. Dodatno serološko i molekularno ispitivanje anti-HLA I protutijela i antigena opravdano je u slučaju kada je probirno ispitivanje pozitivno, a anti-HNA protutijela nisu dokazana. Primjena osjetljive serološke metode za probirno ispitivanje anti-HLA I protutijela u plazmi majke i novorođenčeta znatno doprinosi konačnoj potvrdi dijagnoze ANN.
8. Podaci pokazuju da trajna edukacija neonatologa i transfuziologa i uspostava algoritma za laboratorijsko ispitivanje ANN, ima znatan utjecaj na prepoznavanje bolesti i kvalitetu laboratorijskog ispitivanja u cilju serološke potvrde sumnje na ANN.

7. SAŽETAK

Aloimuna neonatalna neutropenija (ANN) rezultat je imunizacije majke tijekom trudnoće na neutrofilne antigene „čeda“ naslijeđene od oca. Iako je ANN rijetka bolest, teški oblici povezani s bakterijskim infekcijama i sepsom koji mogu imati smrtni ishod nalažu ranu dijagnostiku i liječenje ove bolesti. Prema podacima iz literature procjenjuje se da je učestalost ANN manje od 1 slučaj na 1000 živorođene djece, a teških oblika ANN 1 slučaj na 6000 živorođene djece.

U Republici Hrvatskoj (RH) godišnje bilježimo oko 1-2 zahtjeva za serološkim ispitivanjem aloimune neonatalne neutropenije. Obzirom na oko 45 000 živorođene djece u Hrvatskoj godišnje uočava se da je učestalost ANN značajno niža od očekivane. Cilj ovoga istraživanja bio je procijeniti stvarnu učestalost bolesti u RH, analizirati kliničko-laboratorijske podatke i serološke i molekularne osobine ANN za 23 novorođenčeta za koje je učinjeno laboratorijsko ispitivanje ANN u RH u razdoblju od 1998. do 2008. godine.

Analiza retrospektivno prikupljenih podataka za razdoblje od 1998. do 2006. godine pokazuje da je učestalost serološki potvrđene ANN u RH 1 slučaj na 38099 živorođene djece, deseterostruko niža od navedenih podataka iz literature. U razdoblju od 2007. do 2008. godine u kojem su podaci prikupljeni prospektivno, broj serološki potvrđenih slučajeva ANN bio je dvostruko veći, 1:17323 živorođenih. Rezultati prospektivne pilot studije provedene od 2007. do 2008. godine u Rodilištu Klinike za ginekologiju i porodiljstvo KB SM, pokazuju da sustavno laboratorijsko praćenje broja neutrofila u krvi novorođenčeta i serološko ispitivanje ANN u slučaju izolirane neutropenije, uz

učestalost ANN od 1: 2843 živorođene djece, znatno doprinose pravovremenom otkrivanju bolesti.

Rezultati ispitivanja potvrđuju hipotezu postavljenu u ovome istražvanju, da anti-HLA I protutijela sama mogu uzrokovati ANN. Dodatno serološko i molekularno ispitivanje anti-HLA I protutijela i antigena opravdano je u slučaju kada je probirno ispitivanje pozitivno, a anti-HNA protutijela nisu dokazana. Primjena osjetljive serološke metode za probirno ispitivanje anti-HLA I protutijela u plazmi majke i novorođenčeta znatno doprinosi konačnoj potvrdi dijagnoze ANN.

8. SUMMARY

“Serological, molecular and clinical characteristics of alloimmune neonatal neutropenia”

Alloimmune neonatal neutropenia (ANN) is the result of maternal alloimmunization during pregnancy to neutrophil antigens inherited from the father. ANN is rare but potentially life-threatening disorder, especially in case of severe bacterial infections and sepsis and therefore demand early diagnostic and specific treatment of the disease. According to the literature data the incidence of ANN less than one *per* 1000 live births, and severe forms from one *per* 6000 live births. Only 1 to 2 requests for serologic testing for suspected ANN against ~45 000 live births *per* year in Croatia indicate the incidence of the disease to be considerably lower than expected. The aim of this study was to estimate a real incidence of the disease in Croatia and to analyse clinical and laboratory data and serological and molecular characteristics of ANN in 23 newborns investigated in the period from year 1998 to 2008 in Croatia.

Retrospective data analysis for period from year 1998 to 2006 shows the frequency of serologically proven ANN of 1 case per 38099 life-births which is tenfold lower than expected according to the previous published literature data. In the period of prospective collecting of data from 2007 to 2008 the frequency of serologically proven ANN was twofold higher; 1 case per 17323 life-births. Results of prospective pilot study conducted in Maternity ward of University hospital “Sestre Milosrdnice” in the two years period show the ANN incidence of 1 case per 2843 life-births, pointed out that regular laboratory monitoring of

neutrophil blood count in all newborns together with serological investigation of ANN in case of isolated neutropenia in the newborn has positive impact on timely diagnosis of ANN.

The results of the present study support the hypothesis that anti-HLA class I antibodies alone can cause ANN. Additional serological and molecular testing of HLA I antibodies and antigens is justified in case of positive serological screening of ANN, and negative anti-HNA antibodies. Introduction of serologic method of high sensitivity for anti-HLA I screening in mother's and newborn's plasma considerably contributed to final serological confirmation of ANN diagnosis.

9. LITERATURA

1. Bux J. Granulocyte immunology. Wiener Klinische Wochenschrift. 2001; 113: 799-805.
2. Bux J, Jung KD, Kauth T, Mueller-Eckhardt C. Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune-neonatal neutropenia. Transfusion Medicine 1992; 2: 143-149.
3. Hessner MJ, Curtis BR, Endean DJ, Aster RH. Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. Transfusion 1996; 36: 895-899.
4. Clay ME, Stroncek DF. Granulocyte immunology. U: Anderson KC, Ness PM, Scientific basis of transfusion medicine. 2. izd London Toronto; W.B. Saunders Co, 2000, str. 180-206,
5. Maheshwari A, Christensen RD, Calhoun DA. Immune-mediated neutropenia in the neonate. Acta Paediatrica 2002; 91: 98-103.
6. De Haas M, Kleijer M, van Zweiten R, Ross D, von dem Borne AE. Neutrophil Fc gamma RIIIb receptor deficiency, nature and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families. Blood 1995; 86: 2403-2413.
7. Hagimoto R, Koike K, Sakashita K, Ishida T, Nakazawa Y, Kamijo T, Saito S, Hiraoka A, Kobayashi M, Komiyama A. A possible role for maternal HLA antibody in a case of alloimmune neonatal neutropenia. Transfusion 2001; 41: 615-620.
8. King KE, Kao KJ, Bray PF, Casella JF, Blakemore K, Callan NA, Kennedy SD, Kickler TS. The role of HLA antibodies in neonatal

- thrombocytopenia: a prospective study. *Tissue Antigens* 1996; 47: 206-211.
9. Zupanska B, Uhrynowska M, Guz K, Maslanka K, Brojer E, Czestynska M, Radomska I. The risk of antibody formation against HNA 1a and HNA1 1b granulocyte antigens during pregnancy and its relation to neonatal neutropenia. *Transfusion Medicine* 2001; 11: 377-382.
 10. Williams BA, Fung YL. Alloimmune neonatal neutropenia: can we afford the consequences of a missed diagnosis? *Journal of Paediatrics and Child Health* 2006; 42: 59-61.
 11. Lalezari P, Nussbaum M, Gelman S, Speat T. Neonatal neutropenia due to maternal isoimmunization. *Blood* 1960; 15: 236-243.
 12. Mc Cullough J, Clay ME, Hurd D, Richards K, Ludvigsen C, Forstrom L. Effect of leukocyte antibodies and HLA matching on the intravascular recovery, survival, and tissue localization of 111-Indium granulocytes. *Blood* 1986; 67: 522-528.
 13. Verheugt FWA, von dem Borne AEG, Decary S, Engelfriet CP. The detection of granulocyte antibodies with indirect immunofluorescence test. *Br J Haematol* 1977; 36: 533-544.
 14. Klein HG i Anstee DJ Immunology of leukocytes, platelets and plasma components. U: Klein HG i Anstee DJ. *Mollison's blood transfusion in clinical medicine*, 11 izd. Oxford, Blackwell Publishing Ltd, 2005, str. 546-610.
 15. Bux J. Human neutrophil alloantigens. *Vox Sang* 2008; 94: 277-285.
 16. Ouwehand WH, Murphy MF, Allen DL. Human platelet and neutrophil antigens. U: Murphy MF, Pamphillon DH. *Practical transfusion medicine*, 1. izd., Oxford, Blackwell Science, 2001, str. 51-62.

17. Kelton JG, Bebenek G. Granulocytes do not have surface ABO antigens. *Transfusion* 1985; 25: 150-160.
18. Dunstan RA, Simpson MB, Sanfilippo FP. Absence of specific HLA-DR antigens on human platelets and granulocytes. *Blood* 1984; 64: 85.
19. ISBT Working Party on Platelet and Granulocyte Serology. Nomenclature of granulocyte alloantigens. *Vox Sang* 1999; 77: 251.
20. White JA, Mc Alpine PJ, Antonarakis S, Cann H, Eppig JT, Frezal J, Lancet D, Nahmias J, Pearson P, Peters J, Scott A, Scott H, Spurr N, Talbot C, Povey S. Guidelines for human gene nomenclature. HUGO Nomenclature Committee. *Genomics* 1997; 45: 468-471.
21. Stroncek D, Bux J. Is it time to standardize granulocyte alloantigen nomenclature? *Transfusion* 2002; 42: 393-395.
22. Moritz E, Norcia AMMI, Cardone JDB, Kuwano ST, Chiba AK, Yamamoto M, Bordin JO. Human neutrophil alloantigen systems. *An Acad Bras Cinenc* 2009; 81: 559-569.
23. Bux J, Stein EL, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. NA gene frequencies in the German population, determined by polymerase chain reaction. *Transfusion*. 1995; 35: 54-57.
24. Bux J, Stein EL, Bierling P, Fromont P, Clay M, Stroncek D, Santoso s. Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fc γ receptor IIIb. *Blood* 1997; 89(3): 1027-34.
25. Fromont P, Battaieb A, Skouri H, Floch C, Poulet E, Duedari N, Bierling P. Frequency of the polymorphonuclear neutrophil Fc γ receptor IIIb deficiency in he French population. *Blood* 1992; 79(8): 2131-34.
26. Huizinga TWJ, Ross D, von dem Borne AEG. Neutrophil Fc- γ receptors: A two way bridge in the immune system. *Blood* 1990; 57(6): 1211-14.

27. Bux J. Molecular nature of granulocyte antigens. *Transf Clin Biol* 2001; 8: 242-7.
28. von dem Borne AEG, de HASS m, Simcek S, Porcelijn L, van der Schoot CE. Platelet and neutrophil alloantigens in clinical medicine. *Vox Sang* 1996; 70(3): 34-40.
29. Lyall EGH, Lucas GF, Eden OB. Autoimmune neutropenia of infancy. *J Clin Pathol* 1992; 45: 431-34.
30. Stroncek DF, Shankar RA, Noren PA, Herr GP, Clement LT. Analysis of the expression of NB1 antigen using two monoclonal antibodies. *Transfusion* 1996; 36:168-174.
31. Bux J, Dickman JO, Stockert U, Mueller-Eckhardt C. Influence of granulocyte antibodies on granulocyte function. *Vox Sang* 1993; 64:220-225.
32. Kissel K, Scheffler S, Kerowgan M, Bux J. Molecular basis of NB1 (HNA-2a, CD177) deficiency, *Blood* 2002; 99(11):4231-33.
33. Bux J. Molecular genetics of granulocyte polymorphism. *Vox Sang* 2007; 78(2): 125-30.
34. Curtis BR, Cox NJ, Sullivan MJ, Konkshbaev A, Bowens K, Hansen K, Aster RH. The neutrophil alloantigen HNA-3a (5b) is located on choline transporter-like protein 2 (CTL2) and appears to be encoded by an R>Q154 amino acid substitution. *Blood* 2010; 115(10): 2073-76.
35. Greinacher A, Wesche J, Hammer E, Frull B, Volker U, Reil A, Bux J. Characterization of the human neutrophil alloantigen-3A. *Nat Med* 2010; 16(1): 45-48.
36. Reil A, Keller-Stanislawski B, Gunay S, Bux J. Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of

- leucocyte antibody screening of blood donors. *Vox Sang* 2008; 95(4):313-317.
37. Cardone JD, Bordin JO, Chiba AK, Norcia AM, Vieira-Filho JP. Gene frequencies of the HNA-4a and -5a neutrophil antigen in Brazilian persons and the new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for HNA-5a genotyping. *Transfusion* 2006; 46(9): 1515-20.
38. Simsek S, van der Schoot CE, Daams M, Huiskes E, Clay M, McCullough J. Molecular characterization of antigenic polymorphism (Ond(a) and Mart(a)) of the beta2 family recognized by human leukocyte alloantisera. *Blood* 1996; 88:1350-58.
39. Han TE, Han KS. Gene frequencies of human neutrophil antigens 4a and 4b in the Korean population, *Korean J Lab Med* 2006; 26: 114-18.
40. Hartman KR, Wright DG. Identification of autoantibodies specific for the neutrophil adhesion glycoproteins DC11b/CD18 in the patients with autoimmune neutropenia. *Blood* 1991; 78: 1096-104.
41. Lubbert M, Friedhelm H, Koeffler HP. Expression and regulation of myeloid-specific genes in normal and leukaemic myeloid cells. *Blood* 1991; 77(5): 909-24.
42. Brkljačić-Kerhin V, Grubić Z. Glavni sistem tkivne snošljivosti u ljudi; U: Grgičević D. i sur. *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi*, 1 izd., Zagreb, Medicinska naklada, 2006, str 254-258.
43. Gebel HM, Pollack MS, Bray RA. The HLA system U: Technical manual, Roback JD, Combs MR, Grossman GJ, Hillyer CD (editors), AABB, 16. izdanje, Bethesda, SAD, 2008, str 547-68.
44. Blashitz A, Hutter H, Dohr G. HAL class I protein expression in the human placenta. *Early Pregnancy* 2001; 5(1): 67-9.

45. HLA nomenclature. <http://www.ebi.ac.uk/ingt/hla> 15.06.2010.
46. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF et al. Nomenclature for HLA factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 2010; 75: 291-455.
47. Holdworth R, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Noreen HJ, Setterholm M, Maiers M. The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C -DR, and DQ antigens, *Tissue Antigens* 2009; 73(2): 95-170.
48. Navarette CV. Human leukocyte antigens. U: Murphy MF, Paphilon DH. *Practical transfusion medicine*, Blackwell Science, 1. izd., Oxford, Blackwell Science, 2001, str. 36-50.
49. Mc Farland JG. Platelet and granulocyte antigens and antibodies. U: Roback JD, Combs MR, Grossman GJ, Hillyer CD. *Technical manual*. AABB, 16. Izd., Bethesda, 2008, str 525-46.
50. Bux J, Mueller-Eckhardt C. Autoimmune neutropenia. *Seminars in Hematology* 1992; 29(1): 45-53.
51. Burin MCA, von dem Borne AEG, Rienk YJ, Tamminga, Klijer M, Buddelmeijer L, de Hass M. Neutrophil antibody specificity in different type of childhood autoimmune neutropenia. *Blood* 1999; 94(5): 1797-1802.
52. Bux J, Behrens G, Jager G, Welte K. Diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenia in infancy; analysis of 240 cases. *Blood* 1998; 91(1): 181-86.
53. Lejkowski M, Masheshwari A, Calhoun DA, Christensen RD, Skoda-Smith S, Dabrow S. Persistent perianal abscess in early infancy as a presentation of autoimmune neutropenia. *Journal of Perinatology* 2003; 23: 428-30.

54. Calhoun DA, Rimsza LM, Burchfield DJ, Millispas M, Christensen RD, Budania J, McCullough J. Congenital autoimmune neutropenia in two premature neonates. *Pediatrics* 2001; 108; 181-84.
55. Sach UJH, Hattar K, Weissmann N, Bohle RM, Weiss T, Sibelius U, Bux J. Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in ex vivo rat lung model. *Blood* 2006; 107(3): 1217-19.
56. De Rie MA, van der Plas-van Dalen CM, Engelfriet CP, von dem Borne AEG. The serology of febrile transfusion reactions. *Vox Sang* 1985; 49: 126-34.
57. Popovsky M. Transfusion-related acute lung injury. *Current Opinion in Hematology* 2000; 7: 402-407.
58. Bux J, Chapman J. Report on the second international granulocyte serology workshop. *Transfusion* 1997; 37: 977-83.
59. Stroncek DF, Shapiro RS, Filipovich AH, Plachta LB, Clay ME. Prolonged neutropenia resulting from antibodies to neutrophil-specific antigen NB1 following marrow transplantation. *Transfusion* 1993; 33: 158-163.
60. von Witzleben-Schurholz E, Neppert J, Schmidt L, Rohr A, Leger R. Another case of transfusion-related acute lung injury due to anti-HNA-3a (-5b). *Infus Ther Transfus Med* 2000; 27: 208-10.
61. Bux J, Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sang* 2005; 89: 1-10.
62. Strauss RG, Johnson K, Cress G, Cordle DG. Alloimmunization in preterm infants after repeated transfusions of WBC-reduced RBCs from the same donor. *Transfusion* 2000; 40(12): 1463-68.

63. Triulzi DJ. Transfusion-related acute lung injury: current concepts for the clinician. *International Anesthesia Research Society* 2009; 108(3): 770-76.
64. Taaning E. HLA antibodies and fetomaternal alloimmune thrombocytopenia; myth and meaningful? *Transfusion medicine reviews* 2000; 14: 257-80.
65. Kristoffersen E.K. Placental Fc receptors and transfer of maternal IgG. *Transfusion Medicine Reviews* 2000; 4: 234-43.
66. Gramatges MM, Fani P, Nadeau K, Prieria S, Jeng MR. Neonatal alloimmune thrombocytopenia and neutropenia associated with maternal human leukocyte antigen antibodies. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53(1):97-99, sažetak.
67. Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MP, Norria PJ, Steele WR, Glynn SA et al. The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury (TRALI) risk reduction strategy. *Transfusion* 2009; 49(9): 1825-35.
68. Nakazawa Y, Saito S, Hasegawa Y, Yanagisawa R, Sakashita K, Kamijo T, Miyazaki T, Sato S Ikeda H, Ikebuchi K, Kokie K. A possible role of the production of multiple HLA antibodies in fatal platelet transfusion refractoriness after peripheral blood progenitor cell transplantation from the mother in the patient with relapsed leukaemia. *Transfusion* 2007; 47: 326-34.
69. Mryman HT. Transfusion-induced alloimmunization and immunosuppression and the effects of leukocyte depletion. *Transfusion Medicine Reviews* 1989; 3(3): 180-93.

70. Gantán ZP, Perkins HA. Differential reactions of the HLA typing sera with cells homozygous for cross reacting antigens. *Transfusion* 1990; 30: 631-33.
71. Arguello JR, Little A-M, Bohan E, Gallardo D, O'Shea J, Dodi ia, Goldman JM, Madrigal JA. A high resolution HLA class I and class II matching method for bone marrow donor selection. *Bone Marrow Transplantation* 1998; 22: 527-34.
72. Bedford Russel AR, Rivers RPA, Davey N. The development of anti-HLA antibodies in multiply transfused preterm infants. *Arch Dis Child* 1993; 68: 49-51.
73. Lucas G, Rogers S, deHass M, Porcelijn L, Bux J. Report on the fourth International Granulocyte Immunology Workshop: progress toward quality assessment. *Transfusion* 2002;42: 462-68.
74. Stroncek DF, Plachta LB, Herr GP, Dalmaso AP. Analysis of the expression of neutrophil-specific antigen NB1: characterization of neutrophils that react with but are not agglutinated by anti-NB1. *Transfusion* 1993; 33: 656-60.
75. Veys PA, Guttridge CN, Nacey M, Ord J, Newland AC. Detection of granulocyte antibodies using flow cytometric analysis of leucocyte immunofluorescence. *Vox Sang* 1989; 56: 42-47.
76. Bux J. Molecular nature of antigens implicated in immune neutropenias. *Int J Haematol* 2002; 76(1): 399-403.
77. Matsuo K, Lin A, Procter JL, Clement L, Stroncek D. Variations in expression of granulocyte antigen NB1. *Transfusion* 2000; 40: 654-62.
78. Gittinger FS, Bux J. Study of four families concerning the linkage and inheritance of the allele encoding the granulocyte-specific antigen HNA-1c (SH). *Transfusion* 2001; 41(6):847-48.

79. Steffenson R, Gulen T, Varming K, Jersild C. Fc γ RIIIB polymorphism: evidence that NA1/NA2 and SH are located in two closely linked loci and that the SH allele is linked to the NA1 allele in Danish population. *Transfusion* 1999; 39: 593-98.
80. Matsuo K, Procter J, Stroncek D. Variations in genes encoding neutrophil antigens NA1 and NA2. *Transfusion* 2000; 40: 645-53.
81. Moritz E, Chiba AK, Kimura EY, Albuquerque D, Guirao FM, Yamamoto M, Costa FF, Bordin JO. Molecular studies reveal that A134T, G156A and G1333A SNPs in the CD177 gene are associated with atypical expression of human neutrophil antigen-2. *Vox Sang* 2010; 89: 160-66.
82. Fujiwara K, Watanabe Y, Mitsunaga S, Oka T, Yamane A, Akaza T, Tadokoro K, Tokunaga K, Shibata Y, Juji T. Determination of granulocyte-specific antigens on neutrophil Fc γ Receptor IIIb by PCR-preferential homoduplex formation assay, and gene frequencies in the Japanese population. *Vox Sang* 1999; 77: 218-22.
83. Kline WE, Press C, Clay M, Keashen-Schnell M, Hackel E, McCulloch J. Three sera defining a new granulocyte-monocyte T-lymphocyte antigen. *Vox Sang* 1986; 50: 181-86.
84. Schmidt-Melbye A, Kolstad A, Hannestad K. Antibodies to granulocytes detected by an indirect immunofluorescence method not requiring chemical modification of cells. *Transfusion* 1985; 25:165-69.
85. Nguyen XD, Fesch B, Sachs UJ, Kroll H, Kluter H, Muller-Steinhardt M. Rapid screening of granulocyte antibodies with a novel assay: flow cytometric granulocyte immunofluorescence test. *Transfusion* 2009; 49(12): 2700-08.

86. Stroncek DF, Leonard K, Eiber G, Malech hl, Gallin JI, Leitman SF. Alloimmunization after granulocyte transfusions. *Transfusion* 1996; 36: 1009-15.
87. Keller-Stanislawski B, Reil A, Gunay S, Funk MB. Frequency and severity of transfusion-related acute lung injury-German haemovigilance data (2006-2007). *Vox Sang* 2010; 89(1): 70-77.
88. Kogler G, Enczmann J, Rocha V, Gluckman E, Wernet P. High-resolution HLA-A,-B,-C,-DR,-DQ in the 122 unrelated cord blood/patient pair transplants hardly improves long-term clinical outcome. *Bone Marrow Transplantation* 2005;36: 1033-41.
89. Flomenberg N, Baxter-Love LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich i ostali. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 2004;104: 1923-30.
90. Press C, Kliene WE, Clay ME, Mc Cullough J. A microtiter modification in granulocyte immunofluorescence. *Vox Sang* 1985; 49:110-113.
91. Kassir NE, Legouvello S, Joseph CM, Salesses P, Reieux C, Cordonnier C, Vernant JP, Farcet JP, Bierling P, Keuntz M. High resolution HLA class I and II typing and CTLp frequency in unrelated donor transplantation: a single-institution retrospective study of 69 BMTs. *Bone Marrow Transplantation* 2001;27:35-43.
92. Akalin E, Pascual M. Sensitization after kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1: 433-40.
93. Lubenko A, Rodi KM. The detection by enzyme-linked immunosorbent assays of non-complement-fixing HLA antibodies in transfusion medicine. *Transfusion*. 1998; 38: 41-44.

94. Funke A, Berner R, Traichel B, Scheisser D, Lilitis JU, Niemeyer C. Frequency, natural course, and outcome of neonatal neutropenia. *Pediatrics* 2000; 106:45-51.
95. Segel GB, Halterman JS. Neutropenia in pediatric practice, *Pediatrics in Review* 2008; 29:12-24.
96. Casponi F, Sarzi-Puttini P, Zanella A. Primary and secondary autoimmune neutropenia. *Arthritis Res Ther* 2005;7(5):208-14.
97. Klein C. Molecular basis of congenital neutropenia. *Haematologica* 2009; 94(10):1333-36.
98. Janes RM, Kinsey SE. The investigation and management of chronic neutropenia in children, *Arch Dis Child* 2006; 91: 852-858.
99. Sharma G, Nesin M, Feurstein M, Bussel JB. Maternal and neonatal characteristics associated with neonatal neutropenia in hypertensive pregnancies. *Am J Perinatol* 2009; 26(9): 683-89, sažetak.
100. Anderson D, Blanchette V, Brouwers M, Couban S. i ostali. Guidelines on the use of intravenous immune globulin in hematologic conditions. *Transfus Med Rew* 2007; 21(2): 53-56.
101. Lakshman R, Finn A. Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol* 2001; 54: 7-19.
102. Rodwell RL, Gray PH, Taylor KM, Minchinton R. Granulocyte colony stimulating factor treatment for alloimmune neonatal neutropenia. *Arch Disease Child* 1996; 75: 57-58.
103. Rosenberg PS, Alter PB, Bolyard AA, Bonilla MA, Boxer LA i ostali. The incidence of leukaemia and mortality from sepsis in the patients with severe congenital neutropenia receiving long-term G-CSF therapy. *Blood* 2006; 107(12): 4628-35.

104. Verheugt FWA, von dem Borne AEGK, van Noord-Bokhorst JC, van Elven EH, Engelfriet CP. Serological, immunochemical and immunocytological properties of granulocyte antibodies. *Vox Sang* 1978;35: 294-303.
105. Lalezari P, Khorshidi M, Detection of neutrophil and platelet antibodies: agglutination, immunofluorescence and flow cytometry, U: Mc Millan R. *Methods in haematology: immune cytopenias*, 1. izd., New York, Churchill Livingstone, 1979, str 149-162.
106. Terasaki PI, Bernoco D, Park MS, Ozturk G, Imaki Y. Microdroplet testing for HLA-A,-B,-C and D antigens. *Am J Clin Pthol*, 1978; 69-103.
107. Bux J. Challenges in the determination of clinically significant granulocyte antibodies and antigens. *Tranfus Med Rew* 1996; 3: 222-32.
108. Tait BD, Hudson F, Bewin G, Cantwell L, Holdsworth R. Solid phase HLA antibody detection technology-challenges in interpretation. *Tissue Antigens* 2010;Apr 8/Epub/
109. Flesch K.B, Bauer F and Neppert J. Rapid typing of the human Fc γ receptor IIIA Polymorphism by polymerase chain reaction amplification with allele-specific primers. *Transfusion*, 1998; 38: 174-176.
110. Schaffer M, Olerup O. HLA-AB typing by polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors, and increased resolution compared to serological typing. *Tissue Antigens* 2001; 58(5):299-307.
111. Cartron J, Tchernia G, Celton JL, Damay M, Cheron G, Farrokhi P, Badoual J. Alloimmune neonatal neutropenia. *Sem J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13(1): 21-25.

112. Lalezari P, Murphy GB, Allen FH Jr. NB1, a new neutrophil specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia, J Clin Invest 1971; 50: 1108-1115.
113. Madyastha PR, Glassman AB, Groves WE, Levine DH, Davidson R. A computerized system for the identification of alloimmune neutropenia in neonates. Comput Methods Programs Biomed 1985; 20(3): 241-247, sažetak.
114. Han HT, Chey MJ, Han KS. Granulocyte antibodies in Korean neonates with neutropenia. J Korean Med Sci 2006; 21: 627-632.
115. Davoren A, Saving K, Mc Frland JG, Aster RH, Curtis BR. Neonatal neutropenia and bacterial sepsis associated with placental transfer of maternal neutrophil-specific autoantibodies. Transfusion 2004; 44(7): 1041-1046.
116. Boxer LA. Severe congenital neutropenia: genetics and pathogenesis. Transactions of the American clinical and climatological association 2006; 117: 13-32.
117. Sella R, Flomenbilt L, Goldstein I, Kaplinsky C. Detection of anti-neutrophil antibodies in autoimmune neutropenia in infancy: A multicenter study. IMAJ 2010; 12: 91-96.
118. de Vries E, Koene HR, Vossen JK, Gratama J-W, von dem Borne AEGKr. Waaijer JLM, Haraldsson A, deHass M, van Tol MJD. Identification of an unusual Fcy Receptor IIIa (CD16) on natural killer cells in the patient with recurrent infections. Blood 1996; 88(8): 3022-3027.
119. Zuppa AA, Girlando P, Florio MG, Cota F, Romagnoli C, Tortorolo G. Influence of maternal preeclampsia on recombinant human granulocyte colony-stimulating factor affect in neutropenic neonates with

- suspected sepsis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 102(2): 131-136.
120. Han HT, Chey MJ, Han KS. A case of neonatal alloimmune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-1a (HNA-1a) antibody. *J Korean Med Sci* 2006; 21: 351-354.
121. Felix JK, Calhoun DA. Neonatal alloimmune neutropenia in premature monozygous twins. *Pediatrics* 2000; 106(1): 340-342.
122. Huizinga TWJ, Kuijpers RWAM, Kleijer M, Schulpen TWJ, Cuypers TM, Roos D, von dem Borne AEGK. Maternal genomic neutrophil FcRIII deficiency leading to neonatal isoimmune neutropenia. *Blood* 1990; 76(10): 1927-1032.
123. Oudelsuys-Murphy AM. Delayed umbilical cord separation in alloimmune neutropenia. *Archives of Disease in Childhood* 1993; 69: 331.
124. Bedford Russell AR, Emmerson AJB, Wilkinson N, Chant T, Sweet DG, Halliday HL, Holland B, Davies EG. A trial of recombinant human granulocyte colony stimulating factor for the treatment of very low birthweight infants with presumed sepsis and neutropenia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2001; 84: 172-176.
125. Mauldin PD, Salgado CD, Hansen IS, Durup DT, Bosso JA. Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010; 54(1): 109-115.
126. Modi N, Carr R. Promising stratagems for reduction of burden of neonatal sepsis. *Arch Dis Fetal Neonatal* 2000;83: 150-153.

127. Durhan LJ, Ai J, Massullo P, Kindwall-Keller T, Randalli MA, Alavos BR. Novel mechanism of G-CSF refractoriness in patients with severe congenital neutropenia. *Blood* 2005; 105(2): 584-591.
128. Buckwold AE, Emson HE. Acute neonatal neutropenia. *Canad MAJ* 1959; 86: 116-119.
129. de Hass M, Muniz-Diaz E, Alonso LG, van der Kolk K, Kos M, Buddeleijer L, Porcelijn L, von dem Borne AEG. Neutrophil antigen 5b is carried by protein, migrating from 70 to 95 kDa, and may be involved in neonatal alloimmune neutropenia. *Transfusion* 2000; 40: 222-227.
130. Sach UJH, Chavakis T, Fung L, Lohrenz A, Bux J, Reil A, Ruf A, Santoso S. Human alloantibody anti-Mart interferes with Mac-1 dependent leukocyte adhesion, *Blood* 2004; 104(3): 727-734.
131. Curtis BR, Reno C, Aster RH. Neonatal alloimmune neutropenia attributed to maternal immunoglobulin G antibodies against the neutrophil alloantigen HNA-1c (SH): a report of five cases, *Transfusion* 2005;45: 1308-1313.
132. Al-Sheikh I, Al-Khalifa M, Rahi A, Al Quathani FA. Neonatal alloimmune neutropenia due to anti-HNA-1b,. *Anal of Saudi Medicine* 2002; 22 (3-4): 230-231.
133. Maheswari A, Christensen RD, Calhoun DA. Resistance to recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in neonatal alloimmune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-2a (NB1) antibodies. *Pediatrics* 2002; 109: e64, DOI: 10.1542/peds.109.e64.
134. Pocock CF, Lucas GF, Giles C, Vassiliou G, Cwynarski K, Rezvani K, Apperly JF, Goldman JM. Immune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-2a (NB1) antibodies following

- unrelated donor stem cell transplantation for chronic myeloid leukaemia: perpetuation by granulocyte colony-stimulating factor. *Br J Haematol*, 2001; 113(2): 483-485.
135. Stroncek DF, Shapiro RS, Filipovich AH, Plachta LB, Clay ME. Prolonged neutropenia resulting from antibodies to neutrophil-specific antigen NB1 following marrow transplantation. *Transfusion*, 1993; 33(2):158-63.
136. Latini G, Del Vecchio A, Rosati E, Borzini P, Chirico G, Rondini G. Different responses to granulocyte colony-stimulating factor treatment in siblings with alloimmune neonatal neutropenia. *Acta Paediatr*, 1999; 88:1407-1409.
137. Girlando P, Zuppa AA, Romagnoli C, Tortorolo G. Transient effect of granulocyte colony-stimulating factor in allo-immune neonatal neutropenia. *Biol Neonate*, 2000; 78: 277-280.
138. Tomicic M, Starcevic M, Zach V, Hundric-Haspl Z. Alloimmune neonatal neutropenia due to anti-HNA-2a alloimmunization with severe and prolonged neutropenia but mild clinical course: two case reports. *Arch Med Res* 2007; 38: 792-796.
139. Tomicic M, Starcevic M, Zach V, Bingulac-Popovic J, Hundric-Haspl Z. A case of neonatal alloimmune neutropenia due to Fc gamma receptor IIIb ison antibodies treated with recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Case Reports in Medicine* 2009, doi:10.1155/2009/71745.
140. van Leeuwen EF, Roord JJ, de Gast GC, van der Plas-van Dalen C. Neonatal neutropenia due to maternal autoantibodies against neutrophils. *Br MJ* 1983; 287: 94.

141. Okumus N, Türkyilmaz C, Önal EE, Atalay Y, Koç, Nas T. Ritodrine-induced transient neutropenia in newborn twins after *in utero* exposure: Report of first case. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 58(4): 445-446.
142. Skacel PO, Stacey TE, Tidmarsh CE, Contreras M. Maternal alloimmunization to HLA, platelet and granulocyte-specific antigens during pregnancy: its influence on cord blood granulocyte and platelet count. *Br J Haematol* 1989; 71 (1): 119-123, sažetak
143. Panzer S, Mayr RW, Eicheleberger B. Light chain phenotypes of HLA antibodies in cases with suspected alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang* 2005; 89: 261-264.
144. Koyama N, Ohama Y, Kaneko K, Itakura Y, Nakamura T, Takasaki J, Tanaka T, Egucshi H, Kawase H, Kamiya K. Association of neonatal thrombocytopenia and maternal anti-HLA antibodies. *Acta Paediatr Jpn* 1991; 33(1): 71-76, sažetak
145. Onishi S, Okubo S, Matsuzaki T, Ishida T, Yasunga K. Report of two cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by anti-HLA antibody, and their screening using umbilical cord blood. *Rinsho Ketsuaki* 1992; 33(1): 42-47, sažetak.
146. Kummerle-Deschner J, Scheel-Walter HG, Speer CP. G-CSF therapy in a neonate with alloimmune neutropenia. *Geburtshilfe Neonatol* 1997; 201(6): 273-276, sažetak.
147. Hunt JS. Intrinsic and extrinsic regulation of placental HLA class I genes and antigens, u: HLA and maternal-fetal relationship, ed Hunt JS, RG Company, 1996, str. 88-177.
148. Takahashi D, Fujihara M, Azuma H, Miyazaki T, Uchimura D, Wakamoto S, Sato S, Kato T, Ikeda H. Stimulation of human neutrophils

with sera containing HLA class I alloantibody causes preferential degranulation of azurophilic granules and secretory vesicles. *Vox Sang* 2010; 98: 560-566.

149. Tomacic M, Starcevic M, Bux J, Zach V, Hundric-Haspl Z, Drazic V, Grahovac B. Severe neonatal neutropenia due to anti-human leucocyte antigen B49 alloimmunization only: a case report. *Transfusion Medicine* 2003; 13: 233-237.

150. Starcevic M, Tomacic, Malenica M, Zach V. Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by anti-HLA-A24 alloantibodies. *Acta Paediatrica* 2010; 99: 630-632.

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10. travnja 1961. godine u Zagrebu. Nakon osnovnog i srednjeg obrazovanja u Zagrebu, 1979. godine upisujem Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu koji završavam u siječnju 1985. godine.

Obvezni liječnički staž provodim u Domu zdravlja Črnomerec u Zagrebu. Ispit iz stručne osposobljenosti za samostalan rad položila sam u lipnju 1986. godine. Nakon toga dvije godine radim kao liječnik opće medicine u DZ "Črnomerec" i DZ "Centar" u Zagrebu.

Specijalizaciju iz transfuziologije za "Sveučilišnu bolnicu Zagreb-u osnivanju" započela sam u rujnu 1989. godine. Specijalistički ispit položila sam u prosincu 1992. godine.

Od veljače 1993. godine do danas, u stalnom sam radnom odnosu u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu u svojstvu liječnika specijalista transfuziologa-voditelja Odsjeka za imunogenetiku trombocita i leukocita i hemostazu.

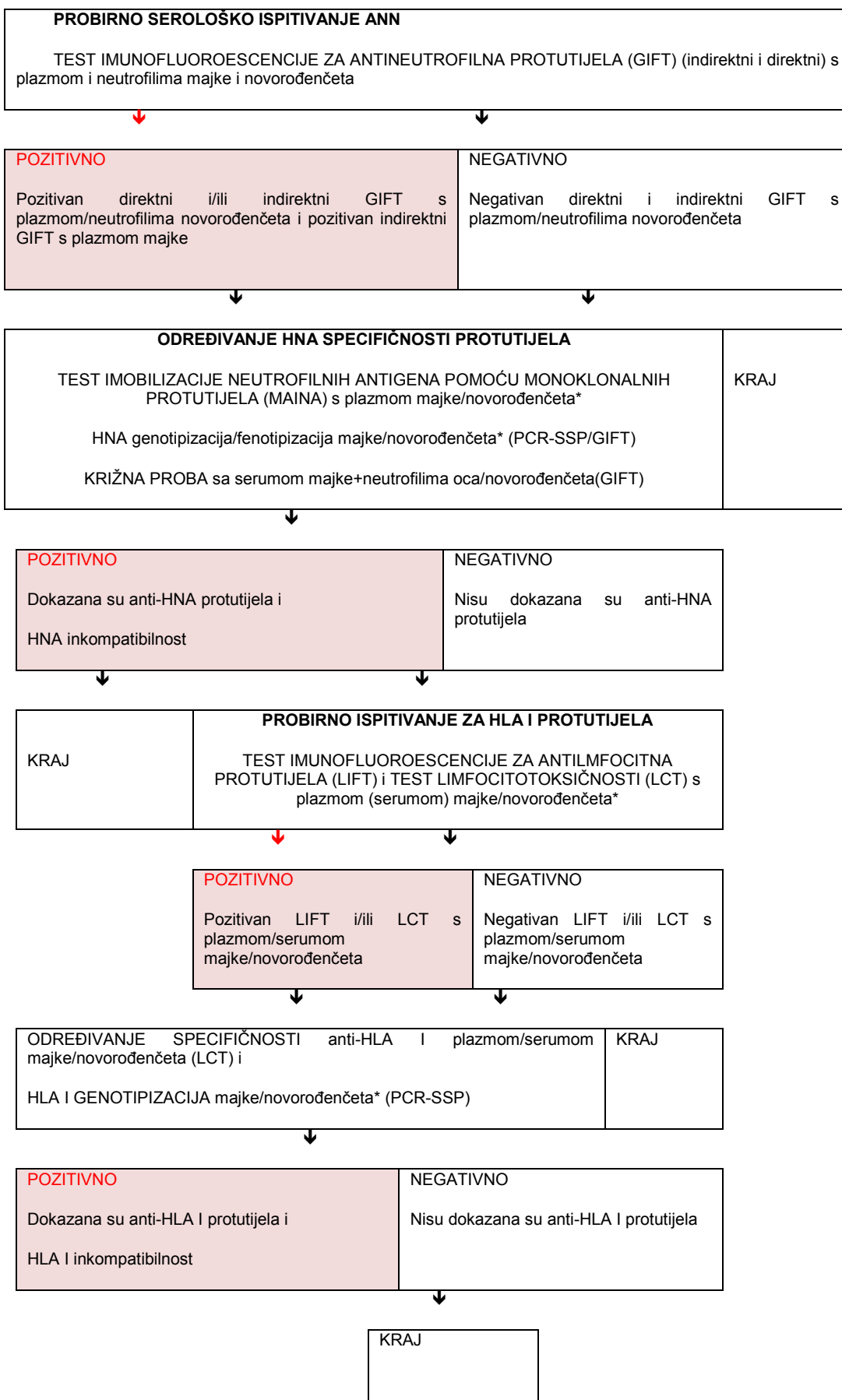
Poslijediplomski studij iz "Hematologije" upisujem školske godine 1990/1991. Promovirana sam u magistra medicinskih znanosti, nakon obrane magistarskog rada pod naslovom "Učestalost i značenje antitrombocitnih protutijela u trudnica i hematoloških bolesnika" u svibnju 1998. godine.

Od 2008. godine predstavnik sam Hrvatske u znanstvenom odboru međunarodne Radne grupe za trombocitnu i granulocitnu imuno-biologiju, „International Society of Blood Transfusion „.

U razdoblju od 1993. godine do danas kontinuirano se bavim stručnim i znanstvenim radom rezultat čega su: 50 kongresnih sažetaka, 17 radova citiranih u NLM od kojih su 5 znanstvena te magistarski rad i 10 radova citiranih u CC.

Fakultetsko vijeće Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu odobrilo mi je izradu doktorske disertacije pod naslovom „Serološke, molekularne i kliničke osobine aloimune neonatalne neutropenije“ 30. rujna 2008. godine.

PRILOG 2 **ALGORITAM SEROLOŠKOG I MOLEKULARNOG ISPITIVANJA ALOIMUNE NEONATALNE NEUTROPENIJE (ANN)**



*određivanje specifičnosti protutijela u plazmi novorođenčeta i HNA/HLA tipizacija nije obvezna PCR-SSP=polimerazna lančana reakcija-začetnici specifični za sekvencu