

SVEUČILIŠTE U SPLITU  
Podružnica  
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Maria Bošković**

**PRAVILNO IZVOĐENJE TITRA PROTUTIJELA KOD  
IMUNIZIRANIH TRUDNICA**

**Završni rad**

Split, 2014.

SVEUČILIŠTE U SPLITU  
Podružnica  
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Maria Bošković**

**PRAVILNO IZVOĐENJE TITRA PROTUTIJELA KOD  
IMUNIZIRANIH TRUDNICA**

**Završni rad**

Mentor:

**univ. mag. med. Mirela Ančić, dipl. ing. med. lab. dijagn.**

Split, 2014.

## *Zahvale*

*Zahvaljujem se svojoj mentorici univ. mag. med. Mireli Ančić na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog završnog rada.*

*Mojoj dragoj obitelji i prijateljima zahvaljujem na ljubavi, bezuvjetnoj podršci i neizmjernoj vjeri u moj uspjeh.*

# SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Patofiziologija i simptomi .....	2
1.1.1. Imunizacija .....	3
1.2. Dijagnostika .....	3
1.3. Liječenje .....	3
1.4. Prevencija .....	4
1.5. Definicije .....	6
1.6. Nasljeđivanje krvnih grupa .....	9
1.7. Titar .....	10
1.8. Antihumani gamaglobulin (AHG) .....	10
1.8.1. Indirektni antiglobulinski test .....	11
1.8.2. Direktni antiglobulinski test .....	11
1.9. Uzimanje uzoraka krvi .....	12
1.9.1. Pravilno čuvanje uzorka .....	13
<b>2. Cilj rada</b> .....	<b>14</b>
<b>3. Izvori podataka i metode</b> .....	<b>15</b>

3.1. Određivanje AB0 i RhD krvnih grupa metodom u epruveti.....	15
3.2. Određivanje AB0 i RhD krvne grupe metodom u mikrokartici pomoću automatskog uređaja za imunohematološku dijagnostiku Auto/Vue .....	17
3.3. Indirektni antiglobulinski test u mikrometodi: Ortho, Diamed, Pasteur.....	18
3.4. DAT u mikrometodi sa polispecifičnim antihumanim globulinom .....	25
3.5. Titar toplih antitijela u serumu .....	28
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>32</b>
<b>5. Rasprava .....</b>	<b>40</b>
<b>6. Zaključci .....</b>	<b>41</b>
<b>7. Literatura .....</b>	<b>42</b>
<b>8. Sažetak .....</b>	<b>43</b>
<b>9. Summary .....</b>	<b>44</b>
<b>10. Životopis .....</b>	<b>45</b>

# 1. UVOD

Rh imunizacija jedna je od ozbiljnih komplikacija trudnoće. Unatoč tome što je početkom prošlog stoljeća bila jednim od vodećih uzroka perinatalnog mortaliteta, danas se rijetko susreće u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Prije uvođenja profilakse anti D imunoglobulinima učestalost Rh imunizacije bila je između 1–2% svih trudnoća s perinatalnim mortalitetom i do 50 %. Danas je točnu učestalost Rh imunizacije teško ustanoviti jer brojni lakši oblici bolesti ostaju neprepoznati, a govori se o oko 6 –7 slučajeva na 1000 živorođene djece. Teži oblici bolesti još su rjeđi s učestalosti oko 2 na 1000. Uz smanjenje učestalosti, posljedični perinatalni mortalitet i morbiditet su također u bitnijem padu, ponajviše zbog novih metoda dijagnostike i terapije te mjera prevencije. [1] Rh-negativna majka nosi dijete koje je Rh- pozitivno, pri porođaju može doći do senzibilizacije majke djetetovim eritrocitima. Budući da protutijela protiv antigena Rh pripadaju razredu IgG, ona mogu prolaziti kroz posteljicu. To se u sljedećim trudnoćama i događa: svojim opsonizacijskim učinkom takva protutijela uzrokuju lizu eritrocita, što uzrokuje pojavu hemolitičke bolesti novorođenčadi (fetalna eritroblastoz). [3]

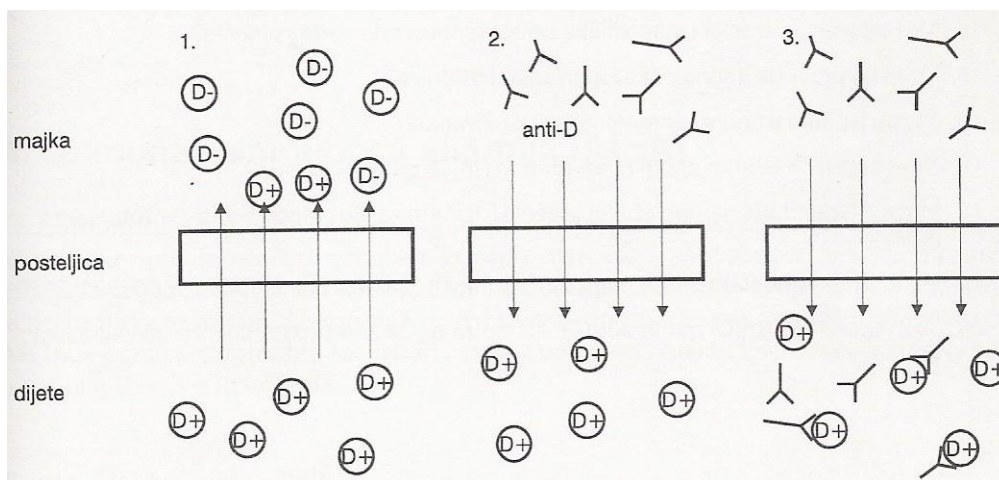
## 1.1. Patofiziologija i simptomi

Problem leži u pojavnosti različitih eritrocitnih antigena koji dovode do aktivacije imunog sustava te stvaranjem antitijela dovode do razgradnje fetalnih eritrocita sa svim posljedicama koje iz toga proizlaze. Najvažniji su antigeni CDE rhesus sustava, oni su unatoč dobro razvijenim metodama prevencije i dalje najčešći uzrok bolesti. No svakako treba imati na umu i druge antigene od kojih je najvažniji Kell, a slijede  $J_k$ , K, Fya, i brojni drugi. Liječenje i nove metode dijagnostike ne razlikuju se ovisno o tipu antigena koji je izazvao problem. Ukoliko je trudnica Rh negativne krvne grupe, otac djeteta Rh pozitivne, te njihovo dijete također Rh pozitivne može doći do razvitka Rh imunizacije ili hemolitičke bolesti fetusa i/ili novorođenčeta (HBFN). Problem u prvoj trudnoći većinom ne postoji. Ukoliko je nakon bilo kojeg od mogućih perinatalnih događanja gdje postoji mogućnost miješanja krvi majke i ploda (porod, trauma, intervencije i slično), a kada nisu primijenjene mjere prevencije, došlo do senzibilizacije imunološkog sustava majke posljedica može biti HBFN. Inicijalno dolazi

do produkcije imunoglobulina IgM klase, no taj je odgovor kratkoročan, a antitijela zbog svoje veličine i molekularne mase ne prelaze fetoplacentarnu barijeru, te ona nisu značajna u patofiziologiji Rh imunizacije. Kasnije, kada ponovno dođe do ekspozicije RhD antigenu memorijski B limfociti stvaraju IgG protutijela koja prolaze fetoplacentarnu barijeru te dolazi do aglutinacije i agregacije eritrocita te do njihova raspadanja. [1]

Fetalne eritrocite obložene majčinim protutijelima razgrađuju makrofagi slezene. Zbog razgradnje eritrocita nastaju anemije i pojačano stvaranje eritrocita u jetri (fetalna eritroblastoza). Iznimno pojačana eritropoeza u jetri uzrok je oštećenja jetrenih stanica, poremećaja jetrene funkcije i smanjene sinteze albumina. To je uzrok generaliziranih edema, što se naziva fetalnim hidropsom. Pojačana razgradnja eritrocita uzrok je porasta bilirubina. Dok je dijete u uterusu, bilirubin se izlučuje kroz majčin krvotok i bilirubin je konjugiran u majčinoj jetri. Nakon rođenja u djetetovoj cirkulaciji raste koncentracija bilirubina, jer su djetetova jetra nezrela i ne mogu konjugirati sav bilirubin koji nastaje raspadanjem eritrocita. To se vidi kao žuto obojenje bjeloočnica i kože. Nekonjugirani je bilirubin toksičan i u višoj koncentraciji uzrokuje i oštećenja moždanih stanica.

Karakterističan je laboratorijski nalaz smanjeni broj eritrocita, smanjena koncentracija hemoglobina, povećan broj retikulocita i povećana koncentracija bilirubina. Za hemolitičku bolest u novorođenčeta najkarakterističniji je nalaz pozitivnog direktnog antiglobulinskog testa (DAT-a) s novorođenčevim eritrocitima. To znači da majčina protutijela oblažu djetetove eritrocite. Indirektni je antiglobulinski test (IAT) pozitivan kada se protutijela nalaze u serumu, tj. osim toga što oblažu eritrocite, ona se nalaze i oko njih. [2]



Slika 1. Shematski prikaz nastanka Rh(D) HBN:

1. Prelaz fetalnih Rh(D) pozitivnih eritrocita u majčin krvotok
2. Stvaranje anti – D antitijela u majčinu krvotoku
3. Prijelaz anti – D antitijela kroz posteljicu i njihovo vezanje na fetalne eritrocite [2]

### **1.1.1. Imunizacija**

Jednom imunizirana osoba to ostaje cijeli život. U većini slučajeva to se dokazuje nalazom protutijela u serumu, ali njihov titar može s vremenom postati toliko nizak da se protutijela ne mogu otkriti u rutinskim testovima. Tek kada osoba dođe u ponovni dodir s antigenima na inkompatibilnim eritrocitima u tijeku ponovne trudnoće ili transfuzije, nastaje sekundarni imunološki odgovor u kojem nastaje brzi porast protutijela. U serumu imuniziranih osoba najčešće se otkrivaju anti – D aloantitijela, a zatim s opadajućom učestalošću anti – E, anti – c i anti – e. [2]

## **1.2. Dijagnostika**

Određivanje protutijela i njihov titar u majčinoj cirkulaciji prvi je korak u dijagnostičkoj obradi slučajeva Rh imunizacije. Koristi se indirektni Coombsov test. Izuzetno je značajno definiranje kritičnog titra, koji se definira kao vrijednost kod koje postoji značajan rizik razvoja fetalnog hidropsa uzrokovanog HBFN. Razina kritičnog titra još uvijek nije jasno definirana i kreće se između 1:16 i 1:32. U europskim zemljama te u Ujedinjenom Kraljevstvu kao mjera težine bolesti određuje se ukupna količina cirkulirajućih protutijela u odnosu na međunarodni standard što se izražava u međunarodnim jedinicama po mL (IU/mL). Ta se metoda pokazala boljom i preciznijom od određivanja samo titra no nažalost u nas još nije zaživjela u rutinskoj uporabi. Razina cirkulirajućih protutijela od 15 IU/mL se definira kao ona kod koje je potrebno učiniti invazivne dijagnostičke postupke. [1]

## **1.3. Liječenje**

U liječenju Rh imunizacije ranije primjenjivane metode konzervativnog liječenja poput plazmafereze i imunosupresivne terapije danas se više ne koriste; intrauterina transfuzija je osnovni oblik liječenja. Tu je metodu prvi primjenio Liley 1963. godine kao intraperitonealnu



transfuziju. Danas je takva intraperitonealna transfuzija gotovo u potpunosti zamijenjena direktnim pristupom odnosno intrauterinom intravaskularnom transfuzijom (IUIVT). [1] Time se nastoji spriječiti oštećenje djetetovih moždanih stanica. Prednosti direktnog pristupa su brojne i značajne, posebno kod težih oblika bolesti kompliciranih hidropsom gdje je intraperitonealni pristup daleko manje uspješan.

Sva djeca sa HBN-om ne trebaju liječenje. Ono je potrebno samo kada je anemija jako izražena i kada je veliki porast koncentracije bilirubina u krvi. U teškom HBN-u uzrokovanom visokim titrom protutijela porođaj se provocira prije vremena jer su u to vrijeme oštećenja jetre mnogo manja i započinje se liječenje anemije eksangvinotransfuzijama.

## **1.4. Prevencija**

Kada je trudnica Rh(D) negativna i nije imunizirana, tj. nema anti-D protutijela u krvi, tada se imunizacija može spriječiti pravodobnom primjenom anti - D imunoglobulina. U Rh(D) negativnih žena koje nisu do kraja trudnoće imunizirane može se spriječiti Rh(D) imunizacija koja nastaje u porođaju davanjem Rh(D) hiperimunog gamaglobulina unutar od 72 sata od porođaja. Anti-Rh(D) protutijela iz hiperimunog Rh(D) gamaglobulina vežu se za Rh(D) pozitivne fetalne eritrocite u majčinu krvotoku. Eritrociti obloženi protutijelima brzo se odstranjuju iz njezine krvi i ne nastaje imunizacija. Rh(D) hiperimuni gamaglobulin ne može spriječiti ni jednu drugu imunizaciju uzrokovanu antigenima drugih specifičnosti bilo da su to drugi antigeni Rh ili antigeni neke druge krvne grupe. Rh(D) hiperimunim gamaglobulinom ne liječi se već nastala imunizacija. Prevencija HBN-a uspješnija je kada se hiperimuni Rh(D) gamaglobulin primjeni u 28-29 i 32-34 tjednu trudnoće. [11]

Primjenom prije kraja trudnoće, anti-D protutijela iz hiperimunog gamaglobulina prolaze posteljicu, no neće naštetiti djetetu. [2] Organizirana imunoprofilaksa započeta je u Ujedinjenom Kraljevstvu 1969. godine te je postigla izuzetne rezultate: broj težkih oblika Rh imunizacije i HDFN smanjen je s 46/100 000 na svega 1.6/ 100000 poroda do 1990. godine.

Rh imunoglobulin (Rhogam) se daje i u drugim situacijama kada postoji sumnja da je ženina krv došla u dodir sa Rh pozitivnom krvlju. Zaštita se primjenjuje nakon pobačaja (spontanog ili namjernog abortusa), vanmaterične trudnoće, amniocenteze, većih krvarenja tijekom trudnoće, kao i prilikom transfuzije krvi ili većih povreda žene.

Preporuke imunoprofilakse u svrhu prevencije Rh imunizacije objavljene od strane Royal College of Obstetricians and Gynaecologist Ujedinjenog Kraljevstva te Council of the Society of Obstetricians and Gynaecologist of Canada su:

- Ukoliko RhD negativna majka rodi RhD pozitivno dijete, treba u roku od 72 sata dobiti 300 µg anti-D imunoglobulina. Veće su doze potrebne je u slučajevima opsežnijeg fetomaternalnog krvarenja.
- Ukoliko nije ordinirana adekvatna profilaksa a bila je indicirana, ima smisla dati istu dozu anti-D imunoglobulina i do 28 dana od potencijalno senzibilizirajućeg incidenta
- Ako je majka RhD negativna te nosi dokazano RhD pozitivno dijete ili je krvna grupa djeteta nepoznata, u cilju profilakse majci se u 28. tjednu trudnoće daje 300 µg anti-D imunoglobulina.
- Svim trudnicama (i RgD negativnim i RhD pozitivnim) potrebno je, prilikom prvog posjeta liječniku kao i u 28. tjednu trudnoće, učiniti probir za aloantitijela u vidu indirektnog antiglobulinskog testa
- U svim slučajevima kada je otac djeteta poznat, potrebno je ukoliko je majka djeteta RhD negativna, odrediti i Rh faktor oca, kako bi se izbjeglo nepotrebno davanje anti-D imunoglobulina tijekom trudnoće
- Trudnice s „slabim D“ - D<sup>u</sup> pozitivne ne trebaju dobivati anti-D imunoglobulin
- Nakon pobačaja prije 12. tjedna trudnoće potrebno je nesenzibiliziranim RhD negativnim ženama ordinirati anti-D imunoglobulin u minimalnoj dozi od 120 µg, a ukoliko je do pobačaja došlo nakon 12. tjedna trudnoće, dozu anti-D imunoglobulina valja povisiti na 300 µg
- U slučaju izvanmaterične trudnoće RhD negativne majke do 12. tjedna treba dati anti-D imunoglobulin u dozi od 120 µg, a ako je trajanje trudnoće duže od 12. tjedana, u dozi od 300 µg
- Anti-D imunoglobulin treba dati svakoj nesenzibiliziranoj RhD negativnoj ženi kod molarne trudnoće

- Kod invazivne dijagnostike (amniocenteza, kordocenteza i sl.), potrebno je svakoj nesenzibiliziranoj Rh-D negativnoj trudnici dati anti-D imunoglobulin u dozi od 300 µg. Kod biopsije korionskih resica prije 12. tjedna trudnoće daje se anti-D imunoglobulin u dozi od 120 µg, a ukoliko je zahvat izveden nakon 12. tjedna, dozu je potrebno povisiti na 300 µg
- Kod abrupcije, krvarenja zbog placente praevie ili traume trbuha, potrebno je kvantificirati fetu - maternalno krvarenja kako bi se eventualno korigirala doza anti-D imunoglobulina. Za svakih 0.5 mL fetalnih eritrocita potrebno je dati dodatnih 10 µg anti-D imunoglobulina [1]

## 1.5. Definicije

U nastavku donosim definicije koje su važne za ovu tematiku.

**KRVNE GRUPE** – nasljedne su karakteristike koje se nalaze na krvnim stanicama – eritrocitima, leukocitima, trombocitima i proteinima u plazmi. [2]

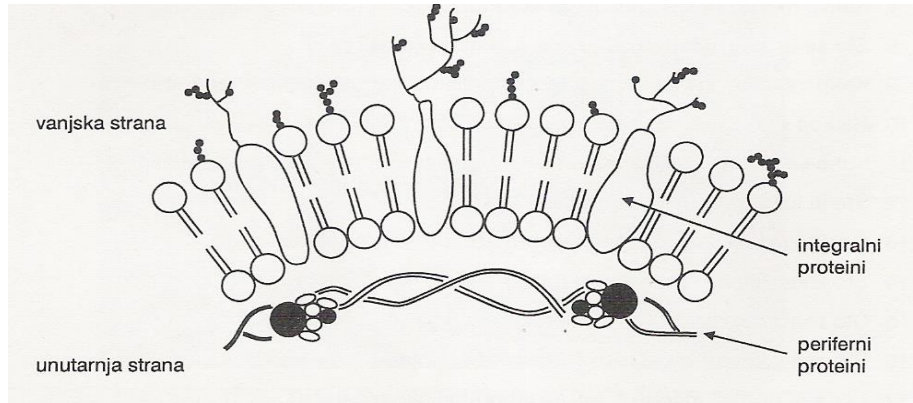
**ANTIGENI** - molekule koje potiču nastanak protutijela.

**PROTUTIJELA** (imunoglobulini) – stvaraju ih plazma - stanice u imunološkom sustavu na poticaj antigena. Sastoje se od Fc i Fab fragmenata.

**SUSTAV KRVNIH GRUPA** – obuhvaća više srodnih antigena i odgovarajućih protutijela s kojima oni reagiraju. Srodnost antigena očituje se u njihovoj biokemijskoj strukturi, smještaju na membrani, načinu nasljeđivanja i reakciji s protutijelima. Za transfuzijsku medicinu najznačajniji su eritrociti. [2]

**ERITROCITNI ANTIGENI** – sastavni dijelovi molekula eritrocitne membrane. Oni se mogu nalaziti na ili u membrani ili stršati ispod ili iznad nje. Eritrocitni su antigeni građeni od proteina, polisaharida, glikoproteina, glikolipida ili lipoproteina. Svaki antigen definiran je specifičnim protutijelom s kojim reagira. Eritrocitna protutijela reagiraju s antigenima koji se nalaze na površini eritrocitne membrane ili strše iznad nje. U posljednjih 90 godina otkriveno je oko 650 eritocitnih antigena. Prema kemijskoj građi,

biološkim značajkama i načinu nasljeđivanja oni su klasificirani u 23 sustava krvnih grupa. Eritrocitni antigeni označuju se ravnim slovima (A, B, Rh), a geni koji ih kodiraju kosim slovima (kurzivom) - *A, B, Rh*. [2]



Slika 2. Eritrocitna membrana[2]

AGLUTINACIJA – reverzibilna kemijska reakcija koja se odvija u dvije faze:

1. Senzibilizacija:
  - faza vezanja protutijela na membranu eritrocita
2. Aglutinacija:
  - faza povezivanja senzibiliziranih eritrocita u mrežu koja formira aglutinate [4]

AGLUTINAT – nakupina eritrocita povezanih antitijelima.

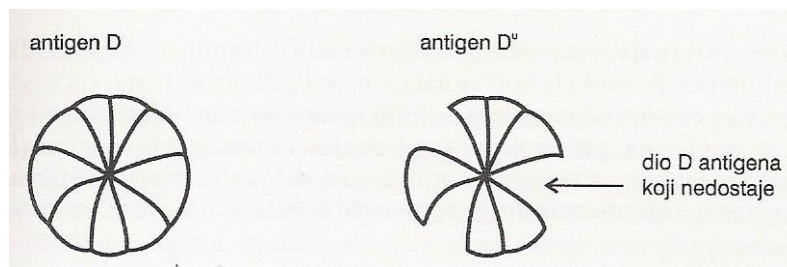
AGLUTININ – protutijela koja aglutiniraju eritrocite.

IMUNOGENOST – sposobnost nekog antigena da u osoba kojima taj antigen nedostaje potakne imunološki sustav na stvaranje protutijela. Antigeni koji imaju jaku imunogenost lagano će i brzo potaknuti stvaranje protutijela. Antigen D najjači je imunogen koji potiče stvaranje imunih protutijela. Prema jačini imunogenosti slijedi Kell antigen.

Rh SUSTAV KRVNIH GRUPA – jedan on najsloženijih sustava krvnih grupa. To je drugi po važnosti sustav krvnih grupa u kliničkoj medicini. Do danas je otkriven 51 antigen iz tog sustava, ali je za rutinski rad dovoljno poznavanje pet antigena tog sustava. To su antigeni C, c, D, E, e. [2]

ANTIGEN D – prisutnost ili odsutnost antigena D na eritrocitima određuje je li osoba Rh(D) pozitivna ili Rh(D) negativna. Oko 16% osoba je Rh negativno, a 84% je Rh pozitivno. Više od 80% D-negativnih osoba koje prime D-pozitivne transfuzije stvorit će anti-D protutijela. [2]

D<sup>u</sup> ili slabi D – nepotpuno izražen antigen D. D<sup>u</sup> nastaje kao posljedica manjeg broja antigena D na eritrocitima ili nedostatka dijela molekule antigena D. Osobe u kojih nedostaje dio molekule antigena D mogu stvoriti anti-D protutijela protiv dijela antigena D koji im nedostaje. [2]

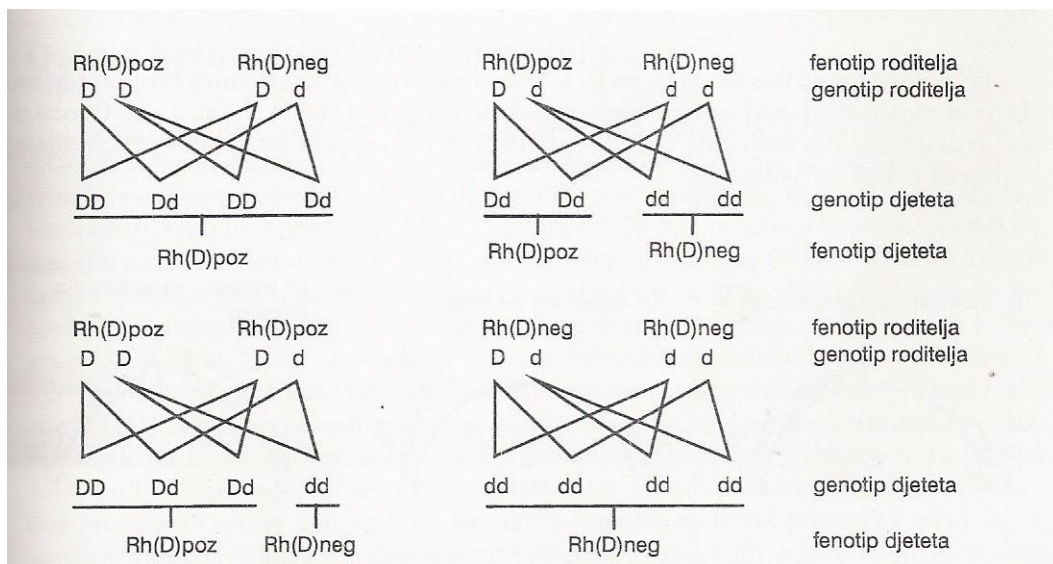


Slika 3. Shematski prikaz građe antigena D i D<sup>u</sup> [2]

HEMOLITIČNA BOLEST NOVOROĐENČETA – bolest koja se javlja kao posljedica nepodudarnosti krvi roditelja, odnosno nepodudarnosti krvnih elemenata trudnice i ploda. Hemolitična bolest novorođenčeta prvi put je opisana u medicinskoj literaturi 1609. godine kada je dijagnosticirana kod jedne francuske kućanice. Godine 1932. Diamond i suradnici su opisali međusobni odnos fetalnog hidropsa, žutice, anemije i eritroblastoze. Ta skupina simptoma kasnije je nazvana zajedničkim nazivom fetalna eritroblastoz. [6]

## 1.6. Nasljeđivanje krvnih grupa

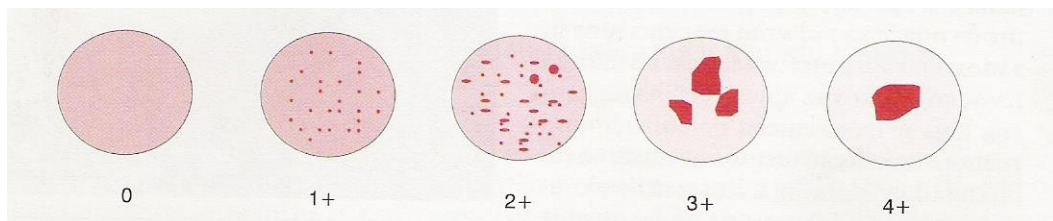
Rh antigeni produkti su gena s dva blisko smještena lokusa (D i CcEe). Na prvom lokusu se nalazi gen D. Na drugom lokusu nalazi se jedan od četiriju alela (ce, Ce, cE, CE). Rh geni nasljeđuju se kao kompleks dvaju haplotipova, jedan je od oca i jedan od majke. Rh geni su kodominantni. Na eritrocitima se uvijek nalaze antigeni C i/ili c, odnosno E i/ili e. D-antigen nema svojeg para. Rh(D) pozitivna osoba uvijek je od roditelja morala nasljediti jedan ili dva Rh(D) gena. Rh(D) negativna osoba nema ni jedan Rh(D) gen, ni Rh(D) antigene na eritrocitima. [2] Rh antigeni su po kemijskom sastavu proteini.



Slika 4. Nasljeđivanje Rh(D) [2]

## 1.7. Titar

Titar antitijela je semikvantitativna metoda, kojom se određuje količina antitijela u serumu i aviditet antitijela. Da je metoda semikvantitativna znači da se sa tom metodom procjenjuje sadržaj neke supstancije ili procjenjuje neka veličina uspoređivanjem na bazi iskustva. To je također mjerenje u kojem je jako izražena subjektivna procjena. Tako kod ocjene jačine aglutinacije 0 označava odsutnost aglutinacije, 1+ označava sitne aglutinate, 2+ označava nešto veće aglutinate sastavljene od više slijepljenih eritrocita, 3+ označava nekoliko krupnijih aglutinata a 4+ jedan veliki aglutinat. [2]



Slika 5. Ocjena jačine aglutinacije [2]

## 1.8. Antihumani gamaglobulin (AHG)

Razmak između protutijela IgG koja su vezana za eritrocite može se premostiti i dodatkom protutijela koja imaju specifičnost prema Fc dijelu protutijela IgG ili prema komplementu koji oblaže eritrocite. Dodatkom antihumanog globulina (AHG) protutijela koja su vezana za eritrocite povezuju se u mrežu i tako nastaje aglutinacija. To je princip antiglobulinskog testa (Coombsov test). Antiglobulinski test može biti:

- indirektni
- direktni

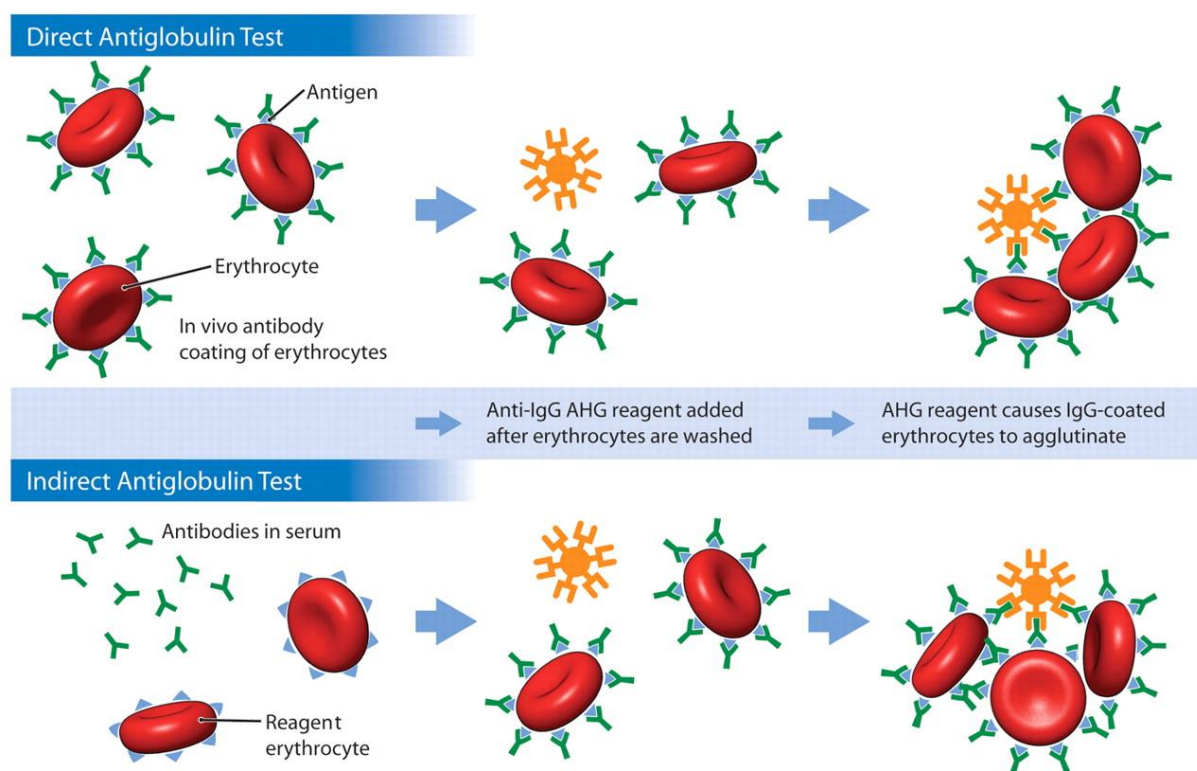
Oba testa otkrivaju protutijela ili komplement vezan za eritrocite.

### 1.8.1. Indirektni antiglobulinski test

Indirektni antiglobulinski test (IAT) otkriva *in vitro* senzibilizaciju eritrocita te otkriva prisutnost iregularnih protutijela u serumu ispitanika. Protutijela ili komplement jesu antigen za antihumani globulin.

### 1.8.2. Direktni antiglobulinski test

Za razliku od IAT-a, direktni antiglobulinski test (DAT) je pozitivan kada su eritrociti ispitanika senzibilizirani *in vivo*. DAT otkriva protutijela ili komplement koji su vezani za njegove eritrocite. U oba testa protutijela ili komplement su antigeni za AHG.



Slika 6. Coombsov test

Preuzeto: <http://www.cmaj.ca/content/174/3/305/F1.large.jpg>

(Pristupljeno: 29.06.2014.)



Logaritam laboratorijskog ispitivanja svake trudnice je izrada krvne grupe u 8-10. tjednu trudnoće. Ako je trudnica Rh negativna naručuje se u 28. tjednu te ponovno u 34. tjednu trudnoće. Ako je kod trudnice potrebna dodatna imunohematološka obrada zbog pozitivnog indirektnog antiglobulinskog testa prema kliničkoj značajnosti i titra, trudnica se naručuje svako 2-3 tjedna u svrhu potrebnog opstetrijskog liječenja.

## **1.9. Uzimanje uzorka krvi**

Prije izvođenja testa potrebno je pravilno uzeti uzorak krvi i postupiti s njim u skladu sa propisanim normama. Optimalan uzorak za rutinsko ispitivanje eritrocitnih krvnih grupa, ispitivanje prisutnosti iregularnih protutijela u serumu, određivanje specifičnosti protutijela i testova kompatibilnosti (križna proba) dobiva se uzimanjem 5-10 mL krvi u kemijski čistu epruvetu u kojoj se ne nalazi antikoagulantna otopina. Za laboratorijsko određivanje titra protutijela mogu se uporabiti plazma ili serum. Kad se test izvodi iz uzorka plazme, potrebno je krv izvaditi u epruvetu s EDTA. Citrat ili EDTA vežu kalcij i zbog toga ne nastaje aktivacija sustava komplementa. Stoga eritrociti neće *in vitro* biti obloženi komponentama komplementa. Također katkad se mogu pojaviti problemi u interpretaciji rezultata zbog malih fibrinskih ugrušaka koji vežu eritrocite i slične aglutinatima. Ako je uzorak serum, on mora biti bistar, ne smije biti zagađen i u njemu mora biti više od 60% aktivnosti komplementa. U tom slučaju krv uzorkujemo u biokemijsku epruvetu, odnosno epruvetu sa crvenim čepom. Tijekom čuvanja uzorka komplement postupno propada a on je od iznimne važnosti za otkrivanje nekih kliničkih značajnih protutijela.

Kako bi se pravilno rukovalo sa uzorkom od iznimne su važnosti podatci na naljepnici uzorka krvi koji moraju sadržavati sljedeće:

- datum uzimanja uzorka krvi
- ime ustanove, organizacijska jedinica, odjel

- bolesnikovo ime i prezime ili inicijali (npr. NN, XY, KT) za bolesnika nepoznata identiteta. Ako se istodobno primi više bolesnika nepoznata identiteta, bolesnike treba označiti različitim inicijalima sukladno dokumentiranom sustavu o označavanju kako dva ili više bolesnika ne bi bila jednako označena
- JMBG ili identifikacijski broj bolesnika, bolnički matični broj

Karakteristike ispravnog uzorka krvi:

- uzorak krvi mora biti u epruveti koju je propisala transfuzijska jedinica
- uzorak krvi mora biti uzet u dovoljnoj količini za izvođenje testova prema uputama laboratorija
- podatci na naljepnici uzorka moraju biti istovjetni podacima na tiskanici kojom se zahtijeva laboratorijsko ispitivanje
- uzorak krvi ne smije biti hemolitičan, osim u slučaju hemolize *in vivo*
- razmak između uzimanja uzorka krvi za križnu probu i transfuzije krvi ovisi o ranijim transfuzijama ili trudnoćama [2]

### **1.9.1. Pravilno čuvanje uzorka**

Uzorak krvi čuva se na +4 °C . Uzorak se mora čuvati začepljen i u uspravnom položaju. Za ponovno testiranje treba uzeti uvijek novi uzorak za imunoematološko ispitivanje. [2]

## **2. CILJ RADA**

Cilj ovog rada je pravilno opisati izvođenje titra protutijela imuniziranih trudnica, te ukazati na važnost istog kako bi se smanjila prevalencija hemolitičke bolesti novorođenčadi koja je usko povezana sa povišenim titrom protutijela kod trudnica, a smatra se da je razina kritičnog titra 1:16.

### **3. IZVORI PODATAKA I METODE**

#### **3.1. Određivanje AB0 i RhD krvnih grupa metodom u epruveti**

Za jednog ispitanika u stalak postavite 8 plastičnih epruveta:

- 3 za hemotest
- 3 za eritrotest
- 1 za RhD antigen
- 1 za Rh kontrolu

Epruvete obilježite rednim brojevima na sljedeći način i to počevši od prve do osme epruvete u nizu:

Prvi ispitanik: 11, 12, 13, 14, 15, 16, D, K

Drugi ispitanik: 21, 22, 23, 24, 25, 26, D, K

Treći ispitanik: 31, 32, 33, 34, 35, 36, D, K

#### **Tehnika rada**

- U prve tri epruvete ukapajte reagensije sljedećim redom: u prvu epruvetu 2 kapi anti-A, u drugu 2 kapi anti-B, u treću 2 kapi anti-A,B test reagensije.
- U četvrtu, petu i šestu epruvetu ukapajte po 1 kap 4% suspenzije testnih eritrocita sljedećim redom: u četvrtu epruvetu 1 kap suspenzije A<sub>1</sub>, u petu epruvetu kap suspenzije B, u šestu epruvetu 1 kap suspenzije O eritrocita.
- U sedmu epruvetu ukapajte 2 kapi anti-D test reagensije, u osmu epruvetu 2 kapi RhD negativne kontrole.
- Sedmu i osmu epruvetu označite rednim dnevnim brojem uzorka krvi iz kojeg određujete krvnu grupu.
- U epruvete 1-3 i 7-8 dodajte po jednu kap 4% suspenzije eritrocita ispitanika.
- U epruvete 4-6 dodajte po 2 kapi seruma (plazme) ispitanika.
- Epruvete dobro, ali ne grubo protresite i centrifugirajte 1 minutu na 1200 okretaja.
- Pregledom epruveta prema svjetlu ispitajte da li su eritrociti hemolizirali.

- Laganim protresanjem epruvete, resuspendirajte eritrocite i odredite prisutnost aglutinacije.

## **Interpretacija rezultata ABO i RhD krvne grupe**

### **ABO**

- Aglutinacija ispitivanih eritrocita s anti-A, anti-B ili anti-AB testnim reagensima je pozitivan rezultat.
- Aglutinacija A<sub>1</sub> i/ili B testnih eritrocita s ispitivanim serumom je pozitivan rezultat.

### **RhD**

- Aglutinacija s anti-D testnom reagensom i nedostatak aglutinacije s Rh negativnom kontrolom je pozitivan rezultat. Eritrociti su RhD pozitivni.
- Nedostatak aglutinacije s anti-D reagensom i Rh-D negativnom kontrolom je negativan rezultat. Eritrociti su RhD negativni.

### **Kontrole**

- Ispitivanje s 22% bovinim albuminom mora biti negativno (kontrola hemotesta).
- Ispitivanje s O suspenzijom eritrocita mora biti negativno (kontrola eritrotesta).
- Ispitivanje s RhD negativnom kontrolom mora biti negativno (kontrola anti-D reagensije).

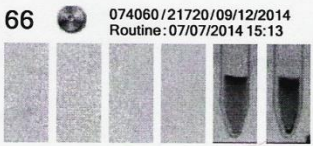
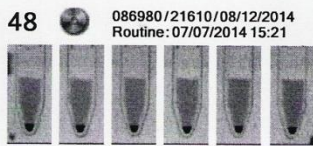
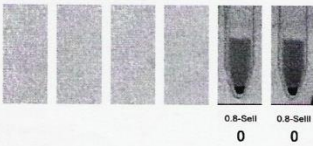
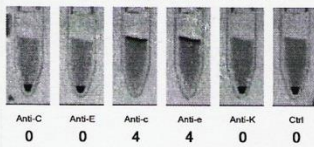
### **Upozorenje**

- ABO krvna grupa određena hemotestom i eritrotestom mora biti jednaka.
- Ukoliko je prisutna aglutinacija ispitivanih eritrocita s 22% bovinim albuminom i/ili aglutinacija O test eritrocita s ispitivanim serumom/plazmom rezultat ispitivanja ABO krvne grupe ne smije se interpretirati bez dodatnog ispitivanja.

- Ukoliko je prisutna aglutinacija ispitivanih eritrocita s RhD negativnom kontrolom rezultat ispitivanja RhD krvne grupe ne smije se interpretirati bez dodatnog ispitivanja.

### 3.2. Određivanje AB0 i RhD krvne grupe metodom u mikrokartici pomoću automatskog uređaja za imunoematološku dijagnostiku Auto/Vue

Version: 1.07 Page 1/1 07/07/2014 17:00

Laboratory KBC SPLIT -		Sample Report		Area: Sel. lines Sorting: None Filters: None	
[Redacted]					
Profile <b>ABODD+IAT</b>		O NEG ABScr NEG		Creation: 07/07/2014 15:11	
8ABO(FWD)/DD-48+RVS 2 0.8% Affirmagen 0199 22/07/2014 Automatic		<p>66  074060/21720/09/12/2014 Routine: 07/07/2014 15:13</p> <p>48  086980/21610/08/12/2014 Routine: 07/07/2014 15:21</p> <p>A1-Cells 3 B-Cells 3      Anti-A 0 Anti-B 0 Anti-A+B 0 Anti-D 0 Anti-D 0 Ctrl 0</p>		O NEG	
Comments		<p>22  138578/43810/25/11/2014 Routine: 07/07/2014 15:13</p> <p>0.8-Scell 0 0.8-Scell 0</p>		ABSscr NEG	
Comments					
Profile <b>RHKEL</b>		ccee Kell NEG		Creation: 07/07/2014 15:12	
Rh/K Automatic		<p>77  105808/37310/16/09/2014 Routine: 07/07/2014 15:25</p> <p>Anti-C 0 Anti-E 0 Anti-c 4 Anti-e 4 Anti-K 0 Ctrl 0</p>		ccee Kell NEG	
Comments					

Slika 7. Nalaz krvne grupe 0 neg određen automatski - Auto/Vue

Izvor: KBC Split, arhiv (Pristupljeno: 07.07.2014.)

### **3.3. Indirektni antiglobulinski test u mikrometodi: Ortho, Diamed, Pasteur**

#### **Definicija**

Indirektnim Coombsovim testom otkrivamo da li u ispitivanom serumu/plazmi ili eluatu postoje antitijela koja oblažu ili aglutiniraju screening eritrocite *in vitro*. Testom se otkrivaju antitijela koja su na 37 °C aktivna tj. sposobna vezati se na eritrocite i eventualno aktivirati komplement. U antiglobulinskom testu koriste se mikrostupci ispunjeni AHG reagensom (anti-IgG i anti-C3d).

U otkrivanju i određivanju specifičnosti antitijela koriste se eritrociti koji posjeduju većinu klinički značajnih antigena, a kod izvođenja testova podudarnosti koriste se eritrociti davatelja.

Indirektni antiglobulinski test je završna kontrola kompatibilnosti AB0 sustava krvnih grupa, a također se potvrđuje da na eritrocitima davaoca nema rijetkih antigena koji bi se vezali za antitijela iz seruma primaoca, a nisu otkrivena u skriningu.

#### **a. Pribor, materijali i opis aktivnosti indirektnog Coombsa u Ortho Biovue mikrometodi**

Metoda se temelji na filtraciji eritrocita, odnosno aglutinata eritrocita, prolaskom kroz sloj staklenih kuglica tijekom centrifugiranja. Ako eritrociti ne formiraju aglutinate prolaze kroz kuglice i sedimentiraju se na dno. Ako formiraju aglutinate zaustavljaju se na vrhu kuglica ili na različitim nivoima mikrokuglica.

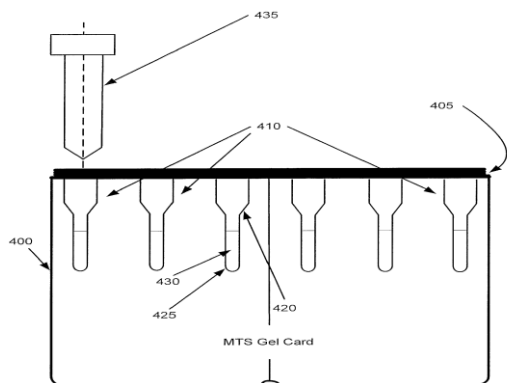


FIGURE 4

Slika 8. Izgled mikrokartice

Izvor: <http://www.google.com/patents/EP2574928A1?cl=en> (Pristupljeno: 07.07.2014.)

## Pribor i materijali

- Ortho Bio Vue polispecifične mikrokartice
- Otopina niske ionske jakosti BIOLISS
- 3 – 5 % suspenzija eritrocita (Selectogen I i II, Panel, Eritrociti doze krvi, Autokontrola)
- Mikropipeta od 10, 40 i 50  $\mu\text{L}$
- Termostat sa programiranom temp. na 37 °C (Ortho Bio Vue termostat)
- Ortho BioVue centrifuga
- Serum/plazma ispitanika ili eluat.

## Priprema za testiranje

Prije upotrebe, kartice se moraju makroskopski pogledati pri čemu se mora utvrditi:

- Da na kartici nema nikakvih mehaničkih oštećenja
- Da se u dijelu stupca iznad staklenih kuglica nalazi 1-3 mm reagensa
- Da u gornjem dijelu stupca, reaktivnoj komori i zračnoj zoni, nema mjehurića reagensa i krutih čestica

## Pipetiranje reagens/test stanica/seruma ili plazme u mikrostupac

U označene stupce, ovisno o testu koji se izvodi i vrsti BioVue kartice, pipetira se:



- 50  $\mu\text{L}$  LISS otopine
- 10  $\mu\text{L}$  suspenzije eritrocita
- 40  $\mu\text{L}$  ispitivanog seruma/plazme ili eluata.

Pipetiranje u mikrostupac izvodi se u položaju u kojem osovina pipete zatvara kut od 60 °C s osovinom mikrostupca. Prilikom pipetiranja nastavak automatske pipete ne smije doticati unutrašnju stijenku reaktivne komore i prethodno otpipetirani sadržaj.

Otpipetirani sadržaj ne smije propasti iz reaktivne komore u zračnu zonu mikrostupca.

Kod testova kod kojih se u mikrostupac pipetira nekoliko različitih reagenasa prvo se pipetira reagens najvećeg volumena koji u reaktivnoj komori mikrostupca zadržava reagense koji se pipetiraju u manjim volumenima.

Nakon pipetiranja, u mikrostupac kartica se lagano protrese povlačenjem prsta preko reaktivnih komora.

## **Inkubacija**

Ovisna je o testu koji se izvodi:

- Ako se IAT izvodi sa nisko ionskom otopinom – BIOLISS kartice se inkubiraju 20 (10-30) minuta na temperaturi od 37 °C u BioVue termostatu.
- Ako se IAT izvodi bez dodatka nisko ionske otopine kartice se inkubiraju 60 minuta na temperaturi od 37 °C u BioVue termostatu.

## **Centrifugiranje**

Nakon inkubacije kartice se centrifugiraju u Ortho BioVue centrifugi 5 min.

Centrifugiranje se odvija u dvije faze:

1. Faza centrifugiranja na 800 okr/min 2 min. U ovoj fazi dolazi do spajanja eritrocita sa reagensom u stupcu.
2. Faza centrifugiranja na 1500 okr/min 3 min. U ovoj fazi dolazi do filtracije slobodnih eritrocita, odnosno do zaustavljanja aglutinata na ili u sloju staklenih kuglica.

Kartice se moraju centrifugirati 30 min od ukapavanja.

## **b. Pribor, materijali i opis aktivnosti indirektnog Coombsa u Diamed LISS/Coombs mikrometodi**

Princip metode:

Metoda se temelji na filtraciji eritrocita, odnosno aglutinata eritrocita, prolaskom kroz stupac dekstran akril amid gela tijekom centrifugiranja. Gel sadrži kalijev azid kao konzervativ, sedimentirajući faktor i reagens. Ako eritrociti ne formiraju aglutinate prolaze kroz dio stupca s gelom i sedimentiraju se na dno. Ako eritrociti formiraju aglutinate, ovisno o njihovoj veličini, zaustavljaju se na gelu.

### **Pribor i materijali**

- Mikrokartice DiaMed-ID LISS/Coombs
- Epruvete
- ID-Diluent2
- Mikropipete 25  $\mu\text{L}$  i 50  $\mu\text{L}$
- 0,8 % suspenzija eritrocita. 0,8 % suspenzija eritrocita se pripravlja iz:
  - o 3-5% suspenzije eritrocita tako da se u epruvetu ukapaju 2 kapi (100  $\mu\text{L}$ ) 3-5% suspenzije eritrocita, centrifugira se na 2500 okr/min 3 min, dekantira se i doda 500  $\mu\text{L}$  ID-Diluenta 2. Ovako pripremljena suspenzija može se koristiti 24 h.
  - o 0,8% suspenzija eritrocita iz pune krvi pripravlja se tako da u 1 mL ID-Diluenta2 doda 10  $\mu\text{L}$  koncentriranih eritrocita.
  - o Serum/plazma ispitanika ili eritrocitni eluat

### **Priprema za pipetiranje**

Prije upotrebe kartice se moraju makroskopski pregledati pri čemu se mora utvrditi:

- Da na kartici nema nikakvih mehaničkih oštećenja
- Da je u stupcu jasno vidljiva granica između gela i reagensa
- Da u gornjem dijelu stupca, reaktivnoj komori i zračnoj zoni, nema mjehurića reagensa i čestica gela.

Nakon pregleda, stupci se označe identifikacijom ispitanika i test eritrocita. Ako se u istoj vrsti kartica rade različiti testovi označi se i vrsta testa. Označena kartica se postavi u stalak za kartice. S kartice se skine zaštitna folija samo s onih stupaca koji će biti korišteni za aktualno testiranje.

### **Pipetiranje reagensa/test stanica/seruma ili plazme u mikrostupac**

U označene stupce, ovisno o testu koji se izvodi i vrsti DiaMed ID kartice, pipetira se:

- 50 µL pripremljene 0,8% suspenzije eritrocita u odgovarajuću komoricu.
- 25 µL seruma ili plazme ili eluata.

Prilikom pipetiranja nastavak automatske pipete ne smije doticati unutrašnju stijenku reaktivne komore i prethodno otpipetirani sadržaj. Otpipetirani sadržaj ne smije propasti iz reaktivne komore u zračnu zonu mikrostupca. Kod testova kod kojih se u mikrostupac pipetira nekoliko različitih reagensa prvo se pipetira reagens najvećeg volumena koji u reaktivnoj komori mikrostupca zadržava reagense koji se pipetiraju u manjim volumenima.

### **Inkubacija**

Nakon pipetiranja u mikrostupac kartica se lagano protrese povlačenjem prsta preko reaktivnih komora. Kartice se inkubiraju 15 minuta na temperaturi od 37 °C u DiaMed ID termostatu.

### **Centrifugiranje**

Nakon inkubacije kartice se centrifugiraju u DiaMed ID centrifugi. DiaMed ID kartice centrifugiraju se na 810 okr/ min 10 min.

### **c. Pribor, materijali i opis aktivnosti indirektnog Coombsa u Pasteur Scangel mikrometodi**

Princip metode:

Metoda se temelji na filtraciji eritrocita, odnosno aglutinata eritrocita, prolaskom kroz stupac dekstran akrilamid gela tijekom centrifugiranja. Gel je impregniran polispecifičnim

antihumanim globulinom i sadrži kalijev azid kao konzervativ. Ako eritrociti ne formiraju aglutinate, prolaze kroz dio stupca s gelom i sedimentiraju se na dnu. Ako eritrociti formiraju aglutinate, ovisno o njihovoj veličini, zaustavljaju se na gelu.

## **Pribor i materijali**

- Mikrokartice Bio-Rad Scangel AHG
- Epruvete
- Mikropipete od 50 i 25  $\mu\text{L}$
- ScanLiss
- 0,8 % suspenzija eritrocita. 0,8 % suspenzija eritrocita se priprema iz:
  - o 3-5% suspenzije eritrocita tako da se u epruvetu ukapaju 2 kapi (100  $\mu\text{L}$ ) 3-5% suspenzije eritrocita, centrifugira se na 2500 okr/min 3 min, dekantira se i doda 500  $\mu\text{L}$  ScanLiss. Ovako pripremljena suspenzija može se koristiti 24 h.
  - o 0,8% suspenzija eritrocita iz pune krvi priprema se tako da u 1 ml ScanLiss doda 10  $\mu\text{L}$  koncentriranih eritrocita.
- Termostat
- Centrifuga Pasteur
- Serum/plazma ili eluat ispitanika.

## **Opis aktivnosti**

- BioRad Scangel mikrokarticu pregledati prije upotrebe, da nema oštećenja, mjehurića i smanjenja nivoa tekućeg dijela.
- Označiti odgovarajuće mjesto na mikrokartici identifikacijom ispitanika i test eritrocita.
- Pipetirati 50  $\mu\text{L}$  pripremljene suspenzije eritrocita u odgovarajuću komoricu.
- Pipetirati 25  $\mu\text{L}$  seruma ili plazme.
- Inkubirati 15 min na 37 °C (ID-termostat)
- Centrifugirati 10 min u Pasteur centrifugi.

## Tumačenje rezultata

Stupanj aglutinacije	Opis
4+	Aglutinirani eritrociti čine uniformirani sloj na vrhu mikrostupca
3+	Većina aglutiniranih eritrocita nalazi se u gornjoj polovici mikrostupca, bez eritrocita na samom dnu mikrostupca
2+	Aglutinirani eritrociti se vide uzduž cijelog mikrostupca, uz malo eritrocita na samom dnu mikrostupca
1+	Većina aglutiniranih eritrocita se nalazi na donjoj polovici mikrostupca, uz eritrocite na dnu mikrostupca
w	Mali broj aglutiniranih eritrocita vidljiv iznad sloja eritrocita na dnu mikrostupca, koji nema ravnu i glatku gornju površinu
mf	Aglutinirani eritrociti se vide u gornjem dijelu mikrostupca, uz eritrocite na samom dnu mikrostupca
0	Svi eritrociti nalaze se na dnu mikrostupca, s glatkom i ravnom gornjom površinom

Tablica 1. Opis pojedinih stupnjeva aglutinacije u mikrokartici

## Zapisi

U imunohepatološkom laboratoriju rezultati testa upisuju se na:

- Zahtjevnici za izvođenje indirektnog Coombsa
- Dnevnim radnim listama
- Validacijskim listama
- Podatci se pohranjuju u računalu i na disketi.

Na dežurnom mjestu rezultati testa se upisuju:

- Na zahtjevnici za izvođenje testa
- Protokolu na dežurnom mjestu

### **3.4. DAT u mikrometodi sa polispecifičnim antihumanim globulinom**

#### **Definicije**

Direktnim Coombsovim testom otkrivamo da li su eritrociti *in vivo* obloženi antitijelima ili komplementom. Antitijela IgG klase otkrivamo preko anti – IgG i anti C3d, a IgM antitijela preko anti-C3d. Polispecifične mikrokartice ne otkrivaju IgA klasu antitijela, a ona izuzetno rijetko dolaze sama.

#### **a. Pribor, materijali i opis aktivnosti direktnog Coombsa u Ortho BioVue mikrometodi**

##### **Pribor i materijali**

- Ortho BioVue polispecifične mikrokartice
- Epruveta
- Fiziološka otopina
- Mikropipeta od 10 i 240  $\mu\text{L}$
- Ortho BioVue centrifuga
- Uzorak ispitivane krvi uzet u epruvetu s antikoagulansom EDTA

##### **Opis aktivnosti**

- Pripremiti 3-5% suspenziju eritrocita u fiziološkoj otopini (u 240  $\mu\text{L}$  fiziološke dodati 10  $\mu\text{L}$  gustih eritrocita)
- Eritrocite pupkovine potrebno je prije izvođenja direktnog Coombsa oprati
- Ortho polispecifičnu mikrokarticu pregledati prije uporabe, da li se tekući dio – AHG nalazi iznad nivoa staklenih kuglica, te da nema oštećenja, mjehurića
- Označiti odgovarajuće mjesto na mikrokartici
- Dodati 10  $\mu\text{L}$  suspenzije eritrocita
- Centrifugirati 5 min u Ortho BioVue centrifugi

## **b. Pribor, materijali i opis aktivnosti direktnog Coombsa u DiaMed LISS/Coombs mikrometodi**

### **Pribor i materijali**

- Mikrokartice DiaMed-ID LISS/Coombs
- Epruvete
- ID-Diluent 2
- Mikropipete
- Fiziološka otopina
- Centrifuga DiaMed-ID
- Uzorak krvi uzet u epruvetu sa antikoagulansom EDTA ili CPD-a

### **Opis aktivnosti**

- Pripremiti 0,8% suspenziju eritrocita (u 1 mL ID-Diluent 2 dodati 10  $\mu$ L gustih eritrocita)
- Eritrocite pupkovine potrebno je prije izvođenja testa oprati u fiziološkoj otopini
- DiaMed-ID LISS Coombs mikrokarticu pregledati prije upotrebe, da nema oštećenja, mjehurića i smanjenja nivoa tekućeg dijela
- Označiti odgovarajuće mjesto na mikrokartici
- Pipetirati 50  $\mu$ L svježe pripremljene suspenzije eritrocita
- Centrifugirati 10 minuta u ID-Centrifugi

## **c. Pribor, materijali i opis aktivnosti direktnog Coombsa u Pasteur Scangel mikrometodi**

### **Pribor i materijali**

- Mikrokartice Bio-Rad Scangel AHG
- Epruvete
- Mikropipete
- ScanLiss

- Fiziološka otopina
- Centrifuga Pasteur
- Uzorak krvi s antikoagulansom EDTA ili CPD, starosti do 24 h

## **Opis aktivnosti**

- Pripremiti 0,8% suspenziju eritrocita (u 1 mL ScanLiss dodati 10  $\mu$ L gustih eritrocita)
- Eritrocite pupkovine potrebno je prije izvođenja testa oprati u fiziološkoj otopini
- Scangel mikrokarticu pregledati prije upotrebe, da nema oštećenja, mjehurića i smanjenja nivoa tekućeg dijela
- Označiti odgovarajuće mjesto na mikrokartici
- Pipetirati 50  $\mu$ L svježe pripremljene suspenzije eritrocita
- Centrifugirati 10 minuta u Pasteur centrifugi

## **Tumačenje rezultata**

Rezultat je negativan ako su svi eritrociti na dnu stupca i čine ravan rub prema gelu ili mikrokuglicama. Rezultat je pozitivan ako eritrociti nisu na dnu stupca.

Označavamo ga sa:

+ 4 – aglutinirani eritrociti se kao ravna crta nalaze na vrhu stupca

+ 3 – aglutinirani eritrociti su zadržani u gornjoj polovici stupca

+2 – aglutinirani eritrociti su vidljivi duž cijelog stupca, a manji broj može biti vidljiv i na dnu.

+1 – većina aglutiniranih eritrocita se nalazi u donjoj polovici stupca

+/- ili slabo pozitivan – većina eritrocita je na dnu stupca, ali ne formiraju ravan rub

m.f. (mješana aglutinacija) – jedan dio eritrocita je na dnu stupca, a dio se zadržava na vrhu kuglica ili gela.

## **Zapisi**

U imunohematološkom laboratoriju rezultati testa upisuju se na:



- Zahtjevnici za izvođenje direktnog Coombsa
- Dnevnim radnim listama, validacijskim listama
- Indeksu bolničkih i ambulantnih pacijenata sa pozitivnim direktnim Coombsom, koji se nalazi na dežurnom mjestu

### **3.5. Titar toplih antitijela u serumu**

Test se primjenjuje:

- U aloimuniziranih trudnica sa ciljem:
  - određivanja količine antitijela koja može dovesti do HBN
  - praćenje promjene u količini antitijela uspoređujući sa prethodnim nalazom
- U rješavanju autoimunih hemolitičkih anemija
- U pacijenata sa pozitivnim IAT-om

Test se izvodi ako je IAT u epruveti pozitivan.

### **Pribor i materijali**

Uzorak krvi

- serum ispitanika, ako se vrši kontrola titra potreban je i serum od prethodnog mjerenja (zamrznuti serum)

Reagensi

- 3-5% suspenzija eritrocita odgovarajućeg fenotipa  
Fenotip eritrocita treba biti heterozigotan za antigen za kojeg je specifično antitijelo. Ako je antitijelo iz Rh sustava specifičnosti anti-D, koriste se eritrociti fenotipa R2R2. Ako istovremeno postoji više antitijela potrebno je svako antitijelo titrirati posebno, odgovarajućim fenotipom
- Antihumani globulin
- Fiziološka otopina

## Oprema

- Mikropipeta od 100  $\mu\text{L}$
- Termostat umjeren na 37°C
- Centrifuga za epruvete
- Hladnjak sa temperaturom od -20°C i niže

## Pribor:

- Stalci
- Staklene epruvete
- Pipete

## Opis aktivnosti

Potrebno je:

- Uzeti čiste staklene epruvete. Potreban broj epruveta procijeniti na osnovu pozitiviteta u IAT-u ili na osnovu predhodnog nalaza. Epruvete obilježiti brojem 1, 2, 3, 4,...a zadnju epruvetu označiti zvjezdicom. Na prvu epruvetu napisati prezime ispitanika.
- Ako se radi kontrola titra označiti na isti način drugi niz epruveta (može drugom bojom flomastera)
- U 1. i 2. epruvetu ukapati 100  $\mu\text{L}$  seruma. U 2. i slijedeće epruvete ukapati po 100  $\mu\text{L}$  fiziološke otopine
- Sadržaj druge epruvete promiješati mikropipetom i prebaciti 100  $\mu\text{L}$  u slijedeću epruvetu. Ponavljati postupak do kraja, tj. do epruvete označene zvjezdicom u kojoj ćemo ostaviti 100  $\mu\text{L}$  diluirane suspenzije (za slučaj nepredviđeno većeg titra)

Titrirani serum izgleda ovako:

1	2	3	4	5	6	7	8
1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128

- U svaku epruvetu ukapati po 1 kap (50  $\mu\text{L}$ ) 3-5% suspenzije eritrocita
- Ostaviti na sobnoj temperaturi 5 minuta i prve dvije epruvete centrifugirati na 1000 okr./min 1 minutu

- Ostaviti u termostatu 1,5 h
- Centrifugirati prve dvije epruvete na 1000 okr/min 1 min i očitati prisustvo aglutinacije i zabilježiti
- Oprati eritrocite u fiziološkoj otopini 3-4 puta. Nakon zadnjeg pranja dekantirati supernatant maksimalno i osušiti vrh epruveta na papirnatom ručniku
- Dodati po dvije kapi polispecifičnog AHG-a (prethodno ugrijanog na sobnoj temperaturi)
- Centrifugirati na 1000 okr/min 1 min
- Rezultat odmah očitati i zabilježiti
- U negativne epruvete dodati 1 kap Coombs kontrole i ponoviti centrifugiranje i očitavanje.

## **Tumačenje rezultata**

- Rezultat se gleda makroskopski i aglutinoskopom. Određuje se pozitivitet i score i bilježi se za svaku epruvetu posebno.
- Kod kontrole titra prvo gledati zamrznuti uzorak.
- Zbog „prozon efekta“ moguća je pogrešna interpretacija rezultata, te je preporučljivo gledati prvo epruvete koje imaju više diluiran serum, prema koncentriranjem.
- Pozitivnost se označava od 1+ do 4+, na slijedeći način:
  - +4 eritrociti aglutinirani u jedan aglutinat
  - +3 aglutinirani eritrociti formiraju 2-3 veća aglutinata
  - +2 aglutinirani eritrociti formiraju više manjih aglutinata uz po koji veći aglutinat
  - +1 aglutinirani eritrociti formiraju više nježnijih aglutinata bez slobodnih eritrocita
 +/- ili w uz nježne aglutinate vidljivi i slobodni eritrociti
- Najveća dilucija koja daje makroskopski vidljivu aglutinaciju od +1, označava se kao krajnja točka titra
- Score označava aviditet antitijela. Skorira se od 1-12, a ukupan rezultat se na kraju zbraja. Aglutinacija slabija od +1 se računa u skor, a ne računa se u titar.

Pozitivitet:	4+	3+	2+	1+							
Score:	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2

U aloimuniziranih trudnica titar >16 se smatra značajnim zbog moguće HBN. Titar <16 može biti značajan uz antitijela određene specifičnosti (anti-Kell). Titar je semikvantitativna metoda gdje zbog varijacije u tehnici rada, dužini inkubacije, fenotipu eritrocita, suspenziji ovisi i dobivena vrijednost. Stoga u praćenju titra treba paralelno raditi sadašnji i zamrznuti uzorak.

Promjena titra u dvije dilucije smatra se značajnom, a promjena skora za 10 i više također se smatra značajnom.

U autoimunim hemolitičkim anemijama serum se diluira do titra 1:4 ili 1:8 da bi se vidjela moguća specifičnost autoantitijela i otkrila moguća aloantitijela.

Antitijela koja se ponašaju kao HTLA (high – titar low – avidity), a koja nisu klinički značajna imaju visok titar, a mali skor. Npr. titar 1:32, score 38.

## Zapisi

U imunohematološkom laboratoriju rezultate testa aloimuniziranih trudnica upisuje odgovorni liječnik. Rezultati se upisuju na:

- Listu praćenja titra antitijela
- Zahtjevnici za imunohematološko testiranje (za bolničke trudnice – roditelje)
- Original nalazu krvne grupe, vezanom uz trudničku knjižicu, ako trudnica dolazi ambulantno
- Dnevnim radnim listama ili validacijskim listama
- Kartonu ispitivanja senzibilizacije u trudnoći
- Kopija nalaza, sa listom praćenja titra se arhivira u fascikle imunizacije



Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. a Johnson & Johnson company  
 PATIENT NAME: [REDACTED] PATIENT ID: 14 03 06566  
 DATE: 03.12.2009. TECH: [REDACTED] CONCLUSION: ANTI-Rh D PROTUTIJELA, 1  
 Panel A Reagent Red Blood Cells 0.8% Resolve® Panel A Antigram® Antigen Profile  
 Exp. Date: 26/09/12/08

Cell	Rh-ir	Donor Number	D	C	E	c	e	f	C'	V	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>x</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	S	s	M	N	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Special Antigen Typing	Test Results			
1	R1R1	11501	+	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	1	2-3+
2	R1R1	110358	+	+	0	0	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2-3+
3	R2R2	304845	+	+	0	0	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2-3+
4	Rrr	305197	+	+	0	0	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2-3+
5	Rr	303380	0	+	0	0	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
6	rY	306317	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	6	0
7	R	83049	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	7	0
8	R	305578	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	8	0
9	R	308209	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	9	0
10	R	304782	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	10	0
11	R1R1	118537	+	+	0	0	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	11	2-3+
Patient Cells																											Autokontrola DAT							
Mode of Reactivity			37°C/Antiglobulin												Antiglobulin						Variable		Cold		Var.									

\* If antigen status may have been determined presumptively based on Rh-ir phenotype. Shaded columns indicate those antigens which are destroyed or depressed by enzyme treatment.  
 † Indicates those antigens whose presence or absence may have been determined using a single example of a specific antibody.

Slika 11. Panel za identifikaciju protutijela 03.12.2009.

Izvor: KBC Split, arhiv

KB SPLIT, Odjel za transfuziju krvi  
 Odsjek za imunohematologiju-Križine  
 Split, Soltanska 1

Split, 20.01.2010

## N A L A Z

Broj nalaza: 41000399

Datum rođenja: 05.03.1976  
 Bar code : 41000399

Nalaz potražuje:

NAZIV PRETRAGE	REZULTAT
Indirektni antiglobulinski t.	poz.
Direktni antiglobulinski test	neg.
Antitijela	anti-D
NAPOMENA:	
15 tjedana trudnoće.	
U serumu se i dalje otkrivaju samo anti-D protutijela.	
Titar anti-D;kompletna (IgM) neg.	
inkompletna (IgG) 1:1 score 8	
Kontrola testova imunizacije i titra protutijela za 1 mjesec!	

Pretrage napravile:  
 KERTOVIĆ ANICA  
 ANA KOŠOR

Odgovorni specijalist  
 Miroslav ERCEG-MAGLIĆ, dr.med.  
 specijalist transfuzijske medicine  
 051955

Slika 12. Nalaz 20.01.2010. Izvor: KBC Split, arhiv

## N A L A Z

Broj nalaza: 41001001

Datum rođenja: 05.03.1976

Bar code : 41001001

Nalaz potražuje:

NAZIV PRETRAGE	REZULTAT
Indirektni antiglobulinski t.	poz.
Direktni antiglobulinski test	neg.
Antitijela	anti-D

NAPOMENA:  
Kontrola u 20. tjednu trudnoće:  
U serumu su prisutna anti-D protutijela.  
Titar anti-D: - kompletna neg.  
- inkompletna 1:1 score 8  
Kontrola testova imunizacije i titra protutijela za 3-4 tjedna.

Pretrage napravile:  
ANA KOSOR  
ANICA KURTOVIĆ

Odgovorni specijalist:

*(Signature)*

Slika 13. Nalaz 22.02.2010.

Izvor: KBC Split, arhiv

## N A L A Z

Broj nalaza: 41002199

Datum rođenja: 05.03.1976

Bar code : 41002199

Nalaz potražuje:

NAZIV PRETRAGE	REZULTAT
Indirektni antiglobulinski t.	poz.
Direktni antiglobulinski test	neg.
Antitijela	anti-D

NAPOMENA:  
Kontrola u 27. tjednu trudnoće:  
U serumu su prisutna anti-D protutijela.  
Titar anti-D: - kompletna neg.  
- inkompletna 1:16 score 34  
Kontrola testova imunizacije i titra protutijela za 2 tjedna  
zbog porasta titra protutijela preporuča se intenzivan nadzor  
ginekologa.

Pretrage napravile:  
VULIĆ MAGDALENA  
ANČIĆ MIRELA

Odgovorni specijalist:

*(Signature)*

*(Signature)*

Slika 14. Nalaz 15.04.2010.

Izvor: KBC Split, arhiv

## N A L A Z

Broj nalaza: 4100

Datum rođenja: 05.03.1976

Bar code : 41002462

Nalaz potražuje:

NAZIV PRETRAGE	REZULTAT
Indirektni antiglobulinski t.	poz.
Direktni antiglobulinski test	neg.
NAPOMENA:	
Kontrola u 29. tjednu trudnoće. U serumu su prisutna anti-D protutijela. Titar anti-D: - kompletna neg. - inkompletna 1:32 score 5 $\frac{1}{2}$	
Kontrola testova imunizacije i titra protutijela za 2 tjedna.	

Pretrage napravile:  
ANA KOSOR  
ANICA KURTOVIĆ

Odgovorni specijalist:



Slika 15. Nalaz 28.04.2010.

Izvor: KBC Split, arhiv

## N A L A Z

Broj nalaza: 4100271

Datum rođenja: 05.03.1976

Bar code : 41002717

Nalaz potražuje:

NAZIV PRETRAGE	REZULTAT
Indirektni antiglobulinski t.	poz.
Direktni antiglobulinski test	neg.
Antitijela	anti-D
NAPOMENA:	
Kontrola u 32. tjednu trudnoće. U serumu su prisutna anti-D protutijela. Titar anti-D: - kompletna neg. - inkompletna 1:32 score 53	
Kontrola testova imunizacije i titra protutijela za 2 tjedna.	

Pretrage napravile:  
ANA KOSOR  
JAGODA ČATTOVIĆ

Odgovorni specijalist:



Slika 16. Nalaz 12.05.2010.

Izvor: KBC Split, arhiv



KB SPLIT, Odjel za transfuziju krvi  
Odsjek za imunohematologiju-Križine  
Split, Šoltanska 1

Split, 27.05.2010.

## N A L A Z

Broj nalaza: 4100305

Datum rođenja: 05.03.1976

Nalaz potražuje:

Bar code : 41003055

NAZIV PRETRAGE	REZULTAT
Indirektni antiglobulinski t.	poz.
Direktni antiglobulinski test	neg.
Antitijela	anti-D
NAPOMENA:	
Kontrola u 34. tjednu trudnoće. U serumu su prisutna anti-D protutijela. Titar anti-D: -kompletan neg. -inkompletan 1:64 score 60 Javiti se ginekologu!	

Pretrage napravila: Miranda Gizdić

Odgovorni specijalist: *[Signature]*

Slika 17. Nalaz 27.05.2010.

Izvor: KBC Split, arhiv

KB SPLIT, Odjel za transfuziju krvi  
Odsjek za imunohematologiju-Križine  
Split, Šoltanska 1

Split,

## N A L A Z

Broj nalaza: 41003330

Datum rođenja: 05.03.1976

Nalaz potražuje:

Bar code : 41003330

NAZIV PRETRAGE	REZULTAT
Indirektni antiglobulinski t.	poz.
Direktni antiglobulinski test	neg.
Antitijela	anti-D
NAPOMENA:	
Kontrola u 36. tjednu trudnoće. U serumu su prisutna anti-D protutijela. Titar anti-D: -kompletan neg. -inkompletan 1:64 score 61 Kontrola titra po preporuci ginekologa!	

Pretrage napravila: Miranda Gizdić

Odgovorni specijalist: *[Signature]*

Dok. PERA ERCEGOVIĆ, specijalist transfuzije

Slika 18. Nalaz, 10.06.2010.

Izvor: KBC Split, arhiv

**KLINIČKA BOLNICA -SPLIT**  
Odjel za transfuziju krvi

Barkod uzorka <b>T40906860</b>	Prezime i ime [REDACTED]	Dg: Th: Porod: Abortus: Transfuzija:	Razlog iH ispitivanja: <b>POZ / AT</b>
Datum: <b>04.12.2009</b>	Ustanova: <b>KBC Split, Odjel za transfuziju</b>	Datum zadnje transfuzije: Ostalo:	
Bolesnički broj	JMBG/datum rođenja <b>05.03.1976</b>	Matični broj	

Specifičnost protutijela: **ANTI-D**

TC	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Titar	Score
I.S.	0	0	0	0	0	0							
37°C	0	0	0	0	0	0							
AHG	+5	(+)	0	0	0	0						1:1	8
I.S.	0	0	0	0	0	0							
37°C	0	0	0	0	0	0							
AHG	+3	(+)	0	0	0	0							
Testove izveo: [Signature]													
Testove provjerio: [Signature]													

Slika 19. A) Praćenje titra protutijela tijekom trudnoće

TC	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Titar	Score
1.5	0	0											
23.02.10	37°C	0	0										
23.02.10	AHG	+3	(+)									1:1	8
1.5	0	0											
37°C	0	0											
AHG	+4	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1:64	1:64
I.S.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:16	5
37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
AHG	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	1:32	51
I.S.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:32	53
AHG												1:32	53
I.S.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
AHG	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	1:64	score 60
I.S.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
AHG	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	#10	1:64	score 60

Slika 19. B) Praćenje titra protutijela tijekom trudnoće

Izvor: KBC Split, arhiv

Preglednim imunohematološkim testom za otkrivanje iregularnih antieritrocitnih protutijela u serumu trudnice otkrivena je prisutnost iregularnih antieritrocitnih protutijela.

Daljnjom imunohematološkom obradom potvrđena su iregularna antieritrocitna protutijela iz Rh sustava krvnih grupa specifičnosti anti – D koja mogu uzrokovati poslijetransfuzijsku hemolitičku reakciju i hemolitičku bolest novorođenčeta.

U slučaju potrebe za transfuzijskim liječenjem dati koncentrate eritrocita koji su antigen D negativni, sa smanjenim brojem leukocita (filtrirani), fenotipa trudnice, Kell antigen negativni uz negativnu križnu reakciju (probu).

Potrebno je odrediti titar anti – D protutijela u serumu trudnice i pratiti njegov eventualni porast svaka 3 tjedna do 28. tjedna trudnoće, a potom svaka 2 tjedna. Značajan titar anti – D je 1:32 (a ako je žena došla u trudnoću s titrom 1:16, i to se tretira kao značajno).

Značajan porast titra (za > od 2 epruvete ili score > 10) govori u prilog tome da je dijete Rh pozitivno. Nužan je i intenzivan ginekološki nadzor koji nam uz porast titra ukazuje na mogući razvoj fetalne anemije i potrebe za intrauterinim transfuzijama.

Potrebno je odrediti i RhD antigen te fenotip oca djeteta da bi vidjeli kolika je vjerojatnost da dijete nosi RhD antigen (ako je otac negativan ne postoji mogućnost da dijete ima antigen budući da ga nema majka, ali svejedno pratiti u slučaju da otac zapravo nije otac tog djeteta).

Koncentrat eritrocita koji se koristi prilikom intrauterinih transfuzija treba biti filtriran (da bi se smanjila HLA imunizacija), opran (kako bi se uklonila plazma) i ozračen (kako bi se spriječila GVHD), te hematokrita 0.7% da bi sa što manjim volumenom izliječili anemiju.

Slika 20. Zeleni karton se otvara zbog evidencije kad je trudnica RhD negativna

KARTON ISPITIVANJA SENZIBILIZACIJA U TRUDNOĆI									Broj _____
Prezime, ime oca - majke, ime trudnice _____					Datum rođenja _____				
Adresa _____									
Zanimanje _____					Gdje radi _____				
Ranija ispitivanja _____									
TRUDNOĆA	DATUM PORODA	ANAMNEZA: dijete bolesti, aršane, epilepsija, dijabetes, anemija, žutica, visoki tisk, TBG, alergija, trauma, uzimanje lijekova	ISHOD: abortus, prijevremeni porod, mrtvo ili živo rođeno dijete	Prilježne transfuzije kod majke ili djeteta	Ako je dijete živo da li je došlo žuticu, anemiju ili je zdravo	SPOIL	TEŽINA	NAPOMENA	
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									

a.

Tiskara "BRAMIZ" Split

PREZIME I IME	ABO krvna grupa	Rh FENOTIP			OSTALE KRVNE GRUPE		ERITROCITNI PANEL		HLA TIPIZACIJA		NAPOMENA
		Fenotip	Datum	Br. protok.		Datum	Br. prot.	Datum	Br. prot.	Datum	
OT											
DJECA											

KONTROLE	Datum	Broj protok.	DC poliv. IgG	ANTITIJELA U SERUMU					IMUNO PROFILAKSA	Kontrola nakon aplikacije	HLA		NAPOMENA
				SLANA SREDINA			S PAPAN. ERITR.	I C			CM +/-	Senzibiliz.	
				+4°C	+20°C	+37°C		poliv.	IgG	Salek.			

b.

## 5. RASPRAVA

Kod primoimunizacije se preporuča određivanje IAT jedan put mjesečno do 24 ili 28 tjedna, a poslije toga u dvotjednim intervalima.

Pravilo da pozitivan IAT ukazuje na Rh imunizaciju, a porast titra na pogoršanje zdravstvenog stanja fetusa uglavnom vrijedi za primoimunizaciju. Kod trudnica koje su ranije imale teške oblike Rh imunizaciju procjena težine bolesti na osnovu titra i dinamike antitijela nije pouzdana. Treba misliti i na mogućnost da prethodno imunizirane trudnice s RhD negativnim fetusom u aktualnoj trudnoći mogu imati porast titra anti-D antitijela čak i iznad kritičnih vrijednosti. Nadalje, prema pročitanim istraživanjima mogući su paradokсни i srećom rijetki primjeri lakših oblika bolesti s enormno visokim vrijednostima indirektnog Coombsovog testa od nekoliko stotina pa i preko tisuću. S druge strane, postoje suprotni primjeri teških oblika bolesti uz granične vrijednosti IAT. [12]

Kliničar treba voditi računa o takvim mogućnostima jer je očigledno da antigeni potencijal RhD antigena i imunološki odgovor majke nije uniforman i do kraja razjašnjen. S obzirom da laboratoriji u Hrvatskoj nisu standardizirani nalaze titra antitijela iz različitih laboratorija treba kritički interpretirati. Tako npr. istovjetni nalazi IAT od npr.1:32 iz dva različita laboratorija ne moraju imati isto dijagnostičko značenje. Što se tiče nalaza unutar jednog laboratorija oni ne bi trebali varirati više od jednog razrjeđenja. U praktičnom smislu to znači da npr. porast titra antitijela od 1:16 na 1:32 ne mora ujedno značiti i stvaran porast titra.

Od ove godine se radi i prijenatalna fetalna RhD genotipizacija iz majčine plazme koja već od 12. tjedna trudnoće sa velikom sigurnošću određuje da li je dijete RhD pozitivno ili negativno.

## 6. ZAKLJUČCI

- Prije samo nekoliko desetljeća Rh imunizacija je bila nepoznata bolest s visokim perinatalnim mortalitetom i morbiditetom. Danas se može reći da je u kratkom vremenskom razdoblju protumačena patofiziologija bolesti, a u kliničku praksu uvedena profilaksa, dijagnostika i terapija. [5]
- Vrijednost titra se određuje različitim testovima, a izražava se kao najveći stupanj razrjeđenja s pozitivnom aglutinacijskom reakcijom. Za određivanje nazočnosti i koncentracije IgG antitijela u kliničkoj praksi najčešće se koristi humani indirektni antiglobulinski test (IAT), poznat i kao Indirektni Coombsov test (ICT). [5]
- Rezultati laboratorijskog ispitivanja titra moraju biti točni, precizni i reproducibilni. Točnost ovisi o kvaliteti testa, a preciznost o načinu izvođenja testa, mjernom instrumentu i skali na kojoj se izražava rezultat. Testovi moraju razlikovati rezultate zdravih od bolesnih ljudi i biti klinički značajni.
- Više od 50 antitijela crvenih krvnih stanica su poznati da uzrokuju HBN. Iako je Rh(D) gamaglobulin profilaksa značajno smanjila učestalost komplikacija u trudnoći što se tiče anti – D, potreba za detekcijom i praćenjem majčinih aloantitijela još uvijek postoji jer su unatoč profilaksi ta aloantitijela u stanju izazvati HBN. [7]
- Napredak u dijagnostici te sve veća osviještenost trudnica, uvelike su smanjili perinatalnu smrtnost uvjetovanu ovom bolešću.



## 7. LITERATURA

1. Matijević R., Knežević M. Novije spoznaje u dijagnostici, liječenju i prevenciji Rh imunizacije. Izvorni rad
2. Grgičević D., Vuk T. Imunohematologija i transfuzijska medicina. Medicinska naklada, Zagreb, 2000. 24., 35.-37., 56.-67.
3. Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović – Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjic D. Imunologija. Medicinska naklada, Zagreb, 2010. 318.
4. Golubić – Čepulić B., Principi imunohematološkog testiranja. PP prezentacija sa predavanja 2013.god.
5. Portal Hrvatskog društva za ginekologiju i opstetriciju  
<http://www.hd.go.hr/Pages/Print.aspx?siFraStranica=865&kultura=hr> (Pristupljeno: 12.06.2014.)
6. Izetbegovic S. Occurrence of ABO And RhD Incompatibility with Rh Negative Mothers. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24511269> (Pristupljeno: 10.06.2014.)
7. Smith H., Shirey R., Thoman S., Jackson J. Prevalence of clinically significant red blood cell alloantibodies in pregnant women at a large tertiary-care facility. 2013  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24689681> (Pristupljeno: 10.06.2014.)
8. Izvor podataka i metode – Radne upute KBC Split sa odjela transfuzije
9. Todorović B, Kazimirović B, Paraskijević B. Aloimunizacija na Rh D antigen u trudnoći - prikaz slučaja. Izvorni rad. Sarajevo, 2006
10. Tiblad E., Westgren M., Pasupathy D., Karlsson A., Wikman AT. Consequences of being Rhesus D immunized during pregnancy and how to optimize new prevention strategies. 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23750781> (Pristupljeno: 18.06.2014.)
11. Bowman J. Rh-immunoglobulin: Rh prophylaxis. Best Pract Res Clin Haematol. 2006  
[http://www.bprch.com/article/S1521-6926\(05\)00070-8/abstract](http://www.bprch.com/article/S1521-6926(05)00070-8/abstract) (Pristupljeno: 26.06.2014.)

## 8. SAŽETAK

**CILJ:** Pravilno opisati izvođenje titra protutijela imuniziranih trudnica te ukazati na važnosti praćenja trudnica kroz period gestacije kako bi se spriječila hemolitička bolest novorođenčeta.

**METODE:** Prvo imunohematološko ispitivanje svake trudnice je izrada krvne grupe u 8-10. tjednu trudnoće. Ako je Rh negativna naručuje se ponovno u 28. i 34. tjednu. Za hemolitičku bolest u novorođenčeta najkarakterističniji je nalaz pozitivnog direktnog antiglobulinskog testa (DAT-a) s novorođenčevim eritrocitima. To znači da majčina protutijela oblažu djetetove eritrocite. Indirektni je antiglobulinski test (IAT) pozitivan kada se protutijela nalaze u serumu, tj. osim toga što oblažu eritrocite, ona se nalaze i oko njih. Određuje se i titar protutijela. On je klinički značajan ako je 1:16.

**REZULTATI:** Čitajući već provedena istraživanja na ovu temu, ustanovila sam da je u posljednjih nekoliko godina usmjereno dosta pažnje na problem imunizacije, te da se radi na tome kako bi se što preciznije i točnije izmjerio rezultat titra protutijela. No zbog skupoće, te metode još nisu zaživjele kod nas u rutinskoj upotrebi.

**ZAKLJUČCI:** Napredak u dijagnostici uvelike je smanjio perinatalnu smrtnost koja je uvjetovana HBN-om. Također smatram da je potrebna daljna edukacija trudnica kako bi pravodobno došle na ispitivanje.

**KLJUČNE RIJEČI:** Rh imunizacija, hemolitična bolest novorođenčeta, titar protutijela, indirektni Coombsov test, direktni Coombsov test



## 9. SUMMARY

**AIM:** Properly describe the performance of antibody titer of immunized pregnant women, and point to the importance of monitoring pregnant women through their gestation period to prevent hemolytic disease of newborn.

**METHOD:** First immunohaematological testing of every pregnant woman is blood type testing in 8-10<sup>th</sup> week of pregnancy. If a pregnant woman Rhesus factor is negative, she is obligated to come on another testing in 28<sup>th</sup> and 34<sup>th</sup> week of pregnancy. For hemolytic disease of the newborn is the most characteristic finding a positive direct antiglobulin test (DAT) tested with newborn erythrocytes. This means that the newborn antibodies are coated with mother antibodies. The indirect antiglobulin test (IAT) is positive when the antibodies are found in the serum, that is, apart the fact that erythrocytes are coated by them, the antibodies are even located around the erythrocytes. Antibody titer has to be determined, too. It is clinically significant if it is 1:16.

**RESULTS:** During my research, I've read another studies made on this topic, and come to conclusion that a lot of attention, past few years, has been focused on this immunization problem. People in practice work a lot to come to an idea how precisely and accurately measure antibody titer. Because of expensiveness, these methods aren't yet in our routine work.

**CONCLUSION:** Because of the big progress in the diagnostics, perinatal deaths caused by hemolytic disease of the newborn are reduced. In my opinion, pregnant woman have to be educated about this topic, so they could come on their testing in the right moment.

**KEYWORDS:** Rh immunization, hemolytic disease of the newborn, antibody titer, indirect antiglobulin test, direct antiglobulin test

## 10. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Maria Bošković  
Adresa: Palih boraca 18, 21425 Selca  
Trenutno prebivalište: Hrvojeva 12, 21000 Split  
Telefon: 099 599 8161  
E-mail: mariaboskovic885@gmail.com  
Datum rođenja: 28.02.1993.  
Mjesto rođenja: Split

### OBRAZOVANJE:

2011. – ... Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu  
Smjer: Medicinsko laboratorijska dijagnostika  
2007. – 2011. Zdravstvena škola Split  
Smjer: Farmaceutski tehničar  
1999.- 2007. O.Š. Selca, Brač

### DODATNA ZNANJA:

Aktivno znanje engleskog jezika u govoru i pismu.

### HOBIIINTERESI:

2003.- ... Član puhačkog orkestra KUD Hrvatski sastanak 1888.  
Instrument: klarinet  
Sport: trčanje

### OSTALO:

Bračno stanje: neudana