

FNAIT – en livstruende tilstand som krever rask diagnose



FNAIT er den hyppigste enkeltårsaken til alvorlig trombocytopeni hos nyfødte.

RASK DIAGNOSTISERING kan være helt avgjørende for fostre og nyfødte med Føtal/neonatal alloimmun trombocytopeni (FNAIT). Nasjonalt referanselaboratorium for avansert blodplateimmunologi på UNN i Tromsø utfører alle laboratorieanalyser som trengs for å stille diagnosen.



Av **KRISTINE TOLLEFSEN**, bioingeniør ved Nasjonalt referanselaboratorium for avansert blodplateimmunologi, Universitetssykehuset Nord-Norge

E-post: kristine.tollefsen@unn.no

Føtal/neonatal alloimmun trombocytopeni (FNAIT) er en tilstand hvor blodplaten til fosteret eller den nyfødte ødelegges av maternelle platereaktive antistoffer som krysser placenta under graviditeten (1). FNAIT kan være livstruende for barnet som rammes, og fordi svangerskapsomsorgen ikke inkluderer screening med tanke på platereaktive antistoffer, oppdages tilstanden oftest tilfeldig etter fødselen (2).

FNAIT er den hyppigste enkeltårsaken til alvorlig trombocytopeni hos nyfødte (3), og bør alltid mistenkes dersom det fødes barn med trombocytopeni uten annen forklaring. Diagnostiseringen skjer ved å påvise alloantistoffer av IgG-klasse hos mor, som reagerer med antigen uttrykt på barnets blodplater. Antigenforlikelighet mellom mor, far og barn, tilsvarende antistoffets spesifisitet, støtter diagnosen (1). Nasjonalt referan-

selaboratorium for avansert blodplateimmunologi på UNN i Tromsø utfører alle laboratorieanalyser som er nødvendig for å stille en FNAIT-diagnose. Laboratoriet mottar prøver fra hele landet til slik utredning.

Blodplateantigener

Humane blodplater uttrykker mange unike blodplateantigener (HPA) lokalisert på ulike glykoproteiner i cellemembranen. Det er så langt beskrevet mer enn 24 ulike HPA-varianter, de klinisk viktigste med tanke på FNAIT er oppsummert i tabell 1. Blodplateantigenene er organisert i biallele systemer, der allelet med høyest frekvens betegnes «a» mens allelet med lavest frekvens betegnes «b». Man er enten homozygot (aa eller bb) eller heterozygot (ab) i hvert av HPA-systemene. Forskjellen mellom a- og b-allelet defineres av en enkelt aminosyre-substitusjon forårsaket av en SNP (single nucleotide polymorfism) i genot som koder for det aktuelle glykoproteinet (4).

Patogenese

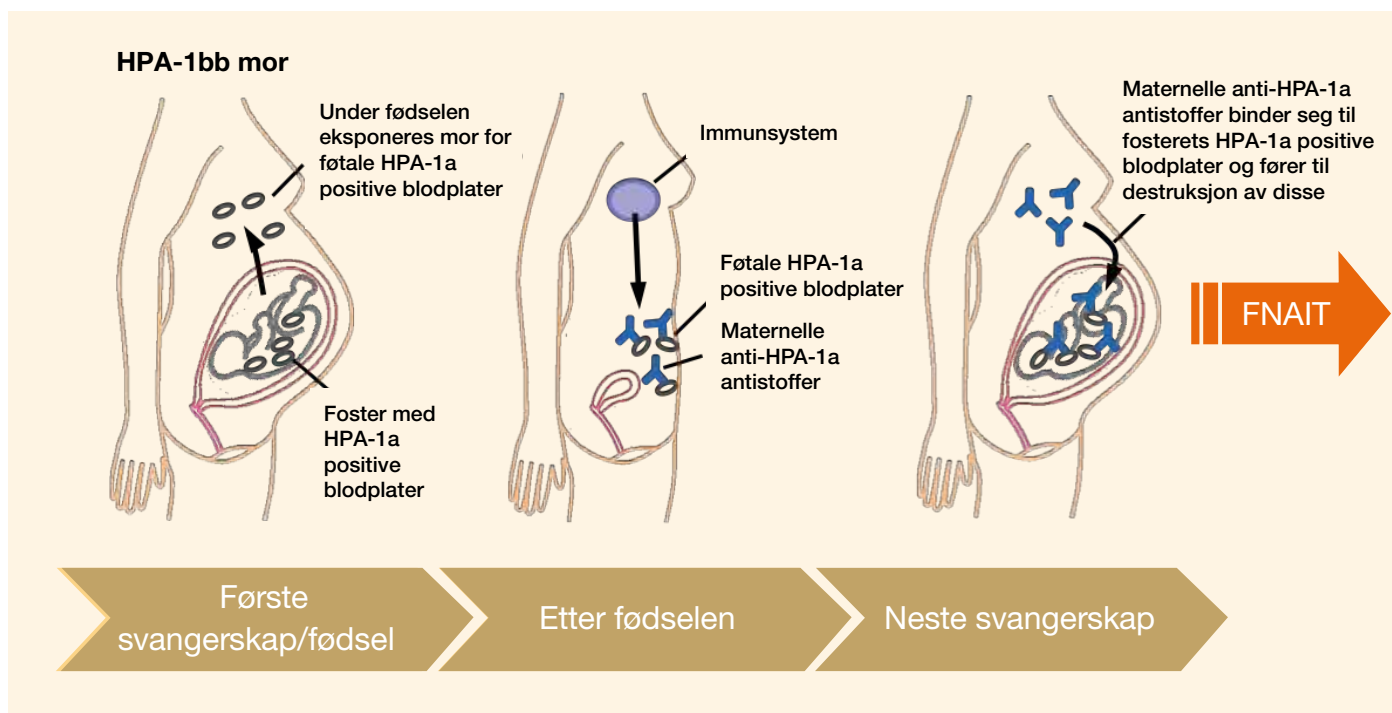
Hvis man er homozygot i et HPA-system, kan kroppen danne antistoffer rettet mot det manglende antigenet. Forutsetning-

TABELL 1: De klinisk viktigste alloantigensystemer ifm. FNAIT i den kaukasiske befolkning (5).

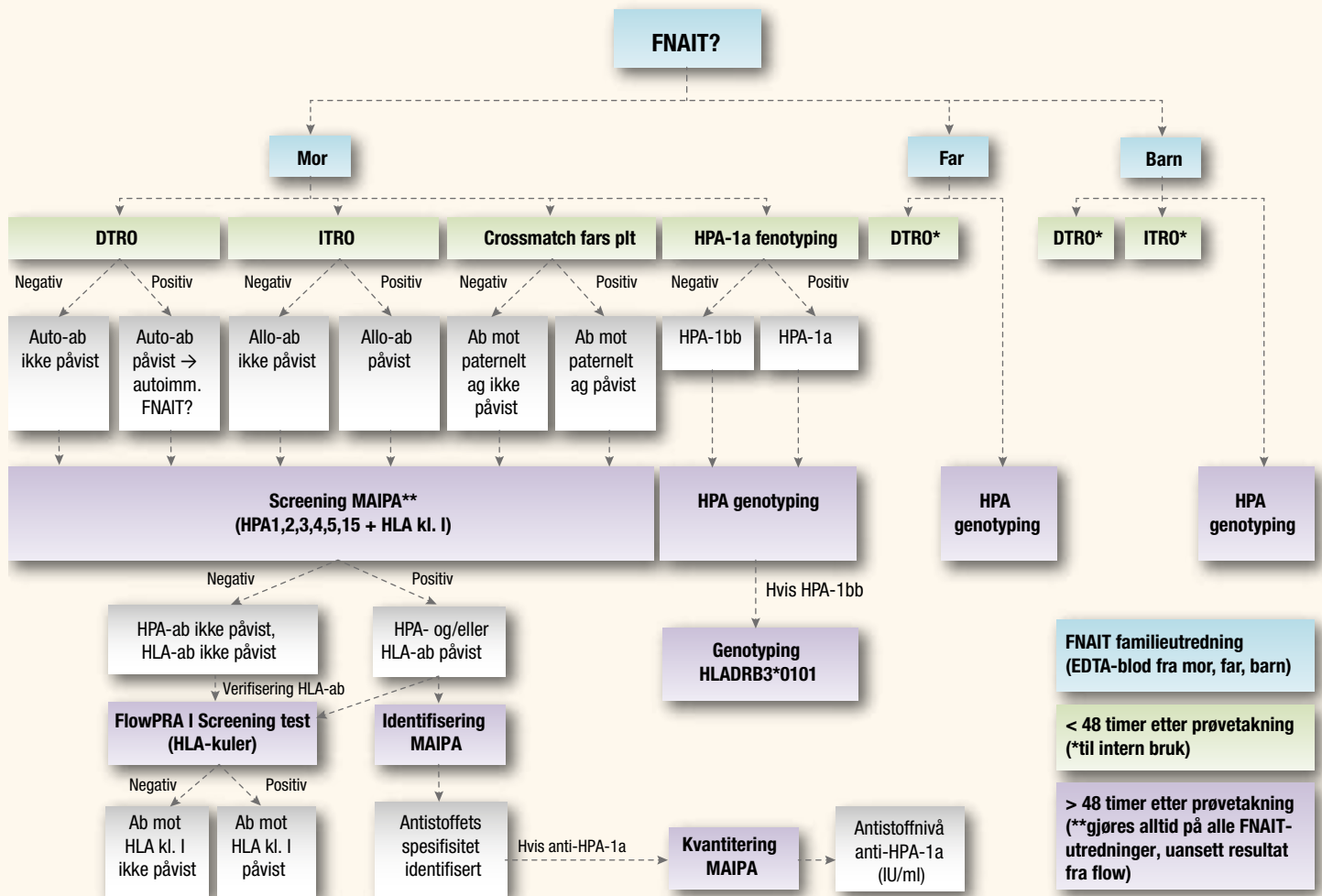
Alloantigen-system	Alleler	Fenotype-frekvens	Lokalisering / glykoprotein	SNP	Aminosyre-substitusjon
HPA-1	HPA-1a HPA-1b	aa: 72 % ab: 26 % bb: 2 %	GPIIIa	196 T>C	Leu33Pro
HPA-2	HPA-2a HPA-2b	aa: 85 % ab: 14 % bb: 1 %	GPIb	524 C>T	Thr145Met
HPA-3	HPA-3a HPA-3b	aa: 37 % ab: 48 % bb: 15 %	GPIIb	2622 T>G	Ile843Ser
HPA-4	HPA-4a HPA-4b	aa: >99,9 % ab: <0,1 % bb: <0,1 %	GPIIIa	526 G>A	Arg143Gln
HPA-5	HPA-5a HPA-5b	aa: 80 % ab: 19 % bb: 1 %	GPIa	1648 G>A	Lys505Glu
HPA-15	HPA-15a HPA-15b	aa: 35 % ab: 42 % bb: 23 %	CD109	2108 A>C	Tyr682Ser

gen er at immunsystemet eksponeres for blodplater som uttrykker det manglende antigenet. Det kan enten skje via uforlidelige blodtransfusjoner eller graviditeter. En gravid kvinne kan immuniseres

hvis fosteret uttrykker et fremmed HPA, arvet fra far, på sine blodplater (se figur 1). Immuniseringen kan skje i løpet av graviditeten eller under fødselen, sannsynligvis som resultat av en føtomater-



FIGUR 1. HPA-1a alloimmunisering av HPA-1bb mor resulterer i dannelse av anti-HPA-1a antistoff og FNAIT i påfølgende svangerskap. Figuren er gjengitt med tillatelse fra <http://profna.it/en-parents/what-is-fna.it> (17.10.2013). Figurteksten er oversatt til norsk av artikkelforfatteren.



FIGUR 2. Flytskjemaet viser hvilke laboratorieanalyser som utføres i forbindelse med en FNAIT-familieutredning. De fleste av undersøkelsene gjøres på mors prøve, men for en fullstendig utredning er det nødvendig med prøvemateriale også fra barnet og barnets far. Prøvematerialet er EDTA fullblod, og det må være laboratoriet i hende innen 48 timer etter prøvetakning.

nell blødning (6). Anti-HPA-antistoffer av IgG-klasse kan passere placenta, enten i det aktuelle svangerskapet (ved immunisering i forbindelse med graviditet) eller i neste svangerskap (ved immunisering under fødselen). Dersom det foreligger HPA-uforlikelighet mellom mor og foster, vil maternelle antistoffer i fosterets sirkulasjon binde seg til blodplatene. De blir så brutt ned av fagocytterende celler. Barnet vil som en følge av dette bli trombocytopenisk og utsatt for økt blødningsrisiko (1).

Forekomst

FNAIT forekommer i cirka 1 av 2000 gra-

viditeter, og rammer statistisk sett 20-30 foster/nyfødte i Norge hvert år. Tilstanden skyldes som oftest uforlikelighet mellom mor og foster for humant plateantigen-1a (HPA-1a), når mor er HPA-1bb og fosteret har arvet et a-allel fra sin far og dermed er HPA-1ab (1). HPA-1a-alloimmunisering er sterkt assosiert med et spesielt HLA-allel; HLA DRB3*0101. 90 prosent av kvinnene som produserer anti-HPA-1a antistoff er HLA DRB3*0101 positive, mens frekvensen i resten av befolkningen er mindre enn 30 prosent (2).

Anti-HPA-1a antistoff forårsaker 75 – 80 prosent av FNAIT-tilfellene i den kau-

kasiske befolkningen. Deretter følger anti-HPA-5b som står for cirka 15 prosent av tilfellene, mens cirka fem prosent skyldes anti-HPA-15b. Andre HPA-antistoffer fører sjelden til FNAIT (7,8).

Antistoffer mot HLA klasse I finnes hos cirka 30 prosent av kvinner som har vært gravide, men selv om blodplatene uttrykker HLA klasse I antigener, er det foreløpig ikke vist noen sikker sammenheng mellom slike antistoffer og FNAIT (9).

Symptomer og behandling

FNAIT oppdages gjerne ved at den nyfødte har synlige petekkier, men selv alvorlig

grad av trombocytopeni hos barnet kan være asymptomatisk. Den mest fryktede komplikasjonen assosiert med FNAIT er intrakraniell blødning (ICH) som kan føre til blindhet, alvorlige nevrologiske skader og i verste fall død (2). ICH påvises hos opptil 26 prosent av de nyfødte med FNAIT der årsaken er anti-HPA-1a. Dødeligheten i denne gruppen er cirka sju prosent (10).

FNAIT behandles ved at barnet transfunderes med fornlige blodplater og i noen tilfeller intravenøst immunglobulin. Ultralydundersøkelse av hjernen utføres for å avdekke eventuell ICH. I påfølgende svangerskap bør moren følges opp med jevnlig ultralydundersøkelser og antistoffmålinger. Høyt nivå av maternelt anti-HPA-1a antistoff i siste trimester gir økt risiko for å føde barn med alvorlig FNAIT. Dersom antistoffnivået er > 3 IU/ml, anbefales keisersnitt to – fire uker før termin med fornlige blodplater i beredskap til barnet (transfunderes ved platetall $< 35 \times 10^9/l$) (2,6).

Laboratorieanalyser

Diagnostisering av FNAIT involverer en rekke ulike laboratorieanalyser, og prosessen er både tids- og arbeidskrevende (se figur 2). Det kan ta to – fire uker før et endelig svar foreligger. Flowcytometriske screeningundersøkelser gjøres imidlertid innen 48 timer etter prøvetakning, og tillater rask påvisning av plateraktive antistoffer i morens plasma.

Indirekte trombocytantistofftest (ITRO)

Plateraktive alloantistoffer påvises ved hjelp av indirekte trombocytantistofftest (ITRO), hvor mors plasma inkuberes med intakte blodplater fra åtte forskjellige blodgivere (blodplatepanel). Hvis det finnes plateraktive antistoffer i mors plasma, vil de binde seg til de korresponderende antigenene på blodplatene i panelet. Binding av maternelle alloantistoffer detekteres så ved hjelp av et sekundært fluorescensmerket anti-humant IgG og flowcytometri (11).

Ved å benytte det samme testprinsippet (ITRO), gjøres en *crossmatch* mellom mors plasma og fars blodplater for å påvise maternelle antistoffer mot paternelle lavfrekvente antigener.

Direkte trombocytantistofftest (DTRO)

Plateraktive autoantistoffer påvises ved hjelp av direkte trombocytantistofftest (DTRO). Prinsippet er som for ITRO, med den forskjellen at vi nå inkuberer mors plasma med hennes egne blodplater. Dette gjøres for å ekskludere diagnosen føtal/neonatal autoimmun trombocytopeni, en tilstand hvor mor har autoantistoffer mot egne blodplater som – hvis de er av IgG-klasse – kan krysse placenta og gi trombocytopeni hos barnet. Dette er en mindre alvorlig tilstand enn FNAIT, men viktig å utelukke (12).

HPA-1a fenotyping

HPA-1a fenotyping muliggjør rask identifisering av HPA-1bb personer. Fullblod fra mor inkuberes med et fluorescensmerket monoklonalt antistoff som binder seg spesifikt til HPA-1a positive blodplater. Binding av antistoffet detekteres ved hjelp av flowcytometri (13). Dersom mors blodplater er negative i flow, har hun ikke HPA-1a-allelet og er dermed HPA-1bb. Resultatet fra fenotyping må imidlertid alltid verifiseres gjennom genotyping som gjøres senere i utredningsprosessen.

Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA)

De flowcytometriske screeningundersøkelsene er relativt sensitive, men kan ikke skille mellom anti-HPA og anti-HLA-antistoffer. Det vil si, de har lav spesifitet dersom en prøve inneholder begge typer antistoffer. Så for å bekrefte og sikkert identifisere antistoffer påvist med flowcytometri, benyttes et glykoprotein-spesifikt assay. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA) er en teknikk som gjør det mulig å identifisere et antistoffs spesifitet, selv om plasma inneholder en blanding av ulike antistoffer. Mors plasma inkuberes med blodplater fra blodgivere med kjent HPA-genotype eller fars blodplater. Maternelle antistoffer vil binde seg til det korresponderende antigenet/glykoproteinet på blodplatene. Deretter isoleres de ulike glykoproteinene ved hjelp av monoklonale glykoproteinspesifikke antistoffer. Analysen bygger videre på ELISA-prinsippet (Enzyme linked immunosorbent assay), og OD-verdien

(optisk tetthet) målt i sluttproduktet er proporsjonal med mengde humant antistoff i prøven (14).

Kvantitering av anti-HPA-1a antistoff

MAIPA-teknikken kan også benyttes til kvantitering av anti-HPA-1a antistoff. Et referanseplasma seriefortynnes (1:2 – 1:64) og inkluderes i MAIPA-oppsettet. En standardkurve plottes på bakgrunn av OD-verdiene. Prøver med høyt antistoffnivå fortynnes slik at de har en OD-verdi som faller innenfor det lineære området av standardkurven, og man benytter deretter kurven for å finne mengden av antistoff i prøvene (15).

FlowPRA I Screening test®

Antistoffer mot HLA klasse I kan også påvises ved hjelp av såkalte FlowPRA-kuler. Denne testen er mer sensitiv enn MAIPA, og brukes for flowcytometrisk screening av antistoffer mot HLA klasse I når MAIPA ikke gir et konklusivt svar.

FlowPRA I Screening test® (One Lambda) inneholder et panel av FlowPRA-kuler, det vil si mikropartikler som er coatet med rensede HLA-antigener. Alle vanlige og mange sjeldne HLA-antigener er representert i panelet. Mors plasma inkuberes med FlowPRA-kulene og hvis det finnes antistoffer mot HLA klasse I i prøven, vil de binde seg til de korresponderende antigenene. Et sekundært fluorescensmerket anti-humant IgG brukes for å detektere binding av humane antistoffer til kulene ved hjelp av flowcytometri (16).

HPA-genotyping

Dersom plateraktive antistoffer påvises hos mor, må det undersøkes om det foreligger tilsvarende HPA-antigenforlikelighet mellom mor, far og barn. Det er dessuten av diagnostisk verdi å verifisere at mor mangler det HPA-allelet som hun har dannet antistoffer mot.

HPA-genotyping gjøres ved hjelp av TaqMan® allelediskriminering (5' nuclease assay), der fluorescensmerkede allelespesifikke prober tillater diskriminering mellom allelene a og b i hvert av HPA-systemene. Probesequensene varierer kun i den ene basen som definerer den enkelte SNP (17).

TABELL 2: Resultater fra innledende undersøkelser utført på mors plasma.

Sreening-celle	ITRO								Cross-match	DTRO	HPA-1a fenotyp.
	Nr. 1 HPA-1a	Nr. 2 HPA-1a	Nr. 3 HPA-1a	Nr. 4 HPA-1a	Nr. 5 HPA-1a	Nr. 6 HPA-1a	Nr. 7 HPA-1a	Nr. 8 HPA-1bb	Fars plt.	Mors plt.	Mors plt.
Resultat	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)

TABELL 3: Resultat identifisering av antistoff og genotyping.

Screening-celle	Screening/identifisering MAIPA									KvantMAI-PA	FlowPRA-kuler	Genotyping
	Fars plt.	HPA-1aa	HPA-1bb	HPA-2ab	HPA-3ab	HPA-4ab	HPA-5ab	HPA-15ab	Anti-HLA kl.I	Anti-HPA-1a		
Mor	(+) GpIIIa	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+) svak	2 IU/ml	(+)	1bb
Far												1aa
Barn												1ab

KASUISTIKK

Når alle laboratorieanalysene er utført, vurderes prøvesvarene av bioingeniørerne på referanselaboratoriet i samarbeid med laboratoriets lege. Følgende kasuistikk illustrerer utredningsprosessen nærmere:

På et sykehus på Vestlandet fødes en pike en uke før termin. Dette er morens andre barn, og svangerskapet har forløpt uten komplikasjoner. Pikens fødselsvekt er normal og hun virker ellers frisk, men moren oppdager at barnet lett får blåmerker. Det rekvireres telling av blodplater, og undersøkelsen avslører alvorlig trombocytopeni (platetall $16 \times 10^9/l$). Piken transfunderes med tilfeldige blodplater, platetallet stiger deretter til $39 \times 10^9/l$ for så å falle igjen. Behandlende lege mistenker FNAIT, og blodprøver av mor, far og barn sendes til Nasjonalt referanselaboratorium for avansert blodplateimmunologi på UNN for utredning.

Når familiens blodprøver ankommer referanselaboratoriet, prepareres prøvematerialet umiddelbart slik at de innledende flowcytometriske undersøkelsene kan utføres allerede samme dag (se tabell 2).

Indirekte trombocytantistofftest (ITRO) avslører reaktivitet i mors plasma mot

screeningcellene 1 – 7 i blodplatepanelet som er kjente HPA-1a blodgivere. Det påvises ikke reaktivitet mot screeningcelle 8 som er en kjent HPA-1bb blodgiver. Dette reaktivitetsmønsteret er typisk for prøver som inneholder anti-HPA-1a antistoff, så bioingeniøren mistenker umiddelbart at dette dreier seg om en FNAIT grunnet maternelle anti-HPA-1a antistoffer. Antigenspesifisiteten kan imidlertid ikke sikkert slås fast før det er gjort MAIPA.

Crossmatch mot fars blodplater viser at mor har IgG-antistoffer i plasma som reagerer med paternelle blodplateantigener.

Direkte trombocytantistofftest (DTRO) viser ingen autoreaktivitet i mors plasma mot hennes egne blodplater, og føtal/neonatal autoimmun trombocytopeni kan utelukkes.

HPA-1a fenotyping av morens blodplater viser at mor med stor sannsynlighet er HPA-1bb (HPA-1a negativ). Dette støtter mistanken om mulige anti-HPA-1a antistoffer.

Rekvirenten informeres umiddelbart om at barnets trombocytopeni sannsynligvis skyldes FNAIT forårsaket av anti-

HPA-1a antistoffer overført fra mor til barn. Ved behov for flere blodplatetransfusjoner, bør barnet få konsentrat fra en forlikelig HPA-1bb blodgiver. På laboratoriet fortsetter arbeidet for å identifisere det påviste platereaktive antistoffet (se tabell 3).

MAIPA utført med fars blodplater viser at mors plasma inneholder platereaktive antistoffer rettet mot antigener på GpIIIa. Etter videre utredning mot HPA-1aa og HPA-1bb screeningceller, identifiseres disse antistoffene som anti-HPA-1a. Det påvises ikke antistoffer mot HPA-1b, -2, -3, -4, -5 og -15. Mulige anti-HLA klasse I antistoffer påvises, men reaksjonen i MAIPA er noe svak og dette funnet undersøkes videre med supplerende teknikker.

Kvantitering av anti-HPA-1a antistoff viser et maternelt antistoffnivå på 2 IU/ml. Dette regnes ikke som spesielt høyt (jmf. sectiogrænse > 3 IU/ml), men det er ikke uvanlig at antistoffnivået er høyest tidlig i graviditeten for så å synke nærmere termin (6).

FlowPRA I Screening test® viser at mor har anti-HLA klasse I antistoffer i sitt plasma.

TaqMan® allelediskriminering verifiserer at mor er HPA-1bb. Far er HPA-1aa mens barnet er HPA-1ab som følge av å ha arvet et b-allel fra sin mor og et a-allel fra sin far.

Diagnose

Referanselaboratoriets konklusjon etter en samlet vurdering av alle prøvesvarene er følgende:

- Det påvises plateraktive antistoffer i mors plasma, spesifisitet: anti-HPA-1a. Antistoffnivå: 2 IU/ml.
- Mors genotype: HPA-1bb. Hun mangler HPA-1a-allelet, dette støtter at hun kan danne anti-HPA-1a antistoff som følge av alloimmunisering.
- Barnets genotype: HPA-1ab. Det påvises uforlikelighet mellom mor og barn i alloantigensystemet HPA-1.
- Det påvises ytterligere plateraktive antistoffer i mors plasma, spesifisitet: anti-HLA klasse I. Slike antistoffer er imidlertid ikke vist å forårsake FNAIT (9).

Svaret som sendes til rekvirenten konstaterer at piken har føtal/neonatal alloimmun trombocytopeni forårsaket av anti-HPA-1a antistoff. Det anbefales at mor følges opp i fremtidige svangerskap med kliniske undersøkelser/ultralyd og kvantitering av anti-HPA-1a antistoff.

Når rekvirenten mottar dette svaret, er familien reist hjem fra sykehuset. Barnets blodplattell er normalt, og det foreligger heldigvis ikke rapporter om ICH/hjerneskode. Resultatet fra utredningen er likevel viktig, både for å forklare barnets trombocytopeni men også med tanke på parets fremtidige barn. I neste svangerskap kan mor nå inkluderes i det anbefalte oppfølgingsprogrammet, noe som gir økt trygghet for mor og mindre risiko for blødningsskader hos barnet (2).

Konklusjon

Et klassisk FNAIT-kasus er her brukt for å vise hvordan tilstanden utredes på Nasjonalt referanselaboratorium for avansert blodplateimmunologi. I dette tilfellet visste ikke den gravide kvinnen at hun var i risikogruppen for dannelsen av materielle plateraktive antistoffer, og ingen forholdsregler ble tatt – verken i løpet av graviditeten eller under forløsningen. Heldigvis gikk det bra med dette barnet, men dessverre er ikke alle FNAIT-barn like heldige. Både i Norge og i resten av verden forskes det aktivt på FNAIT, blant annet er en mulig profylaktisk behandling for å hindre immunisering under utvikling (se www.profnait.eu). Kanskje vil en fungerende profylakse overbevise norske myndigheter om at det er riktig å innføre screening med tanke på plateraktive antistoffer i svangerskapsomsorgen. Inntil slik screening iverksettes, er det imidlertid viktig at alle barn som fødes med symptomer på trombocytopeni undersøkes for FNAIT. Så kan i alle fall fremtidige søsken nyte godt av det tilbudet om oppfølging som eksisterer per i dag. ■

Referanser

1. Blanchette VS, Johnson J, Rand M. The management of alloimmune neonatal thrombocytopenia. *Baillieres Clin Haematol*, 2000, 13: 365-90.
2. Kjeldsen-Kragh J, Killie MK, Tomter G, Golebiowska E et al. A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 2007, 110: 833-39.
3. Burrows RF, Kelton JG. Fetal thrombocytopenia and its relation to maternal thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 1993, 329: 1463-66.
4. Landau M, Rosenberg N. Molecular insight into human platelet antigens: structural and evolutionary conservation analyses offer new perspective to immunogenic disorders. *Transfusion*, 2001, 51: 558-69.
5. Lochowicz AJ, Curtis BR. Clinical applications of platelet antibody and antigen testing, *Lab Med*. 2011, 42: 687-92.
6. Killie MK, Husebekk A, Kjeldsen-Kragh J, Skogen B. A prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. *Haematologica*, 2008, 93: 870-77.
7. Davoren A, Curtis BR, Aster RH, McFarland JG. Human platelet antigen-specific alloantibodies in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2004, 44: 1220-25.
8. Ghevaert C, Campbell K, Walton J, Smith GA et al. Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2007, 47: 901-10.
9. King KE, Kao KJ, Bray PF et al. The role of HLA antibodies in neonatal thrombocytopenia: a prospective study. *Tissue Antigens*, 1996, 47: 206-11.
10. Spencer JA, Burrows RF. Feto-maternal alloimmune thrombocytopenia: a literature review and statistical analysis. *Aust NZ J Obstet Gynaecol*, 2001, 41: 45-55.
11. Skogen B, Christiansen D, Husebekk A. Flow cytometric analysis in platelet crossmatching using a platelet suspension immunofluorescence test. *Transfusion*, 1995 35: 832-36.
12. Bussel JB. Immune thrombocytopenia in pregnancy: autoimmune and alloimmune. *J Reprod Immunol*, 1997, 37: 35-61.
13. Killie MK, Kjeldsen-Kragh J, Randen I, Skogen B et al. Evaluation of a new flow cytometric HPA 1a screening method, a rapid and reliable tool for HPA 1a screening of blood donors and pregnant women. *Transfus Apher Sci*, 2004, 30: 89-92.
14. Kiefel V, Santoso S, Weishwit M, Mülller-Eckhardt C. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*, 1987, 70: 1722-26.
15. Bertrand G, Jallu V, Gouet M, Killie MK et al. Quantification of human platelet antigen-1a antibodies with the monoclonal antibody immobilization of platelet antigens procedure. *Transfusion*, 2005, 45: 1319-23.
16. Pei R, Wang G, Tarsitani C, Rojo S et al. Simultaneous HLA class I and class II antibodies screening with flow cytometry. *Hum Immunol*, 1998, 59: 313-22.
17. Bugert P, McBride S, Smith G, Dugrillon A et al. Microarray-based genotyping for blood groups: comparison of gene array and 5'-nuclease assay techniques with human platelet antigen as a model. *Transfusion*, 2005, 45: 654-59.