LABORATORIJSKO IZVOĐENJE IMUNOHEMATOLOŠKIH TESTOVA KLASIČNO U EPRUVETI I U MIKROMETODAMA

Anđelić, Mirna

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:276965

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Mirna Anđelić

LABORATORIJSKO IZVOĐENJE IMUNOHEMATOLOŠKIH TESTOVA KLASIČNO U EPRUVETI I U MIKROMETODAMA

Završni rad

Split, 2014.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Mirna Anđelić

LABORATORIJSKO IZVOĐENJE IMUNOHEMATOLOŠKIH TESTOVA KLASIČNO U EPRUVETI I U MIKROMETODAMA

Završni rad

Mentor:

univ. mag. med. Mirela Ančić, dipl. ing. med. lab. dijag.

Split, 2014.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici univ. mag. med. Mireli Ančić na nesebičnoj pomoći, brojnim savjetima, korisnim diskusijama, te velikoj vjeri u zajednički uspjeh prilikom izrade ovoga rada.

Zahvaljujem se svojim kolegicama i kolegama na divnim trima godinama provedenim na Splitskom sveučilištu.

Najveća hvala mojoj majci i sestri, ostatku obitelji i prijateljima na ljubavi, moralnoj podršci i vjeri u moj uspjeh. Svi su mi oni bili veliki oslonac kada je bilo najpotrebnije, i bez njihova prisustva i ljubavi zasigurno uspjeh ne bi značio ovoliko.

M. A.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
   1.1. Imunohematološka ispitivanja i definicije 2
   1.2. Preuzimanje, priprema i pohranjivanje uzoraka za imunohematološka ispitivanja 4
      1.2.1. Uzorak za imunohematološko ispitivanje 4
      1.2.2. Uzimanje uzorka krvi 5
      1.2.3. Priprema, označavanje, pohrana i čuvanje uzorka 7
   1.3. Laboratorijsko testiranje 8
   1.4. Metode izvođenja imunohematoloških testova 8
2. CILJ RADA 9
3. IZVORI PODATAKA I METODE 10
   3.1. Metode imunohematološkog ispitivanja uzoraka krvi 10
      3.1.1. Postupak s uzorkom krvi ispitanika 10
   3.2. Postupak izvođenja imunohematoloških testova u epruveti 11
      3.2.1. Određivanje ABO i RhD krvnih grupa metodom u epruveti 11
      3.2.2. Pregledni testovi pretraživanja (IAT) 13
      3.2.3. Direktni antiglobulinski (coombsov) test – DAT 15
      3.2.4. Određivanje eritrocitnih antigena 16
   3.3. Izvođenje imunohematoloških testova automatskom metodom (mikrokarticama) 22
      3.3.1. Opće napomene za rad s ID-Card BIORAD mikrokarticama 23
      3.3.2. Određivanje AB0 i RhD krvne grupe metodom u mikrokartici pomoću automatskog uređaja za imunohematološku dijagnostiku Auto/Vue 24
      3.3.3. Indirektni antiglobulinski test u mikrometodi: Ortho, Diamed, Pasteur 25
      3.3.4. DAT u mikrometodi sa polispecifičnim antihumanim globulinom 31
4. REZULTATI 35
5. RASPRAVA 39
6. ZAKLJUČAK 41
7. LITERATURA 42
8. SAŽETAK 43
9. ABSTRACT 44
10. ŽIVOTOPIS 45

1. UVOD

Transfuzijska medicina dio je kliničke i laboratorijske medicine koji se bavi proizvodnjom lijekova iz ljudske krvi i liječenja bolesnika lijekovima pripravljenima iz ljudske krvi.[1]

Standardno imunohematološko ispitivanje obuhvaća ispitivanje davatelja, bolesnika, trudnica, djece i ostalih ispitanika. [2]

Rutinski ili standardni logaritam imunohematološkog ispitivanja

- ABO i RhD krvne grupe
- Pregledni testovi pretraživanja (Indirektni antiglobulinski/ Coombsov test – IAT)
- Direktni antiglobulinski test (DAT)
- Određivanje Rh fenotipa Kell antigena

Dodatni imunohematološki testovi

- Određivanje slabe varijante D antigena (RhD(D^u))
- Određivanje specifičnosti antieritrocitnih protutijela u plazmi/ serumu (Identifikacija antieritrocitnih protutijela)
- Križna reakcija
- Određivanje temperaturnog optimuma eritrocitnih antitijela
- Elucija eritrocitnih antitijela

Navedeni standardni, te dodatni imunohematološki testovi mogu se određivati klasično i automatskom metodom u analizatoru.

1.1. Imunohematološka ispitivanja i definicije

Kako bi se pravilno i točno izvodili testovi u imunohematološkim ispitivanjima, postoje pravilnici za pravilno uzorkovanje i pripremu uzorka pacijenta. Uzorak za imunohematološka testiranja je krv.

Krv je kompleksno tekuće tkivo koje čine stanice koje plivaju u plazmi, zatvorenim krvožilnim sustavom. [3]

Plazma je tekući dio krvi i sastoji se od vode, soli, ugljikohidrata, masti i više od 300 raznih proteina, od kojih su najznačajniji albumini, imunoglobulini, fibrinogen i drugi faktori zgrušavanja (transferin, ceruloplazmin, itd.) [1]

Serum je crveni ugrušak sastavljen od krvnih stanica i proteina, oko kojeg je prozirna žuta tekućina. Serum dobivamo iz krvi u koju nije dodana antikoagulantna otopina. [1]

Antikoagulantne otopine vežu kalcij koji je prijeko potreban u procesu zgrušavanja krvi, te krv uzeta u epruvetu ili vrećicu s antikoagulantnom otopinom neće se zgrušati. Najčešći antikoagulansi su Na citrat, Na oksalat, EDTA, ACD i CPD. [1]

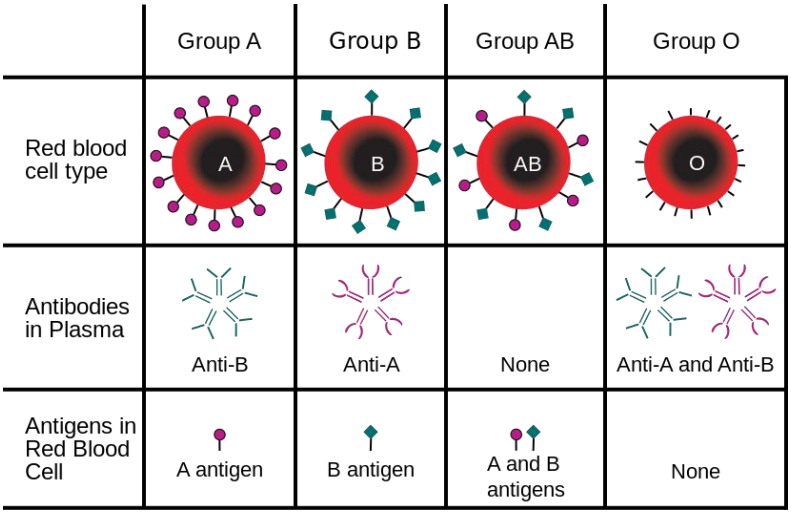
Sedimentacijom nazivamo proces kojim se teži krvni sastojci pomiču prema dnu epruvete, a lakši ostaju na vrhu. Takvo kretanje krvnih sastojaka ubrzavamo centrifugiranjem. [1]

Testove u transfuzijskoj medicini rijetko izvodimo koristeći se punom krvlju. U krvi se nalaze sve stanice i proteini. Na stanicama su stanični antigeni, a u plazmi protutijela. Na plazmatskim se proteinima također nalaze antigeni, no oni su različiti od antigena na stanicama. Kada bi se u imunohematološkim testovima koristila puna krv davatelja i bolesnika, teško bi bilo razlučiti koje su stanice ili proteini odgovorni za pozitivan rezultat reakcije. Stoga se u transfuzijskoj medicini testovi izvode u pojednostavljenim sustavima u kojima se nalazi samo jedna vrsta stanica, tj. samo eritrociti, samo trombociti ili samo leukociti, odnosno testovi se izvode samo sa serumom ili samo sa plazmom.

Aglutinacija je vidljiva pozitivna reakcija između protutijela u serumu i staničnih antigena, tj. mreža u kojoj su stanice međusobno povezane protutijelima. [1]

Liza, tj. raspadanje eritrocita je reakcija uzrokovana vezanjem protutijela za eritrocite i aktivacijom komplementa. [1]

Određivanje krvnih grupa ABO sustava izvodi se pomoću anti-A i anti-B testnih seruma. Prema aglutinaciji eritrocita s testnim serumima određuju se četiri krvne grupe: A, B, AB i 0. [1]



Slika 1. Antigeni i antitijela kao sastav pojedine krvne grupe. Preuzeto 20.07.2014.

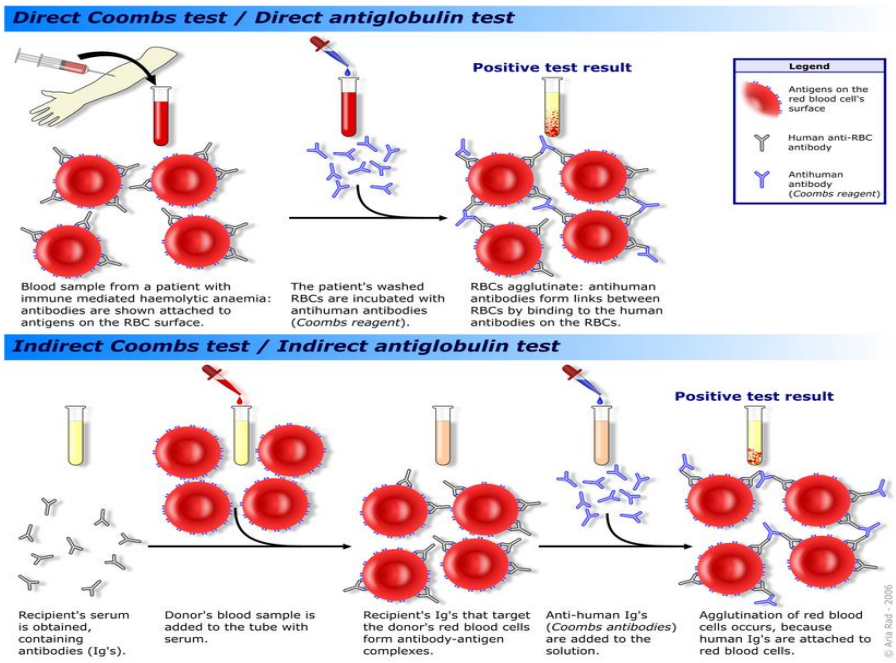
Određivanje Rh(D) krvne grupe izvodi se uz pomoć anti-D testnog seruma, koji aglutinira Rh(D) eritrocite. Pozitivna reakcija određuje da je ta osoba Rh(D) pozitivna. [1]

Titar antitijela je semikvantitativna metoda, kojom se određuje količina antitijela u serumu i aviditet antitijela. Test se primjenjuje:

- U aloimuniziranih trudnica sa ciljem:
  - Određivanja količine antitijela koja može dovesti do HBN
  - Praćenja promjene u količini antitijela uspoređujući sa prethodnim nalazom
- U rješavanju autoimunih hemolitičkih anemija
- U pacijenata s pozitivnim IAT-om, kada se žele potvrditi ili isključiti HTLA antitijela (high – titar low avidiity: Knops, Chido/Rodgers, JMH) [2]

Antiglobulinski test (Coombsov test) je osnovni test za otkrivanje antieritrocitnih protutijela. Antiglobulinskim serumom otkrivamo stanice obložene IgG protutijelima, ili komplementom. Postoje dva tipa antiglobulinskih testova:

- Direktni antiglobulinski test (**DAT**) je test u kojemu se direktno dodaju antiglobulini na ispitivane eritrocite (proces u trajanju jedne faze). Pomoću ovoga testa otkrivamo stanice koje su vezale protutijela i/ili komplement *in vivo*.
- Indirektni antiglobulinski test (**IAT**) je test u dvije faze. U prvoj se fazi inkubira serum i eritrociti, a u drugoj se dodaju antiglobulini. Pomoću ovoga testa otkrivamo protutijela i/ili komplement koji su se vezali za eritrocite *in vitro*. [2]



Slika 2. DAT i IAT ; preuzeto 04.08.2014

1.2. Preuzimanje, priprema i pohranjivanje uzoraka za imunohematološka ispitivanja

Način preuzimanja, pripreme i pohranjivanja uzoraka krvi te postupanje s nesukladnim rezultatima imunohematoloških ispitivanja. Rizik nesukladnosti mora biti smanjen na najmanju moguću mjeru.

1.2.1. Uzorak za imunohematološko ispitivanje

Imunohematološka laboratorijska ispitivanja izvode se na uzorcima krvi, eritrocita ili drugih stanica, plazmom ili serumom.

Budući da su zamjene najznačajniji uzroci grešaka i poslijetransfuzijskih reakcija, važno je poznavanje osnova laboratorijskoga rada koje počivaju na trima svojstvima:

- Točnost
- Preciznost
- Reproducibilnost

1.2.2. Uzimanje uzorka krvi

Uzorak krvi za izvođenje laboratorijskih imunohematoloških ispitivanja uzima se u epruvetu s antikoagulantnom otopinom ili bez nje. Laboratorijsko se ispitivanje može raditi u uzorku krvi, plazme ili seruma, zavisno o traženom testu. Uzorak mora biti dovoljan za izvođenje svih pretraga koje se traže (obično 5-10 mL krvi, plazme ili seruma).

Prilikom uzorkovanja treba obratiti pozornost na nekoliko čimbenika koji utječu na rezultat pretrage:

- Učinak vremena uzimanja krvi
- Učinak prehrane
- Farmakološki aktivnih tvari i lijekova
- Položaja tijela
- Fizičkog napora
- Terapeutskih i drugih postupaka [8]

Danas postoje posebne epruvete u kojima postoji negativan tlak, sa raznim bojama čepova. U njih se uzima točno određeni volumen krvi, a prema boji čepa se razlikuju epruvete sa i bez antikoagulantne otopine.

Redoslijed i boja čepa	Dodatak	Pretrage	Broj okretanja
1.	Bujonska podloga	Hemokultura (mikrobiologija)	5-10
2. Svijetlo plava	3,2 % Na citrat	Koagulacija*	3-4
3. Crna	3,2 % Na citrat (4:1)	Sedimentacija eritrocita	3-4
4. Crvena	Inaktivna smola, aktivator zgrušavanja	Biokemijske (rutinske), serološke	5-10
5. Zelena	Li -heparinat	Biokemijske (hitne)	5-10
6. Ljubičasta	K_3 EDTA	Hematološke, molekularna dijagnostika, alergeni (CAST-Elisa), imunofenotipizacija	8-10
7. Siva	Na-fluorid i K-oksalat	Glukoza (OGTT), laktat	5-10

Tablica 1. Epruvete prema boji čepa s obzirom na antikoagulantnu otopinu koju sadrže. Preuzeto: 14.08.2014. [7]

Ako ćemo potrebno testiranje raditi iz uzorka seruma, tada krv mora biti uzeta u epruvetu bez antikoagulantne otopine, tj. u epruvetu sa crvenim čepom. Prednost ovakvoga uzorkovanja jest to što će u njemu biti sačuvana aktivnost komplementa, a nedostaci formiranje malih fibrinskih ugrušaka u koje se mogu uhvatiti eritrociti i tako dati lažno pozitivan rezultat.

Kada testiranje radimo iz uzorka plazme, krv se uzima u epruvetu s antikoagulantnom otopinom s obzirom na to kakvu pretragu želimo raditi. Antikoagulantne otopine koje se nalaze na stjenkama epruveta su EDTA(K3) u epruveti sa ljubičastim čepom. Prednost ovakvog uzorkovanja jest da je uzorak odmah spreman za testiranje.

Slika 3. Epruveta s ljubičastim čepom, antikoagulantna otopina EDTA(K3). Preuzeto 20.07.2014.

1.2.3. Priprema, označavanje, pohrana i čuvanje uzorka

Uzorci, nakon što su zaprimljeni, ili izvađeni u laboratoriju, trebaju biti centrifugirani. Krv se za imunohematološka ispitivanja centrifugira na 3000 okretaja, 2 minute. [2] Nakon centrifugiranja, uzorci se pregledavaju i s nesukladnima se postupa prema protokolu. Nesukladni uzorci su oni koji su lipemični ili hemolitični, oni u kojima su vidljivi ugrušci, te uzorci koji su nepravilno označeni.

Svaka epruveta za uzorak krvi mora biti propisana od transfuzijske jedinice, te označena tijekom uzimanja uzorka krvi, uz bolesnika. Podatci koje mora sadržavati svaka naljepnica na epruveti za uzorak su:

- datum uzimanja uzorka krvi,
- ime ustanove, organizacijska jedinica, odjel
- bolesnikovo ime i prezime, za bolesnika nepoznata identiteta – inicijali (NN, XY, KT)
- JMBG ili identifikacijski broj bolesnika, bolnički matični broj [1]

Kada imunohematološko ispitivanje nije moguće napraviti odmah, te uzorak treba pohraniti i čuvati, treba se držati strogo propisanih protokola.

Uzorak krvi čuva se na +4°C i ne smije biti stariji od 72 sata kada bolesnik nije bio transfundiran ili žena nije bila trudna u posljednja tri mjeseca. Uzorak krvi bolesnika koji je bio transfundiran ili žene koja je bila trudna u posljednja tri mjeseca ne smije biti stariji od 48 sati, odnosno ne smije biti stariji od 24 sata kada je bolesnik bio transfundiran u posljednjih 30 dana.

Uzorci s kojima je izvršeno testiranje također se pohranjuju, i to na sljedeći način:

- Uzorak neimuniziranih ispitanika (eritrociti, serum/plazma) pohranjuje se na +4°C u predviđena skladišna mjesta, te se nakon 7 dana odnosi u praonu na daljnju obradu
- Uzorak imuniziranih ispitanika:
  - Eritrociti se pohranjuju na +4°C u predviđena skladišna mjesta
  - Serum/plazma se zamrzavaju na -20°C u zamrzivaču German 47, u kivete, pa u kutije „bolesnici“, „trudnice“ po abecedi

Podatke eritrocita, te seruma/plazme imuniziranih ispitanika treba ažurirati u OB-125 registru imuniziranih. [2]

1.3. Laboratorijsko testiranje

Laboratorijski se testovi danas mogu izvoditi na više načina, s obzirom na to kolika je hitnost, točnost i preciznost potrebna prilikom izdavanja nalaza. Izvođenje testova moguće je raditi pojedinačno ili serijski, odnosno ručno, poluautomatski i potpuno automatski.

Prilikom rada u laboratoriju, bilo da se radi o ručnom ili automatiziranom izvođenju testova, važno je:

- Poštivati protokole i upute proizvođača reagencija i analizatora. Protokoli i radne upute nalaze se uz svaki aparat, na svakome radnom mjestu.
- Reagencije s kojima se provodi laboratorijsko testiranje moraju biti unutar roka upotrebe i moraju se pravilno skladištiti.
- Prije početka upotrebe, potrebno je provjeriti jesmo li uzeli točne reagencije, te odgovaraju li deklaraciji (naziv, serijski broj, datum isteka roka upotrebe) kako ne bi došlo do neželjenih pogrešaka.
- U svakom laboratorijskom testiranju moraju se koristiti kontrolni uzorci kojima se provjerava je li testiranje dobro izvedeno.
  Kontrolni uzorci jesu uzorci krvi poznatog sadržaja, odnosno rezultata testiranja. Rezultati rada s kontrolnim uzorcima moraju dati očekivane rezultate – pozitivne ili negativne.
- Sav pribor koji se rabi prilikom izvođenja testova mora biti čist, baždaren i dokazano ispravan.

1.4. Metode izvođenja imunohematoloških testova

Metode korištene prilikom izvođenja rada:

- Klasična metoda ispitivanja u epruveti
- Automatsko ispitivanje u mikrokarticama uz pomoć Ortho Auto Vue™ Innova analizatora.

Pravilna izvođenja ovih metoda detaljno su opisana u radnim uputama, pod nazivom „Metode imunohematološkog ispitivanja uzoraka krvi“.

2. CILJ RADA

Cilj rada:

- Usporediti dvije metode izvođenja imunohematoloških testova

Metode:

- Klasična metoda ispitivanja u epruveti
- Automatsko ispitivanje uz pomoć Ortho Auto Vue™ Innova analizatora.

Dosadašnja su istraživanja pokazala da su analizatori uvelike pridonijeli skraćivanju vremena izdavanja nalaza, te da su olakšali rad u laboratorijima, s jednakom, ili većom preciznošću i točnošću, od ručnih metoda.

Svrha ovoga rada je potvrditi te hipoteze kod imunohematoloških testiranja u transfuzijskoj medicini.

3. IZVORI PODATAKA I METODE

3.1. Metode imunohematološkog ispitivanja uzoraka krvi

Prije samoga izvođenja imunohematoloških testova, potrebno je pripremiti uzorak ispitanika za testiranje, te pripremiti 4% suspenziju eritrocita. Tako pripremljeni testni eritrociti mogu se upotrebljavati tijekom jednog radnog dana (24 sata) isključivo ako su do upotrebe pohranjeni u hladnjaku na 4°C.

3.1.1. Postupak s uzorkom krvi ispitanika

- Plastičnu epruvetu obilježite barkodom ispitanika te imenom i prezimenom ispitanika, odnosno prezimenom i matičnim brojem novorođenčeta.
- Epruvetu s uzorkom krvi ispitanika centrifugirajte na 3000 okretaja 2 minute. Postupak ponavljajte dok serum (plazma) nisu potpuno odvojeni od eritrocita.
- Kada su potpuno odvojeni plastičnom pipetom prenesite serum (plazmu) u obilježenu epruvetu.
- Eritrocite s kojih je skinuta plazma ispitanika (40-50% suspenzija eritrocita) zovemo koncentrirani eritrociti.

Priprema 4% suspenzije eritrocita

- U plastičnu epruvetu mikropipetom stavite 480 µl fiziološke otopine i 20 µl koncentriranih eritrocita
- Mikropipetom resuspendirajte sadržaj epruvete višekratnim uvlačenjem i istiskivanjem suspenzije. Dobili ste 4% suspenziju eritrocita u fiziološkoj otopini.
- Količinu pripremite po potrebi.
- Za testne eritrocite A1, B i O na 3 plastične epruvete redom napišite A1, B i O.

Napomena:

- Ovako pripremljeni testni eritrociti mogu se upotrebljavati tijekom jednog radnog dana (24 h) isključivo ako su do upotrebe pohranjeni u hladnjaku na 4°C.

3.2. Postupak izvođenja imunohematoloških testova u epruveti

Metode imunohematološkog ispitivanja uzoraka krvi

Prije samoga izvođenja imunohematoloških testova, potrebno je pripremiti uzorak ispitanika za testiranje, te pripremiti 4% suspenziju eritrocita. Tako pripremljeni testni eritrociti mogu se upotrebljavati tijekom jednog radnog dana (24 sata) isključivo ako su do upotrebe pohranjeni u hladnjaku na 4°C.

3.2.1. Određivanje ABO 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 reagencije slijedećim redom: u prvu epruvetu 2 kapi anti-A, u drugu 2 kapi anti-B, u treću 2 kapi anti-A,B test reagencije.
- U četvrtu, petu i šestu epruvetu ukapajte po 1 kap 4% suspenzije testnih eritrocita sljedećim redom: u četvrtu epruvetu 1 kap suspenzije A_1, u petu epruvetu kap suspenzije B, u šestu epruvetu 1 kap suspenzije O eritrocita.
- U sedmu epruvetu ukapajte 2 kapi anti-D test reagencije, 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 reagencijama je pozitivan rezultat.
- Aglutinacija A_1 i/ili B testnih eritrocita s ispitivanim serumom je pozitivan rezultat.

RhD

- Aglutinacija s anti-D testnom reagencijom i nedostatak aglutinacije s Rh negativnom kontrolom je pozitivan rezultat. Eritrociti su RhD pozitivni.
- Nedostatak aglutinacije s anti-D reagencijom 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 reagencije).

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.

3.2.2. Pregledni testovi pretraživanja (IAT)

Indirektni antiglobulinski test (IAT) koristi se za ispitivanje prisutnosti antieritrocitnih protutijela u serumu/plazmi/eluatu ispitanika.

Napomena:

- IAT se izvodi u staklenim epruvetama.
- Ukoliko nadležni liječnik ne odluči drugačije u radu se mora koristiti isključivo serum ispitanika.
- Prije početka rada obavezno pročitajte i pridržavajte se uputa proizvođača testnih eritrocita.
- Strogo se pridržavajte roka valjanosti testnih reagencija.
- Uz svaku seriju testnih eritrocita priložen je antigram s antigenim sastavom eritrocita u toj seriji.

a. IAT u fiziološkom mediju

Tehnika rada:

- 2 staklene epruvete obilježite imenom i prezimenom ispitanika i s P1 i P2.
- Stavite u stalak.
- U svaku epruvetu stavite dvije kapi seruma ispitanika.
- U epruvetu obilježenu s P1 dodajte 1 kap suspenzije test eritrocita iz bočice 1.
- U epruvetu obilježenu s P2 dodajte 1 kap suspenzije test eritrocita iz bočice 2.
- Blagim protresanjem resuspendirajte eritrocite i serum.
- Inkubirajte epruvete na sobnoj temperaturi 5 minuta.
- Nakon inkubacije epruvete centrifugirajte na 1000 okretaja 1 minutu.
- Lagano protresite epruvete. Aglutinoskopom ustanovite prisutnost hemolize i/ili aglutinacije. Zabilježite rezultat.
- Epruvete stavite u automatsku peračicu i uključite program za pranje.

- Nakon pranja izvadite epruvete i dodajte 2 kapi polispecifičnog AHG-a. Resuspendirajte sadržaj.
- Epruvete centrifugirajte na 1000 okretaja 1 minutu.
- Po završenom centrifugiranju lagano protresite epruvete. Aglutinoskopom ustanovite prisutnost hemolize i/ili aglutinacije. Zabilježite rezultat.
- U epruvetu i/ili epruvete u kojima nije prisutna aglutinacija/hemoliza (rezultat ispitivanja negativan) dodajte 1 kap Coombs kontrole (stavljanje Coombs kontrole).
- Nakon centrifugiranja na 1000 okretaja tijekom 1 minute lagano protresite epruvete. Aglutinoskopom ustanovite prisutnost hemolize i/ili aglutinacije. Zabilježite rezultate.
- Prisutna aglutinacija s Coombs kontrolom potvrđuje dobro izveden test.

Upozorenje: ako nakon dodavanja Coombs kontrole nema pozitivne reakcije (prisutna aglutinacija) IAT se mora ponoviti.

Ručno pranje eritrocita:

Ako eritrocite ne možemo prati u automatskoj peračici peremo ih ručno:

- Na suspenziju seruma i eritrocita dodajte fiziološku otopinu tako da epruveta bude puna. Epruvetu centrifugirajte na 3000 okretaja 2 minute i uklonite supernatantnu otopinu.
- Postupak izvedite ukupno 3 puta.
- Nakon zadnjeg pranja u potpunosti otpipetirajte supernatantnu otopinu.
- Dodajte 2 kapi polispecifičnog AHG reagensa. Eritrocite resuspendirajte u AHG-u laganim protresanjem epruvete.
- Epruvete centrifugirajte na 1000 okretaja tijekom 1 minute.
- Lagano protresite epruvete. Aglutinoskopom ustanovite prisutnost hemolize i/ili aglutinacije. Zabilježite rezultat.
- Daljnji postupak identičan je s prethodno opisanim završnim postupkom izvođenja IAT-a u fiziološkom mediju (vidi stavljanje Coombs kontrole).

b. IAT u niskoionskom mediju

Tehnika rada:

Ista kao u **3.3.2.1.**, samo nakon očitavanja rezultata nakon inkubacije na sobnoj temperaturi, u svaku epruvetu dodajte po 2 kapi niskoionske otopine LISS i inkubirajte na 37°C 30 minuta.

Očitavanje rezultata:

- Aglutinacija i/ili hemoliza u jednoj ili obje epruvete nakon inkubacije na sobnoj temperaturi i/ili inkubacije na 37°C je pozitivan rezultat.
- IAT je pozitivan ako je aglutinacija prisutna nakon dodavanja AHG test reagencije.
- IAT je negativan ako aglutinacija nije prisutna niti u jednoj epruveti nakon dodavanja AHG test reagencije.

3.2.3. Direktni antiglobulinski (coombsov) test – DAT

Direktni antiglobulinski test – DAT koristi se za otkrivanje prisutnosti antieritrocitnih protutijela vezanih na eritrocite ispitanika.

Napomena:

- Ukoliko nadležni liječnik ne odluči drugačije u radu se koriste isključivo eritrociti iz uzorka krvi uzetog na EDTA antikoagulans.
- DAT se izvodi u plastičnim epruvetama

Tehnika rada:

- U epruvetu kapnite dvije kapi 4% suspenzije eritrocita u fiziološkoj otopini.
- Epruvetu stavite u automatsku peračicu i uključite program za pranje.
- Nakon pranja izvadite epruvetu i dodajte 2 kapi polispecifičnog AHG-a. Resuspendirajte sadržaj.
- Epruvete centrifugirajte na 1000 okretaja 1 minutu.
- Lagano protresite epruvetu. Aglutinoskopom ustanovite prisutnost hemolize i/ili aglutinacije. Zabilježite rezultat.
- Prisutna aglutinacija s Coombsovom kontrolom potvrđuje dobro izveden test.

Upozorenje: ako nakon dodane Coombs kontrole nema pozitivne reakcije (prisutna aglutinacija) DAT se mora ponoviti.

Važno:

- Ako eritrocite ne možemo prati u automatskoj peračici, peremo ih ručno. (vidi Ručno pranje eritrocita u točki 2.1.1.)

3.2.4. Određivanje eritrocitnih antigena

Definicija

Određivanje eritrocitnih antigena je imunohematološka metoda kojom se na osnovu reakcije između eritrocitnih antigena na eritrocitima ispitanika i antieritrocitnih protutijela u testnim reagencijama/serumima određuju eritrocitni antigeni prisutni na eritrocitima ispitanika.

Određivanje eritrocitnih antigena vrši se iz uzoraka krvi uzetih na EDTA antikoagulans:

- Na eritrocitima dobrovoljnih davatelja krvi koji su predviđeni za „pool tipiranih davatelja“. U ovom slučaju određuju se antigeni sljedećih krvnogrupnih sustava: Rhesus (C, E, c, e) i Kell.
- Na eritrocitima trudnica, djece i bolesnika kojima su u cirkulaciji dokazana antieritrocitna protutijela vrši se određivanje eritrocitnog antigena na koje su razvili antieritrocitna protutijela
- Na eritrocitima doza krvi koje su namijenjene za transfuziju bolesnika s dokazanim antieritrocitnim protutijelima vrši se tipiranje samo onih antigena na koje je bolesnik razvio antieritrocitno protutijelo.

Pribor i materijali

Uzorak krvi

- Uzorak ispitanika uzet na antikoagulans EDTA ili CPD (bolje je testirati što svježiji uzorak). Dopustivo je određivanje antigena iz EDTA uzorka do 14 dana, a iz uzorka doze do isteka roka valjanosti.

Reagensi

- Specifični serum ili reagencija: anti-C, anti-E, anti-c, anti-e, anti-CDE, anti-K, anti-k, anti-M, anti-N, anti-S, anti-s, anti-Jk^a, anti-Jk^b, anti-Fy^a, anti-Fy^b, anti-Le^a, anti-Le^b, anti-P_1.
- AHG
- Fiziološka otopina

Pribor

- Staklene ili plastične epruvete
- Pipete
- Stalak za epruvete

Oprema

- Centrifuga za epruvete
- Stakalce i izvor topline (rezognost)

Opis aktivnosti

Prije početka tipiranja potrebno je provjeriti način određivanja eritrocitnih antigena iz priložene upute specifičnog seruma ili reagencije.

Anti-C (klon MS 24), Anti-E (klon C2), Anti-c (klon MS 42) BioClone-ORTHO

Anti-E, monoklonal IgM – human (kon MS 258/906) anti-e (MS-16; MS-21) ORTHO,

Anti – C* monoklonal IgM (MS – 110) OrthoClone

Anti – C, Anti – e, Anti – c, Anti – E, Anti – CDE, MONOGnost reagencije - BIOGNOST

<u>Određivanje u epruveti:</u>

- Pripremiti 3-5% suspenziju eritrocita (eritrociti se mogu 3 puta oprati)
- U svaku epruvetu kapnuti po 1 kap (50 μ) reagencije
- Dodati po 1 kap suspenzije eritrocita
- Dobro promiješati i centrifugirati 1000 rpm 1 min (100-140 ref)
- Nježnim protresanjem potpuno resuspendirati i makroskopski odrediti prisustvo aglutinacije
- Negativne i nejasne rezultate inkubirati na sobnoj temperaturi 15 min i ponoviti centirfugiranje

Anti-C^W (humani) Dominion Biologicals Limited

Određivanje u epruveti:

- Pripremiti 3-5% suspenziju eritrocita
- U epruvetu kapnuti 1 kap (50 µl) reagencije
- Dodati po 1 kap suspenzije eritrocita
- Dobro promiješati i centrifugirati na 3400 rpm 30 sec. (900-1000 ref.)
- Nježnim protresanjem potpuno resuspendirati i makroskopski odrediti prisustvo aglutinacije
- Negativne i nejasne rezultate inkubirati 15 – 30 min na 37°C i ponoviti centrifugiranje

Anti-K (anti – Kell) (klon MS 56) **BioClone ORTHO**

Anti-k (anti – Kell) (klon MS 56) MONO**Gnost Biognost**

Određivanje u epruveti:

- pripremiti 3-5% suspenziju eritrocita
- pripremiti pozitivnu kontrolu (heterozigot Kk) i neg. kontrolu
- u svaku epruvetu kapnuti po 1 kap (50 µl) reagencije
- dodati po 1 kap suspenzije eritrocita
- dobro promiješati i inkubirati na sobnoj temperaturi minimalno 5 minuta

Inkubacija se može produžiti na maksimalno 30 min

- centrifugirati na 1000 rpm 1 min (100-140 ref)
- nježnim protresanjem potpuno resuspendirati i makroskopski odrediti prisustvo aglutinacije

Anti – k (anti – cellano), Anti – Fy^a, Anti – Fy^b, Anti – s polyclonal IgG – human **ORTHO**

Određivanje u epruveti:

- Pripremiti 3-5% suspenziju eritrocita ispitanika
- U epruvetu kapnuti 1 kap (50 µl) reagencije

- Dodati po 1 kap suspenzije eritrocita
- Dobro promiješati i inkubirati na 37°C 15 min
- Nakon inkubacije oprati eritrocite 3 puta, kompletno dekantirati nakon zadnjeg pranja
- Dodati dvije kapi AHG ili anti IgG
- Centrifugirati na 1000 rpm 1 min (100 – 140 ref)
- Nježnim protresanjem potpuno resuspendirati i makroskopski odrediti prisustvo aglutinacije
- Kontrolirati sve negativne rezultate Coombs pozitivnom kontrolom
- Antigen je pozitivan ako je prisutna aglutinacija i ako je direktni Coombs ispitanika u epruveti negativan

Anti – M (klon M1-2F11, 11H2), **Anti – N** (klon N14, MN879),

Anti – S (MS-94) **Monoclonal Igm OrthoClone**

Određivanje u epruveti:

- Pripremiti 3-5% suspenziju eritrocita ispitanika
- U svaku epruvetu kapnuti 1 kap (50 µl) reagencije
- Dodati po 1 kap suspenzije eritrocita
- Dobro promiješati, centrifugirati Anti – M i Anti – N na 1000 rpm 1 minutu (100 – 150 ref), a Anti – S na 2000 rpm 1 min
- Nježnim protresanjem potpuno resuspendirati i makroskopski odrediti prisustvo aglutinacije
- Negativne i nejasne rezultate inkubirati 15 min na sobnoj tempreraturi i ponoviti centrifugiranje

Za svako testiranje je preporučljivo izvesti pozitivnu (heterozigot za ispitivani antigen) i negativnu kontrolu.

Anti - Jk^a (klon MS-15), **Anti – Jk^b** (klon MS-8) **Monoklonal IgM OrthoClone**

Određivanje u epruveti:

- Pripremiti 3-5% suspenziju eritrocita ispitanika
- U svaku epruvetu kapnuti 1 kap (50 µl) reagencije
- Dodati po 1 kap suspenzije eritrocita
- Dobro promiješati i inkubirati na sobnoj temperaturi od 5 – 30 min
- Centrifugirati na 2000 rpm 1 minutu (600-800 ref)
- Nježnim protresanjem potpuno resuspendirati i makroskopski odrediti prisustvo aglutinacije
- Negativne i nejasne rezultate inkubirati daljnjih 15 min na sobnoj temperaturi i ponoviti centrifugiranje

Za svako testiranje je preporučljivo izvesti pozitivnu (heterozigot za ispitivani antigen) i negativnu kontrolu.

Anti – Le^a (klon 17A5G8), **Anti – Le^b** (klon 4C47) **Monoclonal BioClone 2.0 ORTHO**

Određivanje u epruveti:

- Pripremiti 3-5% suspenziju eritrocita. Eritrocite treba jednom oprati
- U epruvetu kapnuti 1 kap (50 µl) reagencije
- Dodati po jednu kap suspenzije eritrocita
- Inkubirati 5-10 min na sobnoj temperaturi
- Centrifugirati na 1000 rpm 1 minutu (100-125 ref)
- Nježnim protresanjem potpuno resuspendirati i makroskopski odrediti prisustvo aglutinacije
- Negativne i nejasne rezultate inkubirati 15-30 min na 37° i ponoviti centrifugiranje

Anti – P$_1$ (klon 650) **Moniklonal IgM OrthoClone ORTHO**

Određivanje u epruveti:

- Pripremiti 3-5% suspenziju eritrocita. Eritrocite treba jednom oprati

- U epruvetu kapnuti 1 kap (50 µl) reagencije
- Dodati po jednu kap suspenzije eritrocita
- Inkubirati 15 min na sobnoj temperaturi
- Centrifugirati na 2000 rpm 1 minutu (600-800 ref)
- Nježnim protresanjem potpuno resuspendirati i makroskopski odrediti prisustvo aglutinacije

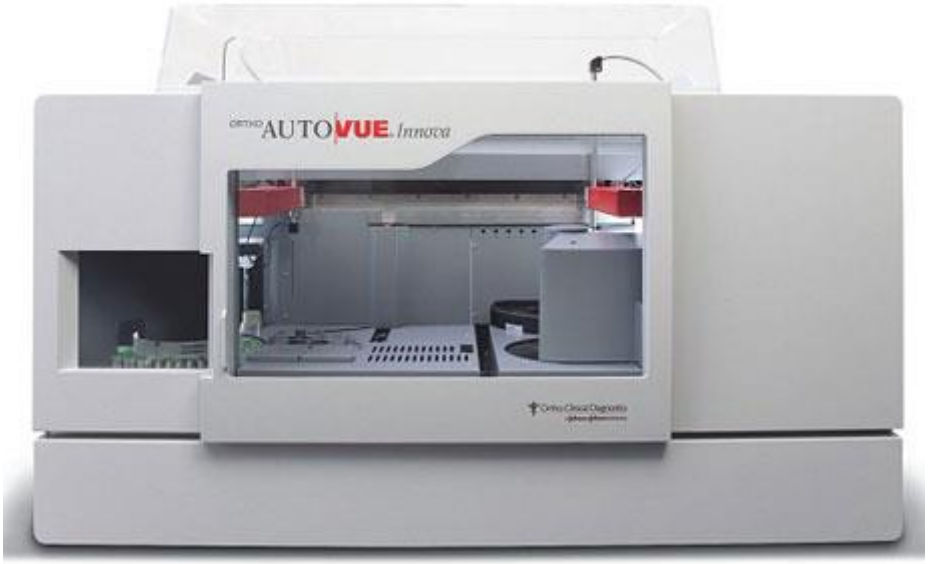
Napomene

- Tijekom određivanja eritrocitnih antigena za svaku seriju određivanja uvijek izdvojiti pozitivnu i negativnu kontrolu. Za pozitivnu kontrolu uvijek se moraju koristiti testni eritrociti koji na membrani imaju samo jedan antigen koji se određuje (heterozigot). Za negativnu kontrolu koriste se testni eritrociti koji na eritrocitnoj membrani nemaju antigen koji se određuje.
- Eritrociti mogu imati slabiju reaktivnost zbog starenja tj. oštećenja antigena. Posebno za antigene krvnih grupa: Lewis, Kidd, Duffy, MNS
- Eritrociti obloženi alo ili autoantitijelima iste ili slične specifičnosti kao reagencija mogu davati oslabljenu reakciju. U ekstremnim slučajevima može biti lažno negativan rezultat.
- Ako se testiranje izvodi drugom metodom nego je predviđeno radnom uputom, metoda mora biti validirana
- Jače taloženje i zamućenje test reagenasa vjerojatno je posljedica biološke kontaminacije. Takav reagens nije za uporabu.

3.3. Izvođenje imunohematoloških testova automatskom metodom (mikrokarticama)

Naziv „automatizacija“ u laboratorijskoj se medicini rabi za opisivanje procesa u kojem jedan ili više laboratorijskih analizatora izrađuje velik broj analiza uz minimalno sudjelovanje laboratorijskog osoblja.
Primjena automatizacije u laboratorijima počela je pedesetih godina prošloga stoljeća, a prethodila joj je „poluautomatizacija“ koja podrazumijeva mehaniziranje pojedinih radnji pri ručnoj izradbi laboratorijskih analiza. [4]

Analizator na kojemu se izvodi većina spomenutih imunohematoloških testiranja naziva se Ortho Auto Vue ^{TM} Innova.



Slika 4. Ortho AutoVue ^{TM} Innova, izgled aparata. Preuzeto 19.07.2014.

Slika 5. Izgled mikrokartica. Preuzeto 20.07.2014.

3.3.1. Opće napomene za rad s ID-Card BIORAD mikrokarticama

- Diluent 2 se prije uporabe mora zagrijati na sobnu temperaturu
- Prije rada sa DiaMed mikrokarticama potrebno je:
    - Provjeriti nivo tekućine u jažicama mikrokartica. Ukoliko je on blizu gela, mikrokartica se ne smije upotrijebiti.
    - Provjeriti da li u stupcima ima formaciju u obliku mjehurića zraka. Ukoliko ih ima takva jažica se ne smije koristiti u radu.
- Prije upotrebe mikrokartica za manualni rad potrebno je propisno označiti mikrokartice (prezime i ime bolesnika na obje mikrokartice i oznake A1, B i O na karticu za eritrotest, odnosno prezime i matični broj novorođenčeta na mikrokarticu za novorođenčad)
- Otvorene jažice koriste se odmah po skidanju alufolije. Mikrokartice s čijih jažica ije skinuta alufolija mogu poslužiti za druga ispitivanja unutar roka upotrebe mikrokartice.
- Plastične nastavke za mikropipete morate mijenjati nakon svakog ukapavanja suspenzije eritrocita i/ili seruma/plazme.

Upozorenje:

- Ukoliko je tijekom ukapavanja došlo do spajanja sadržaja iz inkubacijske komorice s tekućinom u jažici zabranjeno je nastaviti postupak izvođenja testa.
- Potrebno je križićem označiti nesukladnu jažicu.
- Postupak obilježavanja i ukapavanja istog sadržaja mora se izvršiti u novoj jažici.

Očitavanje rezultata:

- Mikrokartice postavite tako da izvor svjetla dolazi sa stražnje strane mikrokartice koja je okrenuta prema bijeloj pozadini.
- Rezultati ispitivanja se čitaju promatranjem prisustva aglutinacije s prednje i stražnje strane jažice

3.3.2. Određivanje AB0 i RhD krvne grupe metodom u mikrokartici pomoću automatskog uređaja za imunohematološku dijagnostiku Auto/Vue

- Za određivanje krvne grupe u mikrokartici potrebno je:
  - Pripremiti 3-4% suspenziju eritrocita: 250 µl fiziološke otopine i 10 µl gustih eritrocita
  - Uzeti mikrokarticu ABO-DD, pregledati je da nema oštećenja, mjehurića u gelu te da je dovoljan nivo reagensa iznad kuglica
  - Obilježiti karticu prezimenom pacijenta ili identifikacijskim brojem
  - Ukapati 10 µl 3-4% suspenzije ispitivanih eritrocita
  - Centrifugirati karticu 5 min u centrifugi Ortho BioVue
  - Očitati rezultat

- Interpretacija ABO krvne grupe i RhD antigena u mikrokartici

ABO krvna grupa se interpretira u 1., 2., 3., i 6. stupcu mikrokartice na sljedeći način:

- Reaktivnost je 3 ili 4+, kontrola je negativna, REZULTAT JE POZITIVAN
- Reaktivnost je 1 ili 2+, kontrola je negativna, potrebno je krvnu grupu analizirati testom u epruveti (hemotest i eritrotest). Liječnik na osnovu rezultata epruvete, pločice i mikrokartice proglašava nalaz krvne grupe.
- ABO reaktivnost je negativna, kontrola je negativna, REZULTAT JE NEGATIVAN

RhD antigen se interpretira u 4., 5., i 6. stupcu na sljedeći način:

- Reaktivnost je u oba stupca 4+, kontrola je negativna, REZULTAT JE POZITIVAN
- Reaktivnost je u jednom ili oba stupca manja od 4+, kontrola je negativna, RhD antigen treba interpretirati na osnovi dodatne analize RhD, prema uputi RU-OiH 21
- Reaktivnost je u oba stupca negativna, kontrola je negativna, REZULTAT JE NEGATIVAN

3.3.3. 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.

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 μL
- 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 reagensa/test stanica/seruma ili plazme u mikrostupac

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

- 50 μL LISS otopine
- 10 μL suspenzije eritrocita
- 40 μL 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 prezervativ, 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 μL i 50 μL
- 0,8 % suspenzija eritrocita. 0,8 % suspenzija eritrocita se pripravlja iz:
    - 3-5% suspenzije eritrocita tako da se u epruvetu ukapaju 2 kapi (100 μL) 3-5% suspenzije eritrocita, centrifugira se na 2500 okr/min 3 min, dekantira se i doda 500 μL ID-Diluenta 2. Ovako pripremljena suspenzija može se koristiti 24 h.
    - 0,8% suspenzija eritrocita iz pune krvi pripravlja se tako da u 1 mL ID-Diluenta2 doda 10 μL koncetriranih eritrocita.
    - 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 prezervativ. 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 μL
- ScanLiss
- 0,8 % suspenzija eritrocita. 0,8 % suspenzija eritrocita se pripravlja iz:
    - 3-5% suspenzije eritrocita tako da se u epruvetu ukapaju 2 kapi (100 μL) 3-5% suspenzije eritrocita, centrifugira se na 2500 okr/min 3 min, dekantira se i doda 500 μL ScanLiss. Ovako pripremljena suspenzija može se koristiti 24 h.
    - 0,8% suspenzija eritrocita iz pune krvi pripravlja se tako da u 1 ml ScanLiss doda 10 μL koncetriranih 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 μL pripremljene suspenzije eritrocita u odgovarajuću komoricu.
- Pipetirati 25 μL 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 2. Opis pojedinih stupnjeva aglutinacije u mikrokartici (IAT)

Zapisi

U imunohematološkom 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

3.3.4. 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 μL
- Ortho BioVue centrifuga
- Uzorak ispitivane krvi uzet u epruvetu s antikoagulansom EDTA

Opis aktivnosti:

- Pripremiti 3-5% suspenziju eritrocita u fiziološkoj otopini (u 240 μL fiziološke dodati 10 μL 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 μL 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 µL 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 µL 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 µL 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 µL 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:

Jačina aglutinacije	**Opis**
+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. (miješana aglutinacija)	Jedan dio eritrocita je na dnu stupca, a dio se zadržava na vrhu kuglica ili gela.

Tablica 3. Opis pojedinih stupnjeva aglutinacije u mikrokartici (DAT)

Zapisi

U imunohematološkom laboratoriju rezultati testa upisuju se na:

- Zahtjevnici za izvođenje direktnog Coombsa
- Dnevnim radnim listama, validacijskim listama

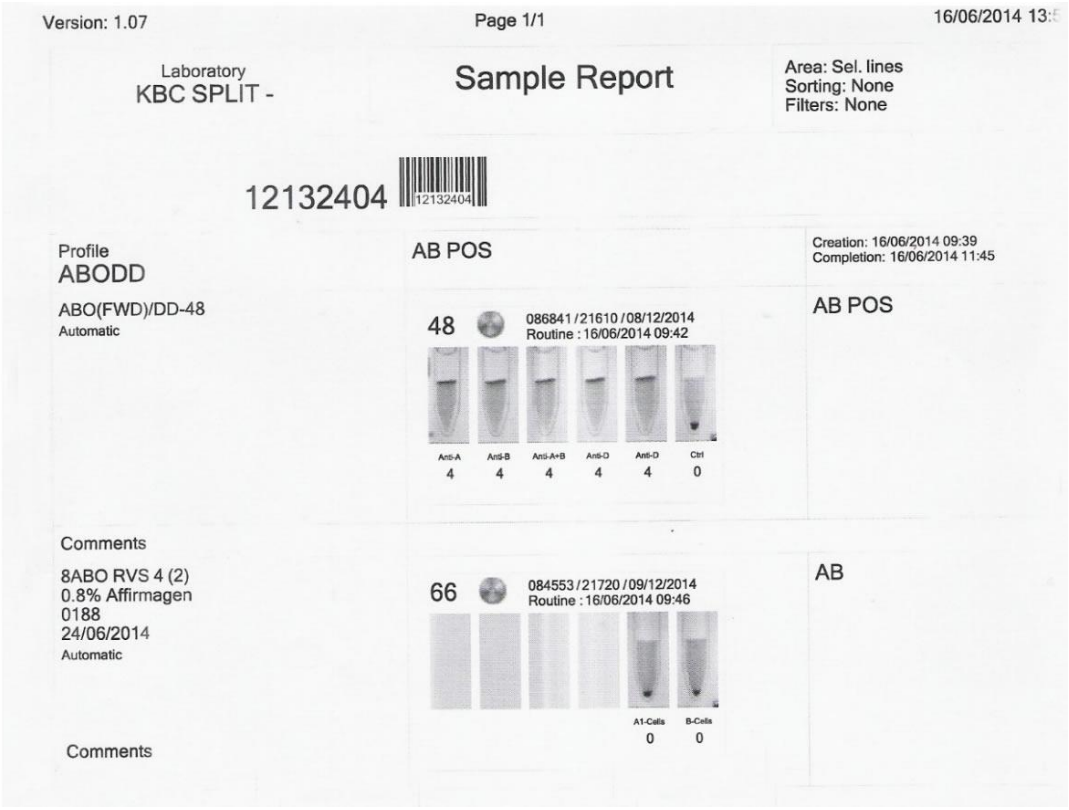
- Indeksu bolničkih i ambulantnih pacijenata sa pozitivnim direktnim Coombsom, koji se nalazi na dežurnom mjestu

4. REZULTATI

Kao rezultati ovoga rada bit će prikazane dnevne kontrole učinjene dana 16.06.2014. godine na analizatoru Ortho Auto Vue^{TM} Innova, te krv dobrovoljnog davatelja testirana na istome analizatoru toga dana.

Dnevne kontrole za Ortho Auto Vue^{TM} Innova obuhvaćaju testiranje uzoraka poznatih vrijednosti:

- Krvna grupa AB pozitivna
- Krvna grupa O negativna
- IAT (0.8%) – seruma antitijela Fy^{a}

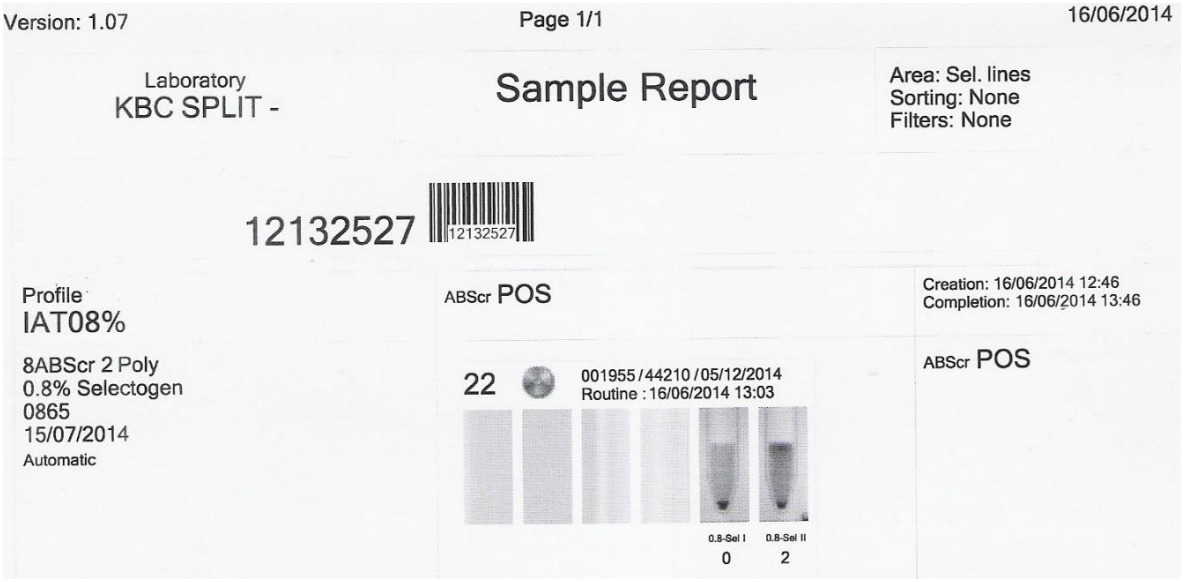


Slika 6. Dnevna kontrola: krvna grupa AB poz.

Izvor: KBC Split, Odjel za transfuzijsku medicinu, 16.06.2014.

Slika 7. Dnevna kontrola: krvna grupa O neg.

Izvor: KBC Split, Odjel za transfuzijsku medicinu, 16.06.2014.



Slika 8. Dnevna kontrola: IAT – seruma Fy^a

Izvor: KBC Split, Odjel za transfuzijsku medicinu, 16.06.2014.

Slika 9. Testirani uzorak. Dokazana krvna grupa O pozitivna, te IAT negativan.

Izvor: KBC Split, Odjel za transfuzijsku medicinu, 16.06.2014.

Budući da su dnevne kontrole toga dana, napravljene na analizatoru Ortho Auto Vue™ Innova, ukazale na pravilan rad analizatora, sa sigurnošću možemo reći da je krv dobrovoljnog davatelja, testirana na istome analizatoru, krvne grupe O pozitivna, te da je pregledni test pretraživanja negativan.

5. RASPRAVA

Nakon što je, pedesetih godina prošloga stoljeća, počela primjena automatizacije, ubrzo se postupno počela razvijati i informacijska te robotska tehnologija u laboratoriju.
Automatizacijom i robotizacijom dobrim se dijelom rješavaju različiti problemi jer:

1. u velikoj mjeri proširuju mogućnosti i kapacitet laboratorija,
2. smanjuju zamor laboratorijskog osoblja, pa se povećavaju točnost i preciznost rada,
3. povećavaju reproducibilnost rezultata i dovode do poboljšanja kvalitete laboratorijskog rada primjenom kvalitetnih analitičkih metoda i učinkovitih programa osiguranja kvalitete,
4. ubrzavaju izradbu pretraga i izdavanja nalaza,
5. smanjuju potrošak reagensa, jer analizatori rade s mikrolitarskim količinama reagencija,
6. smanjuju količinu uzorka potrebnog za izradbu analiza. [4]

Dosadašnja istraživanja koja su se bavila tematikom automatiziranih sustava i usporedbom kvalitete laboratorijskoga rada napravljenoga manualnom metodom, te analizatorom, donijela su jednake zaključke kao što su doneseni prilikom izradbe ovoga rada.

Naime, automatizirani rad pokazao se objektivnijim, te reproducibilnijim u odnosu na rad ručnim metodama. Također, smanjene su ljudske pogreške kao što su identifikacija uzorka, te transkripcijski dijelovi laboratorijskoga rada koji uključuju zapisivanje/prepisivanje podataka o pacijentu, te o samim rezultatima pretrage. [5]

Na samome početku, automatizirani sustavi nisu pokazivali i upućivali na to da će izgledati kao danas, te da će poboljšati i unaprijediti rad u laboratorijima, pa tako i u imunohematologiji. Bilo je potrebno educirati osoblje za rad, održavanje i kontrolu analizatora, te korištenje informacijskog sustava kao pomoć pri radu. To je rezultiralo još produženijim vremenom za izdavanje nalaza, te se automatizacija nije činila kao obećavajući proces. Također je trebalo odlučiti kakvi analizatore zahtijevaju određeni tipovi laboratorija.

Odabir pribora za rad počiva na potrebama odjela za različitim testiranjima i istraživanjima. Instalacija, ovjera, sučelja i operacije zahtijevaju nove setove vještina za većinu osoblja transfuzijskih jedinica. Noviji su instrumenti pogodniji za uporabu u manjim transfuzijskim jedinicama gdje se postupci i procedure rada ne mijenjaju često, zbog čega je instaliranje nove opreme rijetkost. Teško je uspoređivati vrijeme potrebno za izdavanje nalaza i trošak

operativnog sustava, jer broj uzoraka i specifičnih testova može varirati. Automatizirani testovi pokazali su se prikladni za testiranje većine, ali ne svih, uzoraka podvrgnutih testiranju. Naime, automatizacija je smanjila vrijeme izdavanja nalaza specifično za određivanje krvne grupe. Autoverifikacija rezultata i implementiranje takvih instrumenata u automatizaciju pripadaju bliskoj budućnosti. [6]

6. ZAKLJUČAK

Ovim je radom dan sažeti prikaz izradbe imunohematoloških testova koji se svakodnevno rade na odjelima za transfuzijsku medicinu. Kao sav laboratorijski posao, i imunohematološko testiranje zahtijeva brze, točne i precizne rezultate, stoga je cilj ovoga rada bio usporediti kvalitetu klasičnog ručnog izvođenja testova, s automatiziranim.

Dostupnom opremom, obavljena su probna testiranja objema metodama.

Kada je riječ o klasičnom izvođenju imunohematoloških testova, važno je naglasiti da je ono, bez obzira na povećanje automatiziranih sustava, još uvijek u većoj mjeri zastupljeno (konkretno kada govorimo o radu u KBC Split), ponajviše zbog nedostatka automatizirane opreme, te popratne tehničke podrške.

Testovi izrađeni klasičnom ručnom metodom okarakterizirani su prikladnima, jer su rezultati bili jednako precizni i točni, kao i oni izrađeni u analizatoru Ortho Auto Vue ^{TM} Innova.

Unatoč velikoj zastupljenosti klasične obrade uzoraka za imunohematološka testiranja, sve se više radi na kompletnom uvođenju automatizacije.

- Ponajprije jer se osoblje rasterećuje dijelom manualnoga rada, te se može više posvetiti čitanju rezultata, pisanju nalaza i zbrinjavanju pacijenta.
- Skraćuje se vrijeme potrebno za izdavanje nalaza.
- Moguće je obraditi više uzoraka u isto vrijeme.

Koliko god se automatizacija činila savršenom zamjenom za rad čovjeka, moramo biti svjesni da bez educiranog i osposobljenog osoblja laboratorijski posao nikada neće biti moguć. Ono što je također bitno zapamtiti jest to da napredak i razvitak automatizacije trebamo iskoristi kao maksimalnu pomoć pri radu, a nikada kao zamjenu za savjesnu, stručnu osobu.

7. LITERATURA

1. Grgičević D., Vuk T. Imunohematologija i transfuzijska medicina. Medicinska naklada, Zagreb, 2000.
2. Izvor podataka i metode – Radne upute KBC Split sa odjela transfuzije
3. Portal hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu http://www.hztm.hr/hr/content/2/darivanje-krvi/15/o-krvi/ (Pristupljeno: 27.06.2014.)
4. Štraus, Božidar; Petrik, József. Štrausova medicinska biokemija // Štrausova medicinska biokemija / Čvorišćec, Dubravka ; Čepelak, Ivana (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2009. Bajpal M., Kaur R., Gupta E. Automation in immunohematology. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22988378 (Pristupljeno: 30.06.2014.)
5. Butch SH., Automation in transfusion service. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19845075 (Pristupljeno: 30.06.2014.)
6. K. Fumić, D. Rogić, M. Fuček. Pravilan postupak uzorkovanja biološkog materijala. Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta u Zagrebu. http://www.hdsp.hr/novo/images/pdf/PRAVILAN_POSTUPAK_UZORKOVANJA_BIOLOSKOG_MATERIJALA.pdf (Pristupljeno: 14.08.2014.)
7. D. Čvorišćec. Kako pravilno uzeti krv od bolesnika. Glasnik hrvatskog društva medicinskih biokemičara. http://klinkemija.kbcsm.hr/HDMB/BiochMedARHIVA/Vol_01_1_1991/03_Cvoriscec_Vol01_1_1991-4.pdf (Pristupljeno: 14.08.2014.)

8. SAŽETAK

CILJ: Usporediti dvije metode izvođenja imunohematoloških testova. Metode: klasično testiranje, te automatsko ispitivanje uz pomoć analizatora.

METODE: Klasična metoda obuhvaća testiranja napravljena u epruveti držeći se strogo propisanih protokola zapisanih u radnim uputama koje se nalaze na svakom radom mjestu. Uvođenje automatizacije u dijelove laboratorijskog rada potaknulo je brojna istraživanja čija je osnova usporediti navedene metode imunohematološkog testiranja. Testiranja vezana za ovaj rad napravljena su na analizatoru Ortho Auto Vue^{TM} Innova.

REZULTATI: Prikazani rezultati dio su testiranja na analizatoru Ortho Auto Vue^{TM} Innova. Provedene dnevne kontrole ukazale su na ispravnost instrumenta, te su dobiveni rezultati bili točni, precizni i reporoducibilni.

ZAKLJUČAK: Testovi izrađeni objema metodama bili su u skladu sa standardima dobre kliničke prakse (točni, precizni te reproducibilni). Automatizirani sustav se pokazao boljim utoliko što je moguće napraviti veći broj testiranja u kraćem vremenu, skraćeno je vrijeme izdavanja nalaza, te je osoblje lišeno dijelova monotonog manualnoga rada čime su smanjene predanalitičke pogreške.

KLJUČNE RIJEČI: Imunohematološko testiranje, klasična metoda testiranja, automatizacija, krvne grupe, pregledni testovi pretraživanja (IAT)

9. ABSTRACT

AIM: To compare two methods of testing in immunohematology. Methods: Classical testing, and automated testing with the help of the analyzer.

METHODS: Classical testing includes testing done in a test tube holding strictly regulated protocols which are enrolled in work instructions that are found in any workplace.

The introduction of automation in parts of the laboratory work prompted numerous studies which basis is to compare these methods of immunohaematological testing. Testing related to this article were made on the analyzer Ortho Auto Vue™ Innova.

RESULTS: The presented results are part of the test made on analyzer Ortho Auto Vue™ Innova. Conducted daily control indicated the validity of the instrument, and the results obtained are accurate, precise and reproducible.

CONCLUSION: Tests made by both methods were in accordance with the standards of good clinical practice (accurate, precise and reproducible). The automated system was superior in so far as it is possible to make a greater number of tests in less time, shortened the time of reporting the findings, and the staff deprived parts of monotonous manual work which greatly reduces the preanalytical errors.

KEYWORDS: Immunohaematological testing, the classical method of testing, automation, blood group, screening assays search (IAT)

10.ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i Prezime:	Mirna Anđelić
Adresa:	A. G. Matoša 22, 31 400 Đakovo
Trenutno prebivalište:	Cvite Fiskovića 3, 21 000 Split
Telefon:	091 511 6370
E-mail:	mirna.andelic@outlook.com
Datum rođenja:	16.01.1993.
Mjesto rođenja:	Osijek

OBRAZOVANJE:

2011. - …	Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu Smjer: Medicinsko laboratorijska dijagnostika
2007. – 2011.	Opća gimnazija Antuna Gustava Matoša, Đakovo
1999. – 2007.	O.Š. Ivana Gorana Kovačića, Đakovo

DODATNA ZNANJA:

Aktivno znanje engleskog jezika u govoru i pismu

Aktivno znanje njemačkog jezika u govoru i pismu

Pasivno znanje talijanskog jezika

Izvrsno poznavanje rada na računalu

Vozačka dozvola B kategorije

HOBI I INTERESI:

1999. – 2002.	Član teniskog kluba Đakovo
2007. – 2011.	Član atletskog kluba SLA Ante Perić, Đakovo

OSTALO:

Bračno stanje: Neudana