

# Učestalost antieritrocitnih protutijela u trudnica

---

**Milinović, Sara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split / Sveučilište u Splitu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:665547>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-19**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Sara Milinović**

**UČESTALOST ANTIERITROCITNIH PROTUTIJELA U  
TRUDNICA**

**Završni rad**

Split, 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Sara Milinović**

**UČESTALOST ANTIERITROCITNIH PROTUTIJELA U  
TRUDNICA**

**FREQUENCY OF ANTI-ERYTHROCYTE ANTIBODIES  
IN PREGNANT WOMEN**

**Završni rad/Bachelor's thesis**

Mentor:

**Mirela Zec, univ. mag. med. lab. diag., predavač**

Split, 2018.

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Povijest transfuzijske medicine.....	1
1.2. Eritrocitne krvne grupe.....	3
1.2.1. ABO sustav krvnih grupa.....	3
1.2.2. Protutijela u ABO sustavu krvnih grupa.....	4
1.2.3. Rh sustav krvnih grupa.....	6
1.2.4. Protutijela u Rh sustavu krvnih grupa.....	6
1.2.5. Ostale krvne grupe na eritrocitima.....	8
1.3. Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta.....	9
1.3.1. Patofiziologija.....	9
1.3.2. Klinička slika.....	9
<b>2. CILJ RADA.....</b>	<b>11</b>
<b>3. IZVORI PODATAKA I METODE.....</b>	<b>12</b>
3.1. Testiranje trudnica.....	12
3.1.1. Prvo testiranje u trudnoći.....	12
3.1.2. Kontrolno testiranje RhD negativnih trudnica.....	13
3.1.3. Kontrolno testiranje RhD pozitivnih trudnica.....	13
3.1.4. Test pretraživanja i određivanje specifičnosti antieritrocitnih protutijela.....	14

3.2. Standardni postupci kod trudnice s klinički značajnim antieritrocitnim protutijelima.....	17
3.2.1. Standardni postupci kada su antieritrocitna protutijela koja uzrokuju HBFN otkrivena na prvom testiranju u trudnoći.....	17
3.2.2. Standardni postupci kada su antieritrocitna protutijela koja uzrokuju HBFN otkrivena prvi put na kontrolnom testiranju u trudnoći.....	19
3.3. Metode.....	20
3.3.1. Određivanje krvnih grupa ABO sustava.....	20
3.3.2. Određivanje RhD antigena.....	21
3.3.3. Indirektni antiglobulinski (Coombsov) test.....	24
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>26</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>28</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>30</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>31</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>32</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>35</b>
<b>9. POPIS KRATICA.....</b>	<b>38</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>39</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Povijest transfuzijske medicine

Transfuzijska medicina specifična je kliničko-laboratorijska i proizvodna djelatnost koja sjedinjuje medicinu, biotehnologiju, farmaciju, znanost i društvenu zajednicu u cjelini. Obuhvaća čitav niz aktivnosti od osiguranja dostatnih zaliha kvalitetnih, učinkovitih i neškodljivih krvnih pripravaka, dobre laboratorijske prakse, sustava kvalitete, kliničke transfuzijske prakse zasnovane na dokazima, dijagnostike krvlju prenosivih bolesti, laboratorijske dijagnostike hemostaze, HLA tipizacije tkiva i transplantacije krvotvornih matičnih stanica. (6)

Prvi povijesni pokušaj transfuzije krvi opisao je kroničar Stefano Infessura navodeći kako je 1492. godine, po preporuci liječnika, papi Inocentu VIII. dana krv trojice dječaka koji su kasnije umrli. Priča je često opovrgavana, a Infessura optuživan za antipapizam. Podaci o prvoj direktnoj transfuziji ljudske krvi vezani su uz ime Jamesa Blundella, britanskog opstetičara koji 11. prosinca 1818. izvodi prvu uspješnu transfuziju krvi o čemu izvještava Medicinsko kirurško društvo u Londonu. Iako je došao do važnih opažanja vezanih uz transfuzijsko liječenje, pokušaji transfuzija krvi su u 19. stoljeću bili rijetki. (5) Nepoznavanje krvnih grupa vodilo je teškim poslijetransfuzijskim hemolitičkim reakcijama sa smrtnim ishodom. Nepostojanje aseptičkih tehnika pogodovalo je bakterijskim infekcijama, a problem je predstavljalo i zgrušavanje krvi, pa su se prve transfuzije morale vršiti izravno iz vene davatelja krvi u venu primatelja.

Događaji prikazani kronološkim redoslijedom u sljedećoj tablici obilježili su razvoj transfuzijske medicine. (3)

Tablica 1.

<b>Godina</b>	<b>Autori i pronalazak</b>
<b>1628.</b>	Harvey W. Otkriće funkcije krvotoka i rada srca objavljeno u „De Motu Cordis“
<b>1667.</b>	Dennis J. Heterologne transfuzije krvi
<b>1818.</b>	Blundell J. Autologne transfuzije krvi u liječenju postpartalnih krvarenja
<b>1900.</b>	Landsteiner K. Otkriće ABO krvnih grupa
<b>1908.</b>	Ottenberg R. Transfuzije krvi prema ABO krvnim grupama
<b>1914.</b>	Hustin A., Agote L., Lewisohn R. Konzerviranje krvi s natrijevim citratom
<b>1923.</b>	Prva transfuzija u Hrvatskoj primijenjena je u klinici za ženske bolesti i porode u Zagrebu
<b>1940.</b>	Landsteiner K., Weiner AS. Rh krvne grupe
<b>1945.</b>	Coombs RRA., Mourant AE., Race RR. Antiglobulinski test (Coombsov test)
<b>1952.</b>	Walter CW. Plastične vrećice i sistemi za jednokratnu upotrebu
<b>1966.</b>	Freireich EJ., Judson G., Levine RH. Stanični separator za odvajanje plazme i krvnih stanica

## 1.2. Eritrocitne krvne grupe

Prema podacima International Society of Blood Transfusion (ISBT) na eritrocitnoj membrani smješteno je 308 antigena. Na osnovu kemijske građe, bioloških značajki i načina nasljeđivanja svrstani su u 35 sustava krvnih grupa. (2) U pojedinom sustavu nalazi se od jednoga pa do više od 50 različitih antigena. ABO i Rh sustavi najvažniji su sustavi krvnih grupa. "Prirodna" anti-A i/ili anti-B protutijela uvijek su prisutna u plazmi osoba krvnih grupa A, B i 0. Zbog toga inkompatibilne transfuzije u ovom sustavu krvnih grupa uzrokuju brzo razaranje eritrocita unutar krvnih žila. Anti-Rh protutijela nisu prisutna u krvi neimuniziranih osoba. Po tome se razlikuju od ABO sustava krvnih grupa. Antigeni iz Rh sustava krvnih grupa jaki su imunogeni, koji u osoba koje nemaju te antigene češće nego drugi antigeni potiču imunološki odgovor i stvaranje iregularnih protutijela. (3) Ta protutijela najčešće uzrokuju poslijetransfuzijsku hemolitičku reakciju (PTHR) i hemolitičku bolest fetusa i novorođenčeta (HBFN).

### 1.2.1. ABO sustav krvnih grupa

Biokemijska ispitivanja su pokazala da su mnogi važni eritrocitni antigeni ugljikohidrati. Biosinteza antigena ABH, Lewis, P i I sustava je slična: na osnovni oligosaharid specifične transferaze dodaju imunodominantne šećere. Protutijela na ugljikohidratne antigene većinom su prirodna protutijela IgM klase. Ta protutijela direktno aglutiniraju eritrocite koji posjeduju odgovarajući antigen, aktiviraju komplement i ako reagiraju na 37°C uzrokuju intravaskularnu hemolitičku transfuzijsku reakciju. IgM molekule ne prelaze posteljicu i ne uzrokuju hemolitičku bolest fetusa i novorođenčeta. (2)

ABO-antigena, osim na membrani eritrocita, ima i na stanicama drugih tkiva, te otopljenih u plazmi i tjelesnim tekućinama. Za razliku od drugih sustava krvnih grupa, ABO fenotip određen je prisutnošću antigena na membrani stanica i protutijela u plazmi. A, B i 0 geni nasljeđuju se prema Mendelovu zakonu. A i B geni su kodominantni, a gen 0 je recesivan. Tri alela A, B i 0 odgovorna su za četiri ABO fenotipa: A, B, AB i 0. (2)



Geni A i B ne stvaraju antigene direktno, već kontroliraju sintezu enzima glikozil-transferaza koje dodaju specifične šećere (N-acetilgalaktozamin za krvnu grupu A, a D-galaktozu za krvnu grupu B) na oligosaharidne lance H antigena. H antigen je paraglobozid koji je sastavni dio eritrocitne membrane na koji je dodana L-fukoza pod utjecajem H gena koji sintetizira fukozil-transferazu. H antigen je početna supstancija za A i B antigene. Rijetke osobe ne naslijede H gen ( $0_h$ , Bombay), pa na njihovim eritrocitima nema ABH antigena. Te osobe u serumu imaju protutijela anti-A, anti-B i anti-H specifičnosti koja reagiraju na  $37^\circ\text{C}$  te se oni transfuzijski mogu liječiti samo s krvi davatelja koji je također  $0_h$  fenotipa. Osim  $A_2$  podgrupe, kojoj je učestalost 10%, ostale podgrupe su rijetke. Podgrupe oslabljuju izražaj A, odnosno B antigena i zahtijevaju dodatno imunohematološko ispitivanje. Učestalost ABO fenotipa različita je u različitim etničkim skupinama. (2) Ipak, najčešće krvne grupe su A i 0.

### **1.2.2. Protutijela u ABO sustavu krvnih grupa**

U serumu osoba A, B i 0 prisutna su anti-A i/ili anti-B protutijela. U osoba krvne grupe AB u serumu nema ni anti-A ni anti-B protutijela. Stvaranje anti-A i anti-B protutijela u djece započinje u dobi od 3 do 6 mjeseci. Do tada se ona ne mogu dokazati, već se u njihovu serumu mogu nalaziti majčina protutijela. Titar anti-A i anti-B protutijela snižen je u starijih osoba, kao i u osoba s poremećajima imunološkoga sustava. U osoba krvnih grupa A i B protutijela su predominantno u razredu IgM, a u osoba krvne grupe 0 u razredu IgG. Transfuzijama krvi ili koncentrata eritrocita nepodudarnih u ABO sustavu krvnih grupa ili imunizacijom majke s fetalnim A i/ili B nepodudarnim eritrocitima u trudnoći nastaju protutijela IgG bez obzira u kojem su razredu prije bila. Anti-A i/ili anti-B uzrok su poslijetransfuzijske hemolitičke reakcije s intravaskularnom hemolizom i hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta. Temperaturni je optimum imunološke reakcije anti-A i/ili anti-B protutijela i odgovarajućih antigena na  $20^\circ\text{C}$ . Ta protutijela dobro reagiraju i na  $37^\circ\text{C}$ . Zbog toga se neće propustiti u testovima izvođenima na sobnoj temperaturi. (3)

Tablica 2. ABO sustav krvnih grupa (2)

Gen	Glikozil transferaza	Imunodominantni šećer	ABH antigeni	Broj antigena	ABO protutijela	ABO grupa	Učestalost (%)
<b>A</b>	N-acetil galaktozamin transferaza	N-acetil galaktozamin	<b>A</b>	800.000-1.600.000	anti-B	<b>A</b>	41,8
<b>B</b>	D-galaktozil transferaza	D-galaktoza	<b>B</b>	600.000-800.000	anti-A	<b>B</b>	17,7
<b>H</b>	L-fukozil transferaza	L-fukoza	<b>H</b>	-	anti-A anti-B	<b>0</b>	34,0
<b>A</b> <b>B</b>	svi gore navedeni	svi gore navedeni	<b>A</b> <b>B</b>	800.000	-	<b>AB</b>	6,5

### **1.2.3. Rh sustav krvnih grupa**

Proteinski antigeni neposredni su proizvod gena na eritrocitnoj membrani. Protutijela na proteinske antigene uglavnom se pojavljuju nakon imunološkog podražaja transfuzijom krvi ili trudnoćom. Na 37°C oblažu eritrocite i otkrivaju se indirektnim antiglobulinskim testom. Obloženi se eritrociti većinom razgrađuju ekstravaskularno. Ako protutijela aktiviraju komplement mogu uzrokovati i intravaskularnu hemolizu eritrocita. (2)

Rh sustav je najveći i najkompleksniji sustav krvnih grupa. Čini ga više od 50 antigena, od kojih je najvažniji antigen D. Rh sustav je određen dvama blisko smještenim genima koji proizvode tri Rh peptidna lanca. Jedan gen je odgovoran za protein D, a drugi za izražaj proteina Cc i Ee. Ti se Rh-aleli nasljeđuju kao haplotip. Osoba od svakog roditelja naslijedi jedan haplotip. Rh geni su kodominantni. Rh-antigeni se nalaze samo na eritrocitima i sastavni su dio eritrocitne membrane. U Rh negativne osobe nije dokazano postojanje antigena D. Učestalost Rh negativnih osoba je 16%. Osim tih čestih Rh-antigena, postoje i proizvodi rijetkih alela. Neki Rh geni mogu odrediti broj antigena na eritrocitima, pojačati ili potisnuti izražavanje drugih Rh antigena. Slabi D je izraz za eritrocitni fenotip koji ima promijenjenu strukturu antigena D ili na membrani eritrocita ima mali broj antigena. Slabi D nastaje: kada osoba naslijedi gen koji oslabljuje kvantitativni izražaj antigena D; kada jedan gen u međudjelovanju s drugim genom modificira i oslabljuje D izražaj; kada gen nema genetsku šifru za sve epitope antigena D. (2)

### **1.2.4. Protutijela u Rh sustavu krvnih grupa**

Rh protutijela su najčešća protutijela uzrokovana trudnoćom i transfuzijom, IgG su razreda i uzrokuju hemolitičku transfuzijsku reakciju i teške oblike hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta. Antigen D je najjači imunogen, te 80% Rh negativnih osoba nakon transfuzije jedne doze RhD pozitivne krvi razvije anti-D protutijela. (2)

Nakon transfuzije 1-40 mL D pozitivne krvi, 15-30% Rh negativnih osoba razvije anti-D. Stoga žene u reproduktivnoj dobi ne smiju biti liječene RhD pozitivnim krvnim pripravcima, a nakon poroda RhD pozitivnog djeteta trebaju primiti hiperimuni anti-D imunoglobulin. Rh-antigeni C, c, E i e mnogo su slabiji imunogeni i razvijaju protutijela u približno 2% antigen negativnih-primatelja krvi. (2)

Tablica 3. Učestalost Rh-kompleksa i najčešćih Rh-antigena (2)

<b>Rh-haplotip</b>	<b>Učestalost (%)</b>	<b>Rh-antigeni</b>	<b>Učestalost (%)</b>
CDe	4	D	84
Cde	42	C	70
CDE	14	E	30
CDE	rijetko	C	80
Cde	37	E	98
Cde	2	F	64
CdE	1	G	85

### **1.2.5. Ostale krvne grupe na eritrocitima**

Od otkrića ABO sustava krvnih grupa 1900. godine pa do danas otkriveno je više od 650 eritrocitnih antigena. Neki se od njih nalaze na eritrocitima većine osoba, a drugi se nalaze u malog broja ljudi ili su čak ograničeni na jednu obitelj. Kao što su različite učestalosti, tako im je različito i kliničko značenje. Zbog posljedica koje nastaju nakon transfuzija inkompatibilnih eritrocita od najvećeg su značenja ABO i Rh sustav krvnih grupa. U drugu grupu možemo svrstati eritrocitne krvne grupe koje rjeđe dovode do poslijetransfuzijskih hemolitičkih reakcija ili su te reakcije manje opasne. To su krvne grupe Kell, Kidd, Duffy. Transfuzije inkompatibilnih eritrocita u MNSs, P, Ii, Lewis i Lutheran krvnim grupama vrlo rijetko uzrokuju poslijetransfuzijske hemolitičke reakcije (PTHR). Ostali eritrocitni antigeni imaju manje značenje jer samo iznimno uzrokuju klinički značajne fenomene. Neki se eritrocitni antigeni nalaze na eritrocitima više od 99% ljudi. To su tzv. antigeni visoke učestalosti. Kada je neka osoba imunizirana i ima protutijela protiv njih, teško je pronaći kompatibilni krvni pripravak. Eritrocitni antigeni mogu se nalaziti i na eritrocitima vrlo malog broja ljudi, odnosno mogu biti ograničeni na jednu ili više obitelji. To su tzv. antigeni niske učestalosti. Njihova je važnost značajno manja jer je lako naći kompatibilni krvni pripravak osobama koje imaju protutijela na njih. Poteškoće predstavlja njihovo laboratorijsko dokazivanje, jer su testni serum koji se dokazuju vrlo rijetki ili ih nema. (3)

## **1.3. Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta**

### **1.3.1. Patofiziologija**

Antieritrocitna protutijela u cirkulaciji fetusa i novorođenčeta vežu se za specifične eritrocitne antigene. Protutijelima obloženi eritrociti mehanizmom olakšane fagocitoze bivaju fagocitirani u slezeni, te životni vijek eritrocita može, u teškoj HBFN, biti skraćen na samo 2-3 dana. Nastanak i težina anemije ovise s jedne strane o antieritrocitnim protutijelima majke, specifičnosti protutijela, koncentraciji protutijela u krvi, razredu i podrazredu te avidnosti protutijela, a s druge strane o sposobnosti hematopoetskog sustava fetusa i novorođenčeta da kompenzira anemiju. (7) Koštana srž i drugi hematopoetski organi, jetra i slezena, na nastalu anemiju odgovaraju povećanom proizvodnjom eritrocita i otpuštanjem nezrelih eritrocita u cirkulaciju, kao u fetalne eritroblastoze. Hemolizom eritrocita oslobađa se hemoglobin i njegov metabolički produkt bilirubin. (1) Nekonjugirani bilirubin u fetalnom razdoblju prolazi preko posteljice u cirkulaciju majke. Potom se u jetri majke konjugira u direktni bilirubin te biva izlučen putem žuči. Stoga vrijednosti ukupnog bilirubina u fetalnoj cirkulaciji i amnionskoj tekućini, premda mogu biti povišene, ne dosežu toksične vrijednosti. Nakon poroda, jetra novorođenčeta nije sposobna konjugirati i izlučiti bilirubin, posebno u nedonoščadi i nastaje nakupljanje razgradnih produkata bilirubina. Indirektni bilirubin doseže toksične vrijednosti (>20mg/dl), koje ako je liječenje zakašnjelo mogu uzrokovati trajno oštećenje mozga. (7)

### **1.3.2. Klinička slika**

Klinička slika HBFN manifestira se u rasponu od blage (laboratorijski prepoznatljive hemolize), do vrlo teške HBFN s mogućim smrtnim ishodom, već od 8. tjedna gestacije. U blažim slučajevima HBFN nastaje ubrzana razgradnja eritrocita, posljedična žutica izraženija od fiziološke i pad hemoglobina veći od fiziološkog pada. Teži oblik bolesti očituje se već pri rođenju jačom anemijom, koja zahtijeva liječenje.

Razgradnja eritrocita je izražena i bilirubin vrlo brzo raste, a bez hitne izmjene krvi novorođenčetu može nastati kernikterus sindrom obilježen letargijom, spazmom, nepravilnim disanjem i trajnim oštećenjem mozga. (4) Vrijednosti bilirubina u krvi i razvoj kernikterusa visoko koreliraju. Kernikterus se neće razviti pri vrijednostima bilirubina  $< 20$  mg/dl u donesene novorođenčadi, dok su u nedonoščadi i niže vrijednosti bilirubina rizične. Jak hemolitički proces u fetalnom razdoblju praćen je slikom fetalne anemije, a u najtežim slučajevima razvije se hydrops fetalis, koji obilježavaju generalizirani edemi s jako povećanom jetrom i slezenom te niskim vrijednostima albumina u krvi. Relativno visoke vrijednosti albumina u ascitesu (u odnosu na vrijednosti u krvi) upućuju na oštećenje endotela krvnih žila, kao posljedicu hipoksije. Komplikacije fetalnog hidropsa koje dovode do smrti su intravaskularne tromboze s opsežnim krvarenjima u pluća i mozak. (7)

## **2. CILJ RADA**

Cilj ovoga rada je pokazati na primjeru učestalosti antieritrocitnih protutijela u trudnica važnost njihova određivanja za zdravlje majke i djeteta. Izvođenje prikladnih testova neizbježno je u sprječavanju hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta. Glavni ciljevi rada su:

1. usporediti broj pozitivnih indirektnih antiglobulinskih testova s ukupnim brojem rađenih testova u sljedećim populacijama: predoperativna bolnička populacija, trudnice na prvome testiranju u trudnoći i trudnice na kontrolnome testiranju u trudnoći;
2. prikazati broj identificiranih tipova antieritrocitnih protutijela među navedenim populacijama.



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

### **3.1. Testiranje trudnica**

#### **3.1.1. Prvo testiranje u trudnoći**

Sve razvijene zemlje propisuju u ranoj trudnoći (10.-14. tjedan) određivanje ABO krvne grupe, RhD antigena i test pretraživanja antieritrocitnih protutijela. Testom pretraživanja u ranoj trudnoći otkrivaju se protutijela stvorena prije sadašnje trudnoće. Fetomaternalno krvarenje potrebno za primarnu imunizaciju ne događa se u normalnim trudnoćama prije 12. tjedna trudnoće, računajući da za razvoj protutijela treba 4 tjedna do 6 mjeseci (prosječno 9 tjedana). Očigledno je da primarnu imunizaciju nećemo otkriti u ranoj trudnoći. Stoga je cilj ranog pretraživanja protutijela otkrivanje prethodno imuniziranih trudnica, koje bi u ovoj trudnoći mogle doživjeti sekundarnu imunizaciju posljedica čega je brz i jak porast titra protutijela. Negativan rezultat testa pretraživanja može značiti da trudnica nije imunizirana ili je imunizirana, ali je količina protutijela ispod granice otkrivanja testa. Rijetko test pretraživanja može biti negativan, a da su u serumu prisutna klinički značajna antieritrocitna protutijela. Naime, testni eritrociti koji se koriste za rutinsko otkrivanje antieritrocitnih protutijela ne moraju imati antigene čija je učestalost manja od 1% te se s njima neće moći otkriti imunizacija uzrokovana protutijelima na ove antigene. Antieritrocitna protutijela na antigene niske učestalosti vrlo rijetko uzrokuju HBFN. Te se imunizacije u pravilu otkrivaju pri porodu uz simptome HBFN, pozitivan direktni Coombsov test novorođenčeta bez detektabilnih protutijela majke uz ABO podudarnost. Na prvom testiranju trudnicama se određuje i ABO krvna grupa. Objašnjenje određivanja ABO krvne grupe leži u mogućoj potrebi transfuzijskog liječenja trudnice i roditelje. S druge strane, budući da je to jedino određivanje ABO krvne grupe u trudnoći, ovom se pretragom selektiraju trudnice krvne grupe 0, čija su novorođenčad rizična za razvoj ABO HBN. Određivanje RhD antigena na prvom testiranju jedno je od važnijih u trudnoći. Već je u ranoj trudnoći potrebno identificirati RhD negativne trudnice, zbog mogućnosti primanja RhD-imunopofilakse, odnosno izdvojiti ih kao rizičniju skupinu za razvoj HBFN. (7)

### **3.1.2. Kontrolno testiranje RhD negativnih trudnica**

Zbog FMK koja se događaju tijekom cijele trudnoće, negativan test pretraživanja u prvom tromjesečju može na kontrolnom testiranju u trećem tromjesečju postati pozitivan u RhD negativnih i RhD pozitivnih trudnica. Preporuke svih razvijenih zemalja propisuju za RhD negativne trudnice kontrolno pretraživanje protutijela na početku trećeg tromjesečja (28.-30. tjedna). Prema standardima i uputama transfuzijske medicine, u RH, pored navedenog kontrolnog pretraživanja protutijela u 28. tjednu trudnoće, preporuča se i pretraživanje u 34. tjednu trudnoće. Kontrolno pretraživanje u 28. tjednu trudnoće, osim otkrivanja RhD imunizacije nastale tijekom trudnoće, u zemljama koje provode rutinsku prijenatalnu RhD-zaštitu služi i kao posljednja provjera prije primjene RhD-zaštite. (7) U RhD negativnih žena koje nisu do kraja trudnoće imunizirane može se spriječiti RhD imunizacija koja nastaje u porođaju davanjem RhD hiperimunog gamaglobulina unutar 72 sata od porođaja. Anti-RhD protutijela iz hiperimunog RhD gamaglobulina vežu se za RhD pozitivne fetalne eritrocite u majčinu krvotoku. Eritrociti obloženi protutijelima brzo se odstranjuju iz njezine krvi i ne nastaje imunizacija. RhD 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. RhD hiperimunim gamaglobulinom ne liječi se već nastala imunizacija. Prevencija HBFN-a uspješnija je kada se hiperimuni RhD gamaglobulin primjeni u 28.-29. i 32.-34. tjednu trudnoće. Primjenom prije kraja trudnoće, anti-D protutijela iz hiperimunog gamaglobulina prolaze posteljicu, no neće štetiti djetetu. (9)

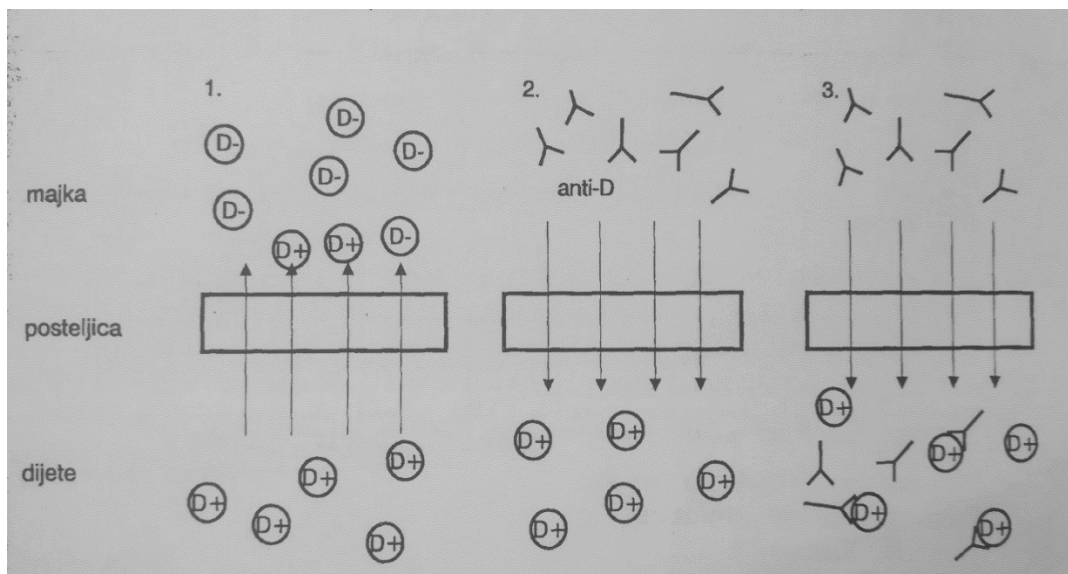
### **3.1.3. Kontrolno testiranje RhD pozitivnih trudnica**

U svijetu postoje značajne razlike kada je riječ o kontrolnom testiranju RhD pozitivnih trudnica. Prisutne su zbog nedoumice oko kliničke važnosti ne-RhD protutijela stvorenih tijekom trudnoće, za trudnicu i dijete. Eritrocitna protutijela stvorena tijekom trudnoće bitna su za trudnicu u slučaju hitnog transfuzijskog liječenja ili ako uzrokuju HBFN. Rezultati istraživanja HBFN provedeni u više zemalja pokazali su da antieritrocitna protutijela otkrivena prvi puta u trećem tromjesečju nisu uzrokovala HBFN.

Stoga je zaključeno da je kontrolno testiranje u trećem tromjesečju nepotrebno i neekonomično. S druge strane, Koelewijn i suradnici donose oprečan zaključak. Analizirali su učinkovitost testa pretraživanja u prvom tromjesečju u RhD pozitivnih trudnica i zaključili da je prediktivna vrijednost testa pretraživanja u prvom tromjesečju samo 75%. Najčešće su Rhc aloprotutijela uzrokovala HBFN, iako nisu otkrivena na prvom pretraživanju. Zbog toga preporučuju kontrolno testiranje u 30. tjednu samo za Rhc antigen negativne trudnice. (7)

### **3.1.4. Test pretraživanja i određivanje specifičnosti antieritrocitnih protutijela**

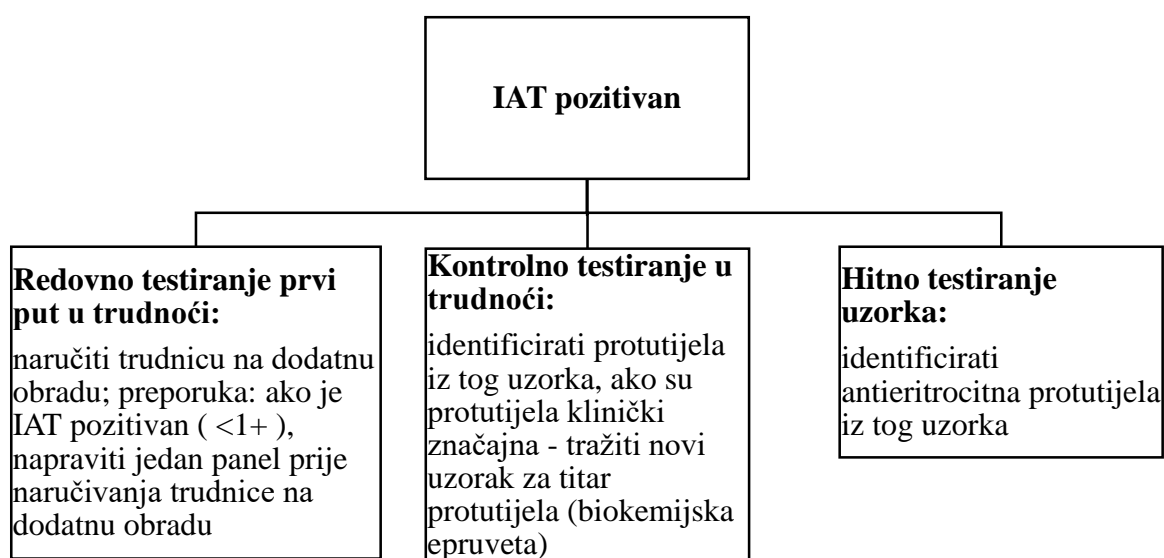
Test pretraživanja antieritrocitnih protutijela je primarni test za otkrivanje trudnoće rizične za razvoj HBFN. Niti jedan drugi neinvazivni test prenatalne dijagnostike neće pouzdano otkriti sve HBFN osim ovog testa. (1) Test pretraživanja antieritrocitnih protutijela izvodi se u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT). Može se raditi metodom u epruveti, u mikrostupcu i u mikropločama. Od komercijalnih testova u mikrostupcu najzastupljeniji su: Ortho Clinical Diagnostics, New Jersey, USA; Diamed GmbH Biorad, Cressier, Switzerland; Scangel GmbH Biorad, Philadelphia, USA. Identifikacija protutijela ili određivanje specifičnosti protutijela se izvodi ako je test pretraživanja pozitivan. Identifikacija se, kao i test pretraživanja, primarno izvodi u IAT. Pored IAT u identifikaciji se koriste i drugi testovi: testiranje s enzimom tretiranim testnim eritrocitima, elucija protutijela s eritrocita, adsorpcija protutijela iz seruma, neutralizacija protutijela u serumu topivim antigenima. (7) Kada je određena specifičnost antieritrocitnih protutijela, procjenjuje se njihov klinički značaj. Klinički značaj protutijela nije jednostavno definirati, a najbliža je definicija da su to protutijela koja uzrokuju skraćen životni vijek transfudiranih eritrocita ili uzrokuju HBFN.



Slika 1. Shematski prikaz nastanka RhD HBFN (3)

1. prijelaz fetalnih RhD pozitivnih eritrocita u majčin krvotok
2. stvaranje anti-D protutijela u majčinu krvotoku
3. prijelaz anti-D protutijela kroz posteljicu i njihovo vezanje na fetalne eritrocite

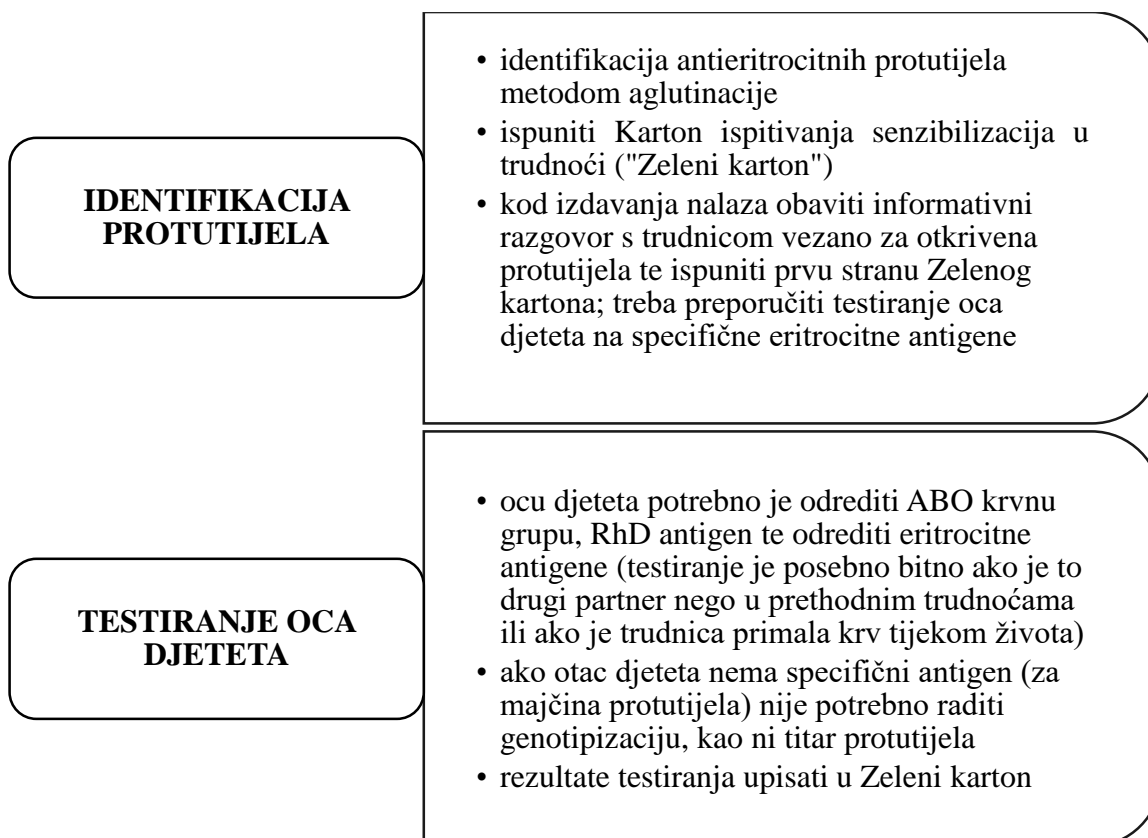
Tablica 4. Algoritam postupanja kod pozitivnog IAT-a (8)



### 3.2. Standardni postupci kod trudnice s klinički značajnim antieritrocitnim protutijelima

Klinički značajna antieritrocitna protutijela su protutijela iz Rh, Kell, Duffy, Kidd sustava krvnih grupa te protutijela anti-S, anti-s. Ova protutijela se smatraju klinički značajnima jer su prema podacima iz literature uzrokovala HBFN. Na jednak način treba pristupiti i rijetko otkrivenim antieritrocitnim protutijelima čiji značaj glede HBFN nije dovoljno poznat (anti-Yt<sup>a</sup>, anti-Jr<sup>a</sup>...). Kod praćenja trudnoća bitno je jesu li klinički značajna protutijela otkrivena na prvom testiranju u trudnoći ili na kontrolnom testiranju. (8)

#### 3.2.1. Standardni postupci kada su antieritrocitna protutijela koja uzrokuju HBFN otkrivena na prvom testiranju u trudnoći



### **FETALNA GENOTIPIZACIJA IZ KRVI MAJKE**

- uzorak krvi majke šalje se u Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu (Odjel za molekularnu dijagnostiku) uz prethodni dogovor s Odjelom
- preporuka je ne slati na testiranje prije 16. gestacijskog tjedna trudnoće
- ako je specifični gen djeteta pozitivan preporuča se praćenje titra protutijela, kao i praćenje glede HBFN
- ako je specifični gen negativan preporuča se kontrola antieritrocitnih protutijela u 6. i 8. mjesecu trudnoće

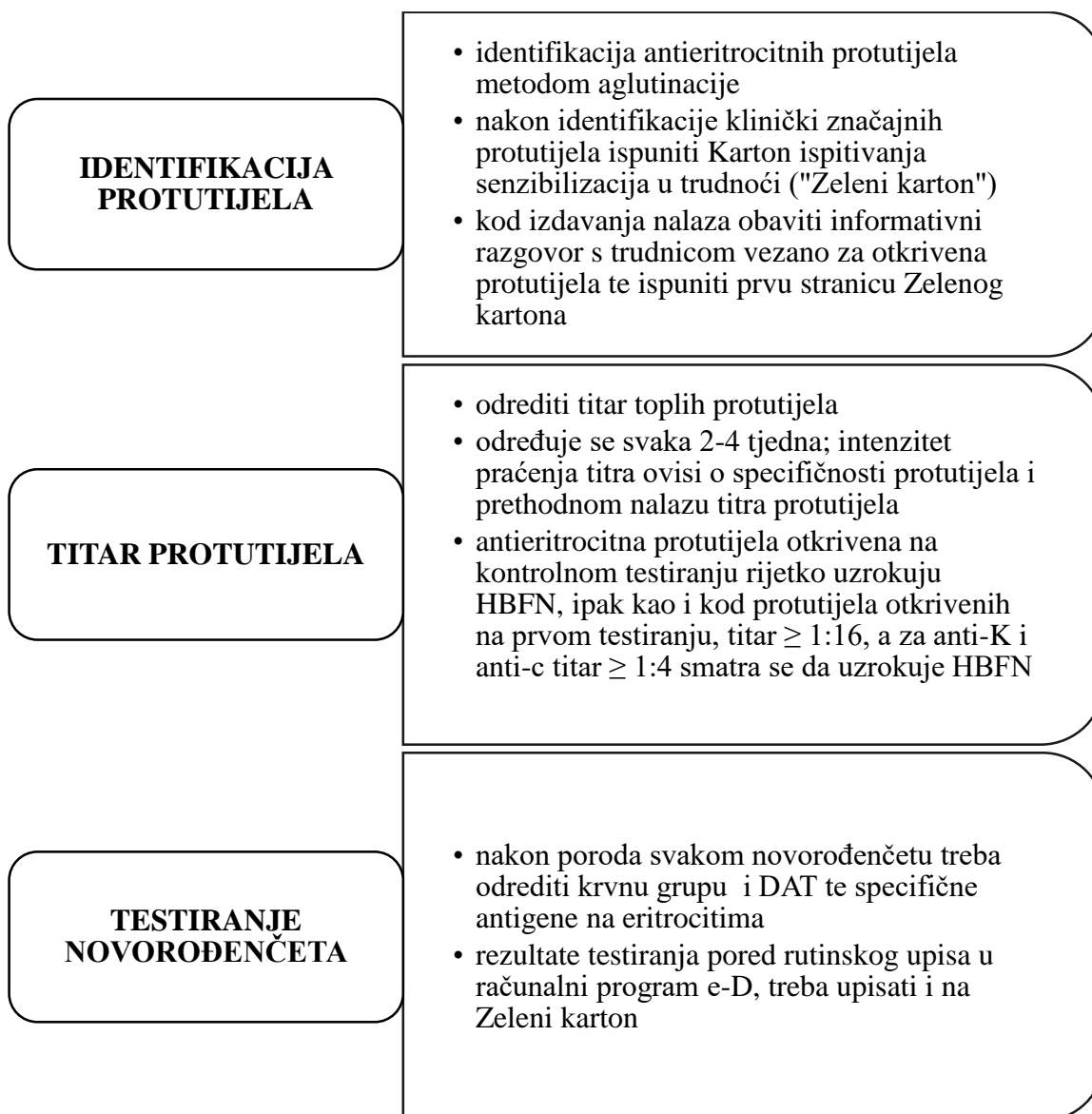
### **TITAR PROTUTIJELA**

- određuje se titar toplih protutijela
- titar protutijela određuje se ako je otac djeteta antigen pozitivan i/ili je genotip fetusa pozitivan, također se određuje kad je nepoznat antigen oca djeteta i/ili genotip fetusa
- prije 20. gestacijskog tjedna određuje se svakih 3-8 tjedana, poslije 20. gestacijskog tjedna određuje se svaka 2-4 tjedna; intenzitet praćenja titra ovisi o specifičnosti protutijela, HBFN u prethodnim trudnoćama, kao i prethodnom nalazu titra protutijela
- antieritrocitna protutijela u titru  $\geq 1:16$ , a za anti-K i anti-c u titru  $\geq 1:4$  povezana su s teškom HBFN

### **TESTIRANJE NOVOROĐENČETA**

- nakon poroda svakom novorođenčetu majki s klinički značajnim protutijelima treba odrediti krvnu grupu i DAT te specifične antigene na eritrocitima
- rezultate testiranja pored rutinskog upisa u računalni program, treba upisati i na Zeleni karton

### 3.2.2. Standardni postupci kada su antieritrocitna protutijela koja uzrokuju HBFN otkrivena prvi put na kontrolnom testiranju u trudnoći





### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Određivanje krvnih grupa ABO sustava

Priprema uzorka (3): 1. Epruveta s uzorkom krvi centrifugira se 2 min na 3000 okretaja.

2. Dvije staklene epruvete obilježe se imenom i prezimenom ispitanika.
3. Pipetom se iz centrifugiranog uzorka odstrani plazma, odnosno serum i preseli u praznu staklenu epruvetu.
4. U drugoj epruveti napravi se 3-5%-tna suspenzija ispitanikovih eritrocita u fiziološkoj otopini.

Izvođenje testa u epruveti (3)

1. U epruveti se pomiješaju 2 kapi seruma (testnog seruma ili seruma ispitanika) i 1 kap 3%-tne do 5%-tne suspenzije eritrocita (testnih eritrocita ili eritrocita ispitanika) u fiziološkoj otopini.
2. Epruvete se inkubiraju na sobnoj temperaturi 30 do 60 min ili nakon 5 min inkubacije centrifugiraju 1 min na 1000 okretaja u minuti.
3. Pregledom prema svjetlu ispita se jesu li eritrociti hemolizirani. Laganim protresanjem epruvete eritrociti se resuspendiraju i odredi postojanje aglutinacije. Aglutinacija ili hemoliza znak su reakcije između protutijela i antigena i označuju pozitivnu reakciju.

Izvođenje testa na pločici (3)

1. Na pločici od opalnog stakla ili na pokrovnome stakalcu pomiješaju se 2 kapi seruma (testnog seruma ili seruma ispitanika) s 1 kapi 40%-tne do 50%-tne suspenzije eritrocita (testnih eritrocita ili eritrocita ispitanika) u fiziološkoj otopini ili u vlastitu serumu.

2. Pločica se rotacijski naginje naprijed-natrag i stvaranje aglutinata promatra najmanje 5, a najviše 10 minuta.
3. ABO krvna grupa određena testiranjem eritrocita testnim serumima mora biti ista kao i krvna grupa određena ispitivanjem seruma testnim eritrocitima. Kada se slažu rezultati testiranja eritrocita i seruma, tada je ABO krvna grupa dobro određena.

Kontrola izvođenja testa: 1. Negativna reakcija između AB-seruma (ili 6% albumina) i ispitivanih eritrocita (kontrola hemotesta).

2. Negativna reakcija između seruma i eritrocita 0 krvne grupe (kontrola eritrotesta).

3. U usporednom određivanju krvnih grupa na eritrocitima i u serumu, rezultati krvnih grupa uvijek se moraju slagati.

4. Određivanje ABO krvnih grupa dvjema različitim metodama (pločica i epruveta) i od dvaju tehničara mora se slagati.

### **3.3.2. Određivanje RhD antigena**

RhD krvna grupa određuje se dokazom D-antigena na eritrocitnoj membrani tehnikama na pločici i u epruveti s monoklonskim testnim reagensima ili poliklonskim testnim serumima. Monoklonski testni reagensi mogu sadržavati protutijela razreda IgM, IgM+IgG ili IgG. Najčešće se primjenjuje monoklonski testni reagens anti-D IgM kojim se D-antigen određuje na pločici i u epruveti. Poliklonski testni serumi specifičnosti anti-D pripremljeni su od humanoga seruma imuniziranih davatelja s visokim titrom anti-D protutijela. Najčešće su ti serumi sastavljeni od protutijela razreda IgG. Da bi se proizvela direktna aglutinacija RhD pozitivnih eritrocita, tim se serumima u tijeku proizvodnje dodaju razni dodaci kojima reakcija aglutinabilnosti postaje direktna i vidljiva. (10)

Određivanje RhD antigena antiserumima u visokoproteinskom mediju (4)

U epruveti: 1. U epruveti se pomiješaju 2 kapi anti-RhD seruma i 1 kap 3 do 5%-tne suspenzije eritrocita u fiziološkoj otopini, serumu ili u plazmi.

2. Nakon nekoliko minuta inkubacije epruveta se centrifugira na 1000 okretaja 1 min ili na 3000 okretaja 20 sekundi.

3. Laganim protresanjem epruvete eritrociti se resuspendiraju i odredi se postojanje aglutinacije.

Na pločici: 1. Na predmetnom stakalcu pomiješaju se 2 kapi anti-RhD seruma i 1 kap 40 do 50%-tne suspenzije eritrocita u vlastitu serumu ili u plazmi.

2. Predmetno stakalce stavlja se na ugrišanu i odozdo osvijetljenu staklenu ploču i naginje naprijed-natrag. Temperatura suspenzije eritrocita u testnom serumu mora biti od 37 do 40°C.

3. Pojava aglutinacije promatra se unutar 2 do 3 minute.

Kontrola izvođenja testa: 1. Rh kontrolnim serumom (ista reakcija u kojoj je antiserum zamijenjen otopinom istoga sastava, ali bez protutijela) ili

2. 22%-tnom do 30%-tnom otopinom albumina. Ako je kontrola pozitivna, onda rezultat određivanja RhD antigena nije pouzdan. Kontrolni Rh testni serum aglutinira eritrocite koji su in vivo obloženi protutijelima, bez obzira na to jesu li oni RhD pozitivni ili RhD negativni. U tom je slučaju DAT obično pozitivan.

#### Određivanje RhD faktora u IAT-u (4)

1. U epruveti se pomiješaju 1 kap anti-D seruma i 1 kap 3 do 5%-tne suspenzije (jedanput opranih) eritrocita u fiziološkoj otopini.
2. Epruveta se inkubira 15 do 30 min na 37°C.
3. Eritrociti se triput peru velikim volumenom fiziološke otopine. Nakon zadnjega pranja iz epruvete se odlije i zadnja kap fiziološke otopine.
4. Dodaju se 2 kapi polispecifičnog ili monospecifičnog (anti-IgG) AHG-a. Blagim protresanjem epruvete eritrociti se resuspendiraju i zatim se epruveta centrifugira na 1000 okretaja 1 minutu.
5. Laganim protresanjem epruvete eritrociti se resuspendiraju i odredi se prisutnost aglutinacije.
6. Aglutinacija znači da se na eritrocitima nalazi D antigen. Ako aglutinacija nije vidljiva, to znači da na eritrocitima nema D-antigena. Rezultati određivanja krvnih grupa mogu se smatrati točnima samo kada kontrolni testni eritrociti pokažu očekivane rezultate aglutinacije.

Kontrola izvođenja testa: 1. U epruvetu se doda 1 kap 3 do 5%-tne suspenzije eritrocita prije toga obloženih anti-D protutijelima (Coombsova kontrola).

2. Epruveta se centrifugira na 1000 okretaja 1 min.
3. Laganim protresanjem epruvete eritrociti se resuspendiraju i odredi se prisutnost aglutinacije. Ako je test dobro izveden, aglutinacija mora biti vidljiva.
4. Kada je D fenotip eritrocita određen u IAT-u, potrebno je izvesti i DAT da bi se isključila mogućnost da je IAT bio pozitivan zbog in vivo oblaganja eritrocita iregularnim protutijelima.

### 3.3.3. Indirektni antiglobulinski (Coombsov) test

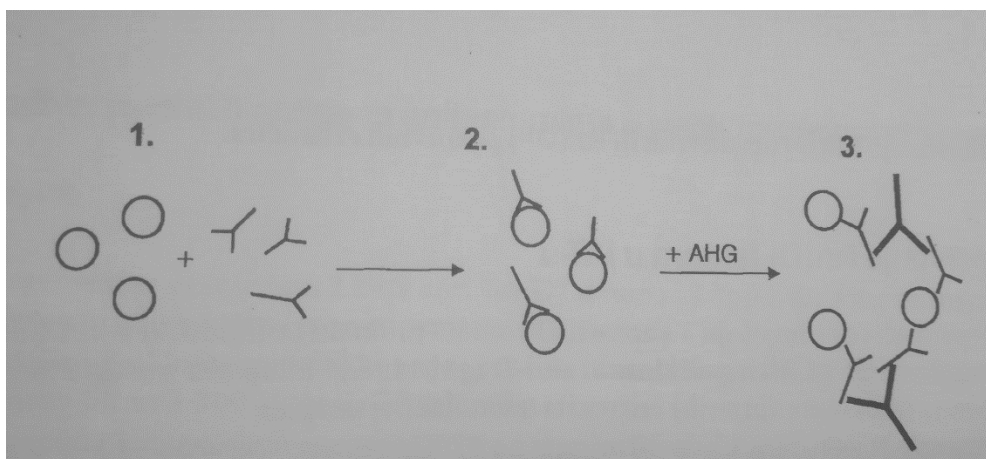
U ovom se testu ispituje reakcija ispitanikova seruma s eritrocitima krvne grupe 0, na kojima se nalaze najčešći antigeni koji uzrokuju aloimunizaciju. Test se izvodi istodobno u dvije ili tri epruvete, ovisno o broju komercijalnih testnih eritrocita koji se primjenjuju.

Izvođenje IAT-a (3)

1. u epruveti se promiješaju 2 kapi seruma ispitanika i 1 kap 3-5%-tne suspenzije testnih eritrocita;
2. nakon centrifugiranja (1000 okretaja u minuti) protresemo epruvete kako bismo ustanovili prisutnost ili odsutnost aglutinacije;
3. epruvete inkubiramo na 37°C (topla kupelj) sat i pol. Ako se u mješavinu seruma i testnih eritrocita dodaju otopine koje ubrzavaju reakciju, povećavajući afinitet vezanja protutijela s antigenima (npr. 2 kapi otopine niske ionske jakosti LISS) inkubacija se skraćuje na 15 minuta do pola sata;
4. epruvete centrifugiramo na 1000 okretaja jednu minutu i laganim protresanjem ispitamo prisutnost ili odsutnost aglutinacije;
5. doda se fiziološka otopina u omjeru 100 puta većem od volumena eritrocita i eritrociti se u njoj resuspendiraju;
6. epruveta se centrifugira na 3000 okretaja 1 minutu;
7. fiziološka otopina iznad eritrocitnog sedimenta se odlije;
8. postupak u točkama 5, 6 i 7 ponavlja se 2 puta;
9. nakon zadnjeg pranja fiziološka se otopina u potpunosti odlije;
10. u epruvetu se dodaju 2 kapi AHG-a i eritrociti se resuspendiraju laganim protresanjem epruvete;
11. epruveta se centrifugira na 1000 okretaja 1 minutu;

12. laganim protresanjem i naginjanjem epruvete naprijed-natrag ustanovi se jesu li nastali eritrocitni aglutinatti.

Kontrola: Kada nema aglutinacije, u epruvetu se doda 1 kap 3-5%-tne suspenzije eritrocita obloženih protutijelima anti-D (testni eritrociti, Coombsova kontrola). Epruveta se centrifugira na 1000 okretaja 1 minutu. Blagim protresanjem epruvete eritrociti se resuspendiraju i odredi se prisutnost aglutinacije. Ako je test dobro izveden, aglutinacija mora biti prisutna.



Slika 2. IAT (3): 1. miješanje testnih eritrocita sa serumom ispitanika

2. vezanje protutijela iz seruma na testne eritrocite (faza senzibilizacije)
3. povezivanje senzibiliziranih eritrocita u mrežu (aglutinacija) uz dodatak AHG-a

## 4. REZULTATI

Istraživanje o učestalosti antieritrocitnih protutijela u trudnica provedeno je u Centru za transfuzijsku medicinu u Splitu. Promatran je broj pozitivnih indirektnih antiglobulinskih testova među sljedećim populacijama: predoperativna bolnička populacija, trudnice na prvome testiranju u trudnoći i trudnice na kontrolnome testiranju u trudnoći. Broj pozitivnih IAT-a uspoređen je s ukupnim brojem rađenih IAT-a te je dobiven postotak pozitivnih IAT-a prema pojedinoj populaciji. Također je prikazan broj identificiranih tipova antieritrocitnih protutijela među trima navedenim populacijama. Rezultati obuhvaćaju razdoblje od početka 2014. godine do 6. svibnja 2018. godine.

Tablica 5.

Prijem	Broj pozitivnih IAT-a	Ukupno rađenih IAT-a	% pozitivnih IAT-a
Ambulanta - operacije	1217	63401	1,92
Trudnice - 1. testiranje	225	27253	0,83
Trudnice - kontrola	741	15891	4,66

Tablica 6.

Prijem	Ambulanta - operacije	Trudnice - 1. testiranje	Trudnice - kontrola
Anti-D	106	7	172
Anti-C	35	1	44
Anti-E	77	0	54
Anti-c	32	2	60
Anti-e	1	0	0
Anti-f	1	0	0
Anti-C <sup>w</sup>	12	0	6
Anti-K	113	2	26
Anti-K <sub>pa</sub>	4	0	0
Anti-Fy <sup>a</sup>	20	1	14
Anti-Fy <sup>b</sup>	3	0	3
Anti-Jk <sup>a</sup>	19	0	10
Anti-Jk <sup>b</sup>	1	0	0
Anti-Le <sup>a</sup>	67	14	78
Anti-Le <sup>b</sup>	10	8	18
Anti-S	12	4	23
Anti-M	134	21	130
Anti-N	4	0	0
Anti-P1	5	0	0
Anti-Lu <sup>a</sup>	2	0	2
Hladno ant	4	0	2
Anti-A1	1	0	0
Anti-G	6	0	0
Anti-Rh17	1	0	0



## 5. RASPRAVA

Rezultati provedenoga istraživanja pokazali su da je postotak pozitivnih IAT-a bio najveći u populaciji trudnica na kontrolnome testiranju u trudnoći. Iznosio je 4,66% u odnosu na postotak pozitivnih IAT-a u populaciji trudnica na prvome testiranju u trudnoći, koji je iznosio 0,83%. Iz toga je uočljivo da je veći broj trudnica razvio primarnu imunizaciju neposredno pred kontrolno testiranje, odnosno u trećem tromjesečju trudnoće kao posljedicu fetomaternalnih krvarenja koja se događaju tijekom cijele trudnoće. Antieritrocitna protutijela otkrivena na prvome testiranju u trudnoći, ostaju prisutna tijekom cijele trudnoće. Stoga, zaključujemo da će se identificirati na kontrolnim testiranjima što je konačno utjecalo na veći postotak pozitivnih IAT-a u populaciji trudnica na kontrolnome testiranju.

S druge strane, promatramo li postotak pozitivnih IAT-a dobiven za predoperativnu bolničku populaciju (1,92%) možemo uočiti da on nije značajno veći u odnosu na postotak pozitivnih IAT-a u populaciji trudnica na prvome testiranju u trudnoći (0,83%), iako je ukupan broj rađenih IAT-a u predoperativnoj bolničkoj populaciji dvostruko veći (63401 u odnosu na 27253). To nam potvrđuje da je praćenje Rh-imunizacije tijekom trudnoće kao i test pretraživanja antieritrocitnih protutijela od iznimne važnosti za zdravlje majke i djeteta s obzirom na pokazanu učestalost pozitivnih IAT-a.

Od klinički značajnih antieritrocitnih protutijela u populaciji trudnica najveća učestalost zabilježena je za anti-D protutijelo iz Rh sustava, dok se u predoperativnoj bolničkoj populaciji najčešće otkrivalo anti-K protutijelo iz Kell sustava. Među ostalim protutijelima iz Rh sustava najveću učestalost bilježe anti-C, anti-E i anti-c. U trudničkoj populaciji drugo klinički značajno protutijelo prema učestalosti je anti-c. Dokazano je da je upravo aloprotutijelo anti-c najčešće uzrokovalo HBFN kod RhD pozitivnih trudnica, iako nije otkrivano na prvom pretraživanju. Zbog toga je važno provesti kontrolno testiranje u 30. tjednu kod trudnica koje su bile negativne za anti-c protutijelo na prvome testiranju. (7) Osim protutijela Rh sustava koja su najznačajnija, a ujedno i najčešća u trudničkoj populaciji, među učestalijim klinički značajnim protutijelima su anti-K iz Kell sustava te anti-S iz MNS sustava krvnih grupa.

Anti-M protutijelo koje pripada skupini antieritrocitnih protutijela koja vrlo rijetko uzrokuju HBFN, bilježi dosta veliku učestalost u trudničkoj populaciji, odmah iza anti-D protutijela. Glede predoperativne bolničke populacije najveću učestalost bilježe anti-M, anti-K, anti-D, anti-E i anti-Le<sup>a</sup> protutijela. Osobito su važna anti-D i anti-K protutijela. Antigen D, kao najjači imunogen, u oko 80% RhD negativnih osoba stvorit će anti-D protutijela nakon transfuzije jedne doze RhD pozitivne krvi ili koncentrata eritrocita. Drugi prema jačini imunogenosti je Kell antigen, koji će u oko 10% osoba transfundiranih s jednom dozom Kell pozitivne krvi, stvoriti anti-K protutijela. (3) Između krvnoga pripravka i bolesnika mora postojati kompatibilnost, odnosno podnošljivost uvijek kada je bolesnik transfundiran krvnim pripravkom u kojem se nalazi više od 5 mL eritrocita ili protutijela anti-A ili anti-B. To znači da krvne grupe krvnoga pripravka i bolesnika ne trebaju biti istovjetne, ali nakon transfuzije krvi ne smije nastati reakcija između protutijela i eritrocitnih antigena i poslijetransfuzijska reakcija.

## 6. ZAKLJUČAK

Istraživanjem učestalosti antieritrocitnih protutijela u trudnica s područja Splitsko-dalmatinske županije pokazano je kako su u trudnica najčešće prisutna protutijela Rh sustava krvnih grupa. Anti-D protutijelo najčešće je klinički značajno protutijelo. Međutim, ne smije se zanemariti važnost ostalih protutijela, kako Rh sustava tako i ostalih sustava krvnih grupa, osobito onih protutijela koja dokazano uzrokuju HBFN. Imunohematološko ispitivanje trudnica obvezni je dio svake trudnoće. Kako bi se omogućili točni, precizni i reproducibilni rezultati potrebno je poštovati specifičnosti u procesnim koracima, počevši od zaprimanja zahtjeva, preko pripreme i pohrane uzoraka, testiranja uzoraka i validacije, ovjere nalaza te konačno izdavanja nalaza. Dobro vođena dokumentacija temelj je svake laboratorijske prakse, stoga je važno rezultate testiranja upisivati u za to predviđene zapise (Lista praćenja titra protutijela, Karton ispitivanja senzibilizacije u trudnoći, e-delphyn). Pored svega, najvažnije je educirati osoblje te provoditi redovite unutarnje i vanjske kontrole kvalitete kako bi se laboratorijska praksa održala na visokoj razini. Na taj način osigurana je vjerodostojnost laboratorijskih nalaza, a time ujedno i pravovremeno davanje povratne informacije korisniku usluga što konačno doprinosi očuvanju zdravlja.

## 7. LITERATURA

1. Čvorišćec D., Čepelal I.: Štrausova medicinska biokemija, Medicinska naklada, Zagreb, 2009.
2. Labar B., Hauptmann E.: Hematologija, Školska knjiga, Zagreb, 2007.
3. Grgičević D., Vuk T.: Imunohematologija i transfuzijska medicina, Medicinska naklada, Zagreb, 2000.
4. Grgičević D. i suradnici: Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi, Medicinska naklada, Zagreb, 2006.
5. Paul L. F. Giangrande: The history of blood transfusion, British Journal of Haematology, 2000.
6. Balen S.: Značaj transfuzijske medicine u kliničkoj praksi, KBC Rijeka i Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 14. znanstvena tribina, Rijeka, 2017.
7. Dajak S.: Značaj antieritrocitnih protutijela otkrivenih na kontrolnom testiranju za razvoj hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta, KBC Split i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, doktorska disertacija, Split, 2011.
8. Dajak S.: Imunohematološko testiranje trudnica, KBC Split, radna uputa, Split, 2017.
9. Starčević M., Mataija M., Sović D., Dodig J., Matijević R., Kukuruzović M.: Važnost antenatalne imunoprofilakse u prevenciji hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta, Acta Med Croatica, 65 49-54, 2011.
10. Nicolaides KH., Rodeck CH.: Maternal serum anti-D antibody concentration and assessment of rhesus isoimmunisation, BMJ., 304(6835):1155-1156., 1992.

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Transfuzijska medicina specifična je kliničko-laboratorijska i proizvodna djelatnost koja sjedinjuje medicinu, biotehnologiju, farmaciju, znanost i društvenu zajednicu u cjelini. Podaci o prvoj direktnoj transfuziji ljudske krvi vezani su uz ime Jamesa Blundella, britanskog opstretičara koji 11. prosinca 1818. izvodi prvu uspješnu transfuziju krvi o čemu izvještava Medicinsko kirurško društvo u Londonu. Na eritrocitnoj membrani smješteno je 308 različitih antigena svrstanih u 35 sustava krvnih grupa. ABO i Rh sustavi najvažniji su sustavi krvnih grupa. Antigeni iz Rh sustava krvnih grupa jaki su imunogeni, koji u osoba koje nemaju te antigene češće nego drugi antigeni potiču imunološki odgovor i stvaranje iregularnih protutijela. Rh protutijela su najčešća protutijela uzrokovana trudnoćom i transfuzijom, IgG su razreda i uzrokuju hemolitičku transfuzijsku reakciju i teške oblike hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta.

**Cilj:** Cilj rada je pokazati na primjeru učestalosti antieritrocitnih protutijela u trudnica važnost njihova određivanja za zdravlje majke i djeteta. Učestalost je prikazana uspoređivanjem pozitivnih IAT-a s ukupnim brojem rađenih testova u populacijama predoperativne bolničke populacije te trudnica na prvome testiranju u trudnoći i trudnica na kontrolnome testiranju u trudnoći. Prikazan je i broj identificiranih tipova antieritrocitnih protutijela među navedenim populacijama.

**Izvori podataka i metode:** Sve razvijene zemlje propisuju u ranoj trudnoći (10.-14. tjedan) određivanje ABO krvne grupe, RhD antigena i test pretraživanja antieritrocitnih protutijela. Testom pretraživanja u ranoj trudnoći otkrivaju se protutijela stvorena prije sadašnje trudnoće. Zbog FMK koja se događaju tijekom cijele trudnoće, negativan test pretraživanja u prvom tromjesečju može na kontrolnom testiranju u trećem tromjesečju postati pozitivan u RhD negativnih i RhD pozitivnih trudnica. Preporuke svih razvijenih zemalja propisuju za RhD negativne trudnice kontrolno pretraživanje protutijela na početku trećeg tromjesečja (28.-30. tjedna). Prema standardima i uputama transfuzijske medicine, u RH, pored navedenog kontrolnog pretraživanja protutijela u 28. tjednu trudnoće, preporuča se i pretraživanje u 34. tjednu trudnoće.

Kontrolno pretraživanje u 28. tjednu trudnoće, osim otkrivanja RhD imunizacije nastale tijekom trudnoće, u zemljama koje provode rutinsku prijenatalnu RhD-zaštitu služi i kao posljednja provjera prije primjene RhD-zaštite. Određivanje krvnih grupa ABO sustava radi se dvjema metodama, testom u epruveti i testom na pločici. Aglutinacija ili hemoliza znak su reakcije između antigena i protutijela i označuju pozitivnu reakciju. RhD krvna grupa određuje se dokazom D-antigena na eritrocitnoj membrani tehnikama na pločici i u epruveti s monoklonskim testnim reagensima ili poliklonskim testnim serumima. Test pretraživanja antieritrocitnih protutijela izvodi se u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT). Može se raditi metodom u epruveti, u mikrostupcu i u mikropločama.

**Rezultati:** Istraživanje učestalosti antieritrocitnih protutijela u trudnica provedeno je u Centru za transfuzijsku medicinu u Splitu. Rezultati obuhvaćaju razdoblje od početka 2014. godine do 6. svibnja 2018. godine. Postotak pozitivnih IAT-a u populaciji trudnica na kontrolnome testiranju iznosio je 4,66%, dok je postotak u populaciji trudnica na prvome testiranju iznosio 0,83%. Iz toga je uočljivo da je veći broj trudnica razvio primarnu imunizaciju neposredno pred kontrolno testiranje, odnosno u trećem tromjesečju trudnoće kao posljedicu FMK koja se događaju tijekom cijele trudnoće. Postotak pozitivnih IAT-a dobiven za predoperativnu bolničku populaciju (1,92%) nije značajno veći od postotka pozitivnih IAT-a u populaciji trudnica na prvome testiranju u trudnoći (0,83%), iako je ukupan broj rađenih IAT-a u predoperativnoj bolničkoj populaciji dvostruko veći (63401 u odnosu na 27253). Od klinički značajnih antieritrocitnih protutijela u populaciji trudnica najveća učestalost zabilježena je za anti-D protutijelo iz Rh sustava. Drugo klinički značajno protutijelo prema učestalosti je anti-c. Osim protutijela Rh sustava koja su najznačajnija, a ujedno i najčešća u trudničkoj populaciji, među učestalijim klinički značajnim protutijelima su anti-K iz Kell sustava te anti-S iz MNS sustava krvnih grupa.

**Zaključak:** Istraživanjem učestalosti antieritrocitnih protutijela u trudnica s područja Splitsko-dalmatinske županije pokazano je kako su u trudnica najčešće prisutna protutijela Rh sustava krvnih grupa. Anti-D protutijelo najčešće je klinički značajno protutijelo. Međutim, ne smije se zanemariti važnost ostalih protutijela, kako Rh sustava tako i ostalih sustava krvnih grupa, osobito onih protutijela koja dokazano uzrokuju HBFN. Imunohematološko ispitivanje trudnica obvezni je dio svake trudnoće. Poštovanje specifičnosti u procesnim koracima i dobro vođena dokumentacija osnova su za točne, precizne i reproducibilne rezultate.

## 9. SUMMARY

**Introduction:** Transfusion medicine is a specific clinical-laboratory and manufacturing activity that unites medicine, biotechnology, pharmacy, science and the community as a whole. Data on the first direct human blood transfusion are related to the name of James Blundell, a British narrator who performed the first successful blood transfusion on December 11, 1818 reported by the Medical Surgery Society in London. The erythrocyte membrane contains 308 different antigens classified into 35 blood group systems. ABO and Rh systems are the most important blood group systems. Blood group Rh antigens are highly immunogenic, which in people who do not have these antigens more often than other antigens stimulate the immune response and create irregular antibodies. Rh antibodies are the most common antibodies caused by pregnancy and transfusion, they are IgGs class and cause hemolytic transfusion reaction and severe forms of hemolytic disease of the fetus and newborn.

**Objective:** The aim of the study is to demonstrate the importance of anti-erythrocyte antibodies for mother and child's health in an example of their frequency in pregnant women. Frequency is presented by comparing positive IAAs with the total number of tests performed in population of preoperative hospital population, pregnant women on the first testing and pregnant women on control testing. Also, it is shown the number of identified types of anti-erythrocyte antibodies among these population.

**Data sources and methods:** All developed countries prescribe the determination of ABO blood group, RhD antigen and anti-erythrocyte antibodies search test in early pregnancy (10th -14th week). Early pregnancy tests reveal antibodies created before the present pregnancy. Due to fetomaternal bleedings occurring throughout pregnancy, a negative test in the first trimester may become positive in RhD negative and RhD positive pregnant women on the third trimester control test. The recommendations of all developed countries provide checking antibodies at the beginning of the third trimester (28th - 30th week) for RhD negative pregnant women.



In addition to the aforementioned checking antibodies in the 28th week of pregnancy, in Croatia, according to the standards and guidelines of transfusion medicine, it is also recommended to do search test in the 34th week of pregnancy. Search test in the 28th week of pregnancy is important not only for detection of RhD immunization during pregnancy, but also as the last check before RhD-protection is applied in countries carrying out routine prenatal RhD-protection. Determination of ABO blood groups is done by two methods, test in test tubes and test on the plate. Agglutination or hemolysis are the reaction between antigens and antibodies and indicate a positive reaction. Plate technique and test tube technique with monoclonal test reagent or polyclonal test serum are used to detect D-antigen on the erythrocyte membrane in the assessment of RhD blood group. Anti-erythrocyte antibodies search test is performed in an indirect antiglobulin assay (IAA). It can be done by method in tubes, microstrips and microspheres.

**Results:** Study of the frequency of anti-erythrocyte antibodies in pregnant women was conducted at the Transfusion Medicine Center in Split. The results cover the period from the beginning of 2014 to the 6th of May 2018. The percentage of positive IAAs in population of pregnant women on control testing was 4.66%, while the percentage in population of pregnant women on the first testing was 0.83%. It is evident that a greater number of pregnant women developed primary immunization before the control testing, respectively in the third trimester of pregnancy as a result of fetomaternal bleedings occurring throughout pregnancy. The percentage of positive IAAs obtained for the preoperative hospital population (1.92%) was not significantly higher than the percentage of positive IAAs in the population of pregnant women on the first testing (0.83%), although the total number of IAAs in the preoperative hospital population was twofold higher (63401 versus 27253). The highest frequency of clinically significant anti-erythrocyte antibodies in the pregnant population was observed for anti-D antibody from the Rh system. The second clinically significant antibody by frequency is anti-c. In addition to the Rh system antibodies that are the most significant and at the same time the most common in the pregnant population, among more common clinically significant antibodies are anti-K from Kell system and anti-S from MNS blood group system.

**Conclusion:** Study of anti-erythrocyte antibodies frequency in pregnant women in the region of Split has been shown that the most common antibodies are from Rh system. Anti-D antibody is the most common clinically significant antibody. However, the importance of other antibodies from Rh system or antibodies from other blood group systems, especially those antibodies that cause HDFN, should not be ignored. Immunohaematological examination is a mandatory part of each pregnancy. Abidance of specific process steps and well-run documentation are the basis for accurate, precise and reproducible results.

## **9. POPIS KRATICA**

HLA - humani leukocitni antigen

Rh - Rhesus faktor

ISBT - International Society of Blood Transfusion

PTHR - poslijetransfuzijska hemolitička reakcija

HBN - hemolitička bolest novorođenčeta

Ig - imunoglobulin

HBFN - hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta

IAT - indirektni antiglobulinski test

DAT - direktni antiglobulinski test

FMK - fetomaternalna krvarenja

RH - Republika Hrvatska

AHG - antihumani gamaglobulin

e-D - e-delphyn

LISS - otopina niske ionske jakosti (eng. low ionic strength saline)

## 10. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci

Ime i prezime	Sara Milinović
Datum rođenja	10. studenoga 1996.
Državljanstvo	Hrvatsko
Adresa	Gospa u Siti 54, 21312 Podstrana
Web adresa	sara.milinovic.sm80@gmail.com

### Školovanje

2003. - 2011.	Osnovna škola Strožanac - Podstrana
2011. - 2015.	IV. gimnazija „Marko Marulić“ - Split; Opća gimnazija
2015. - 2018.	Medicinsko laboratorijska dijagnostika; Odjel zdravstvenih studija Sveučilište u Splitu

### Osobne vještine i kompetencije

Strani jezici	Engleski jezik Talijanski jezik
Korištenje računala	Rad u operacijskom sustavu Windows, korištenje Microsoft Office paketa
Vozačka dozvola	B kategorija

### Dodatni podaci

Sudjelovanja	- Projekt Izrada standarda zanimanja/kvalifikacija uz unaprjeđenje zdravstvenih studijskih programa HR 3.1.15-0051 ("Trening socijalnih vještina") - Kongres Hrvatske komore zdravstvenih radnika, Strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku djelatnost s međunarodnim sudjelovanjem (7. - 9. lipnja 2018.)
--------------	--