

Usporedba titra antieritrocitnih protutijela metodom u epruveti i u mikrometodi

Brnada, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:176:888461>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



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

Dora Brnada

**USPOREDBA TITRA ANTIERITROCITNIH
PROTUTIJELA METODOM U EPRUVETI I U
MIKROMETODI**

Završni rad

Split, 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Dora Brnada

**USPOREDBA TITRA ANTIERITROCITNIH
PROTUTIJELA METODOM U EPRUVETI I U
MIKROMETODI
COMPARISON OF THE TITER OF RED BLOOD CELL
ANTIBODIES IN THE TUBE METHOD AND METHOD
OF MICROHEMAGGLUTINATION**

Završni rad / Bachelor's Thesis

mentor:

doc.dr.sc. Slavica Dajak

Split, 2024.

Sveučilište u Splitu

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo

Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti

Mentor: doc.dr.sc. Slavica Dajak

Usporedba titra antieritrocitnih protutijela metodom u epruveti i u mikrometodi

Dora Brnada

Sažetak:

Cilj rada: Cilj rada je usporediti titar antieritrocitnih protutijela u serumu imuniziranih trudnica u epruveti i mikrometodama (Ortho i Diamed). Mikrometode Ortho i Diamed su osjetljivije od metode u epruveti te će titar protutijela biti veći u mikrometodama nego klasičnom metodom u epruveti.

Materijali i metode: Odabrano je 7 pacijenata KBC-a Split s pozitivnim indirektnim antiglobulinskim testom (IAT) koje su poslone na određivanje titra protutijela. Od 7 pacijentica obrađeno je 9 uzoraka. Titar protutijela određen je klasičnom metodom u epruveti te Ortho i Diamed mikrometodom.

Rezultati: Većina pacijentica pokazuje kritični i veći titar protutijela. Mikrometode pokazuju veće titre protutijela u odnosu na mikrometode. Rezultati su pokazani kao zadnji pozitivni titar i zadnja pozitivna epruveta.

Zaključak: Mikrometode (Ortho i Diamed) pokazuju veće titre protutijela. Ova razlika je dosljedna kroz sve uzorke, potvrđujući osjetljivost mikrometoda. Metodom u epruveti mogu se razlikovati kompletna (IgM) od inkompletnih (IgG) protutijela, dok se mikrometodama određuje isključivo titar IgG protutijela. Prednosti mikrometoda, poput njihove osjetljivosti i preciznosti, mogu smanjiti broj lažno negativnih rezultata. Međutim, važno je razumjeti implikacije viših titra prikazanih mikrometodama. Ako se ne postave jasni referentni intervali i standardizirani protokoli, postoji rizik od prekomjerne dijagnoze i pretjerane terapije.

Ključne riječi: eritrocitni antigen; protutijelo; titar protutijela; hemolitička bolest novorođenčeta

Rad sadrži: 41 stranicu, 19 slika, 8 tablica, 44 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR'S THESIS

University of Split

University Department of Health Studies

Bachelor Study of Medical Laboratory Diagnostics

Scientific area: Biomedicine and healthcare

Scientific field: Clinical medical sciences

Supervisor: Assistant professor Slavica Dajak

Comparison of the titer of red blood cell antibodies in the tube method and method of microhemagglutination

Dora Brnada

Summary:

Objective: The aim of this study is to compare the titer of anti-erythrocyte antibodies in the serum of immunized pregnant women using the tube method and micro methods (Ortho and Diamed). The Ortho and Diamed microhemagglutination methods are more sensitive than the tube method, and therefore, the antibody titer will be higher in the microhemagglutination methods compared to the classical tube method.

Materials and methods: 7 patients from the UHC Split with positive indirect antiglobulin test (IAT) were selected and sent for antibody titer determination. A total of 9 samples were processed from the 7 patients. The antibody titer was determined using the conventional tube method and the Ortho and Diamed micro methods.

Results: The majority of patients showed critical and higher antibody titers. Micro methods demonstrated higher antibody titers compared to the tube method. Results are presented as the last positive titer and the last positive tube.

Conclusion: The micro methods (Ortho and Diamed) show higher antibody titers. This difference is consistent across all samples, confirming the sensitivity of the micro methods. The tube method can differentiate between complete (IgM) and incomplete (IgG) antibodies, whereas micro methods exclusively determine the titer of IgG antibodies. The advantages of micro methods, such as their sensitivity and precision, can reduce the number of false-negative results. However, it is important to understand the implications of higher titers presented by the micro methods. Without clear reference intervals and standardized protocols, there is a risk of overdiagnosis and overtreatment.

Keywords: erythrocyte antigen; antibody; antibody titer; hemolytic disease of newborn

Thesis contains: 41 pages, 19 figures, 8 tables, 44 references

Original in: Croatian

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Eritrocitni antigeni	1
1.2. Imunizacija u trudnoći	3
1.2.1. Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta.....	5
1.2.2. Profilaksa imunizacija	7
1.3. Antenatalno laboratorijsko testiranje	8
1.3.1. Direktni i indirektni Coombsov test	9
1.3.2. Titar protutijela	11
1.3.2.1. Klasična metoda u epruveti	15
1.3.2.2. Mikrometode	16
1.3.2.2.1. Ortho mikrometoda.....	17
1.3.2.2.2. Diamed mikrometoda	18
2. CILJ RADA.....	20
3. MATERIJALI I METODE.....	21
3.1. Uzorci.....	21
3.2. Protokol titracije protutijela	22
4. REZULTATI.....	26
4.1. Rezultati titracije metodom u epruveti.....	30
4.2. Rezultati titracije Ortho mikrometodom.....	31
4.3. Rezultati titracije Diamed mikrometodom.....	31
5. RASPRAVA.....	33
6. ZAKLJUČAK	36
7. LITERATURA	37
8. ŽIVOTOPIS	41

KRATICE

AHG – anti-humani gamaglobulin

BSA – goveđi serumski albumin

DAT – direktni antiglobulinski test

HbA – odrasli (adultni) hemoglobin

HbF – fetalni hemoglobin

HBFN – hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta

IAT – indirektni antiglobulinski test

Ig – imunoglobulin

IgG – imunoglobulin G

IgM – imunoglobulin M

Jk – Kidd sustav krvnih grupa

IS – eng. *immediate spin*

IU – međunarodna jedinica

K – Kell sustav krvnih grupa

KB – Kleihauer Betkeov test

KBC – klinički bolnički centar

LISS – eng. *low ionic strength solution*

Lu – Lutheran sustav krvnih grupa

Rh – Rhesus sustav krvnih grupa

RhD – Rhesus faktor D

RhIG – Rhesus imunoglobulin

ZTM – zavod za transfuzijsku medicinu

1. UVOD

1.1. Eritrocitni antigeni

Sustav krvnih grupa sastoji se od antigena eksprimiranih na eritrocitnoj membrani koji su kod svakog pojedinca definirani nizom gena (1). Antigen se može definirati kao bilo koja molekula ili dio molekule koji ulaskom u organizam izaziva proizvodnju specifičnih protutijela. Sposobnost antigena da izazove imunološki odgovor, odnosno njegova imunogeničnost, ovisi o nizu faktora kao što su njegova molekularna masa, filogenetska udaljenost, njegova dostupnost antigen-prezentirajućim stanicama te sama građa antigena. Dakle, nisu svi antigeni jednako klinički značajni. Eritrocitni antigeni po svojoj su strukturi proteinske i ugljikohidratne molekule (2). Većina ovih antigena je integralni dio eritrocitne membrane, dok je manji dio apsorbiran iz plazme na površinu eritrocita (3). Do studenog 2023. otkriveno je 45 sustava krvnih grupa koji sadrže 362 eritrocitna antigena (4). Neki od klinički značajnijih eritrocitnih antigenskih sustava prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Značajni sustavi krvnih antigena (1)

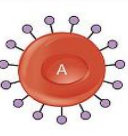

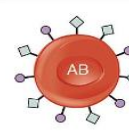

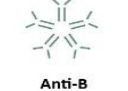
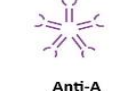




Sustav	Simbol	Broj antigena
ABO	ABO	4
MNS	MNS	43
P	P1	1
Rhesus	Rh	49
Lutheran	LU	20
Kell	KEL	25
Lewis	LE	6
Duffy	FY	6
Kidd	Jk	3

Pojam „krvna grupa“ može se definirati kao specifičan obrazac reakcije na testiranje antiseruma unutar određenog sustava (1). Krvnu grupu čini jedan ili više

antigena koji su kontrolirani pojedinim genskim lokusom ili dva blisko povezana homologna gena koji imaju male ili nezamjetne međusobne varijacije (4). Dakle, sinteza eritrocitnih antigena regulirana je genima koji se nasljeđuju prema Mendelovim zakonima. Ti geni su većinom kodominantni što znači da se na eritrocitnoj membrani ekspimiraju antigeni porijeklom od oba roditelja. Obzirom da ovi geni prate Mendelove zakone, u fenotipu se recesivni geni ne iskazuju u prisustvu dominantnih (3).

Protutijela, odnosno imunoglobulini (Ig), razvijena na određeni okolišni čimbenik u ljudskom organizmu nazivaju se prirodna protutijela, dok se protutijela koja nastaju susretom s antigenima drugog čovjeka nazivaju imunim protutijelima. Anti-ABO protutijela su prirodna, prisutna kod ljudi šest mjeseci nakon rođenja. Na slici 1 prikazana su prirodna anti-ABO protutijela pridružena pripadajućoj krvnoj grupi. Ukoliko ova protutijela dođu u kontakt s odgovarajućim antigenom uzrokuju intravaskularnu hemolizu (5).

Stvaranje protutijela na točno određeni antigen naziva se imunizacija, a može biti primarna ili sekundarna. Prvi kontakt s antigenom, odnosno primarna imunizacija obilježena je prvotnim stvaranjem IgM razreda protutijela te kasnijim stvaranjem IgG razreda nakon čega dolazi do stvaranja memorijskih limfocita. Ovi memorijski limfociti odgovorni su za vrlo nagli porast titra IgG protutijela kod drugog i svakog sljedećeg susreta s istim antigenom, odnosno kod sekundarne imunizacije (2). IgG protutijela su klinički posebno značajna jer mogu prijeći placentarnu barijeru (6).

		Krvna grupa			
		A	B	AB	O
Antigeni na eritrocitima					
Antitijela u plazmi	 Anti-B	 Anti-A	nema	 Anti-A i Anti-B	
Antigeni	 Antigen A	 Antigen B	 Antigeni A i B	nema	
Donori	A, O	B, O	A, B, AB, O AB+ je univerzalni primatelj	O O je univerzalni donor	

Slika 1. Anti-ABO protutijela u pojedinim krvnim grupama

Izvor: <https://www.genetika.biol.pmf.hr/wp-content/uploads/2020/07/Slika-4.5.png>

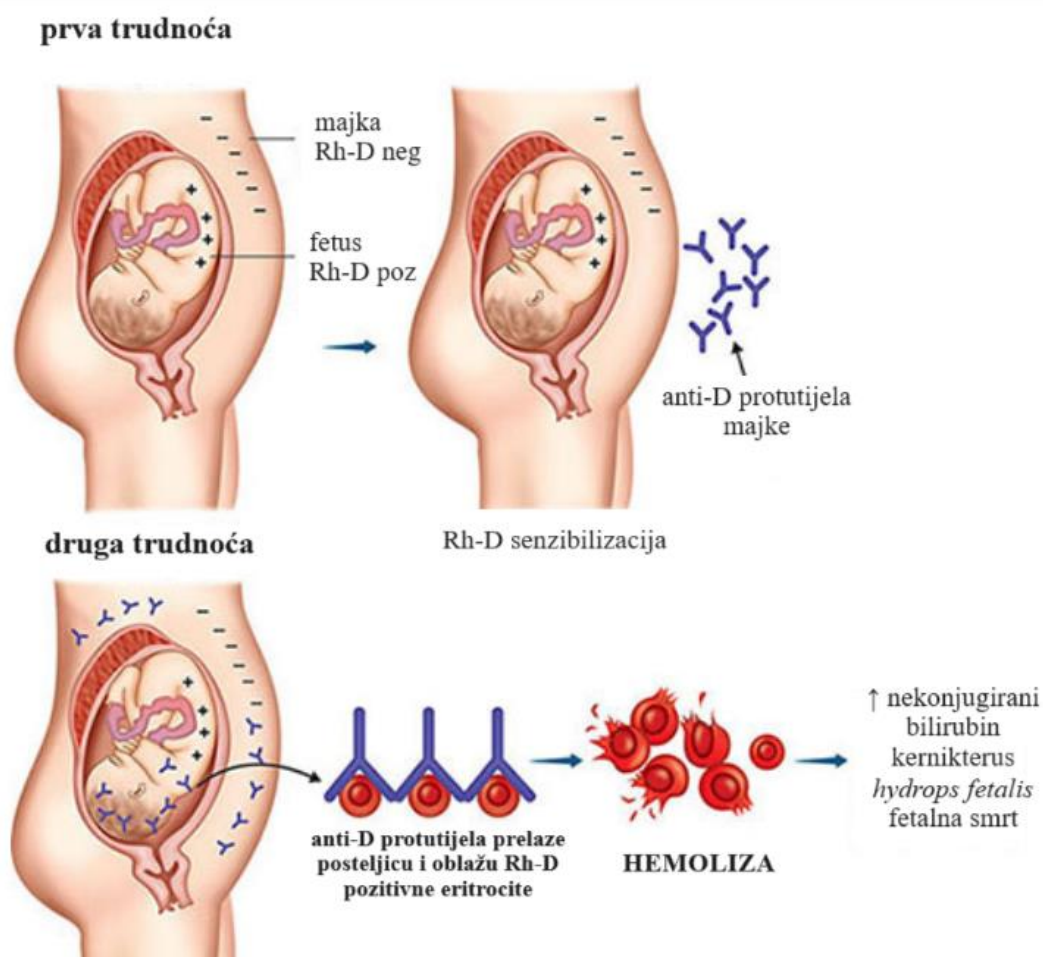
Nemaju sva antieritrocitna protutijela jednak klinički značaj. Postoji niz čimbenika koji određuju klinički značaj protutijela kao što su: sastav antigena, brojnost i izraženost na eritrocitnoj membrani, razred i podrazred imunoglobulina, sposobnost prelaska posteljice, sposobnost aktiviranja sustava komplementa te posebno dijagnostički značajno, količina (titar) protutijela. Klinički značajna i najčešća protutijela su iz ABO, Rh, Kell, Kidd i Duffy sustava. Vrlo rijetko klinički značajnu imunizaciju mogu uzrokovati protutijela iz sustava MNS (7, 8).

1.2. Imunizacija u trudnoći

Najčešći način imuniziranja kod ljudi je trudnoća. Majčinska aloimunizacija predstavlja prisutnost ne-AB protutijela kod trudnice. Tkivni antigeni fetalnog i/ili placentarnog porijekla potiču majčine imunološke stanice na proliferaciju i diferencijaciju te na stvaranje protutijela i memorijskih stanica. Majčin imunološki sustav prepoznaje djetetove antigene kao strane te odgovara proizvodnjom protutijela. Pojava protutijela usmjerenih na fetalne (placentarne) antigene predstavlja rizik za fetus, a u nekim slučajevima i za majku (6, 9, 10).

Najčešći, ujedno i najjači krvni imunogen je RhD antigen. Protutijela najčešće razvijaju RhD negativne trudnice čiji fetus ima RhD pozitivan fenotip. D antigen počinje se ekspimirati na eritrocitnoj membrani do 38. dana gestacije (11). Do imunizacije i razvoja anti-D protutijela u trudnoći najčešće dolazi uslijed fetomaternalnog krvarenja krajem trudnoće ili tijekom poroda prvog RhD pozitivnog djeteta (12). Također je moguć razvoj protutijela uslijed spontanog ili inducirano pobačaja, izvanmaternične trudnoće, invazivnih postupaka na majci ili djetetu, vanjske cefaličke verzije, antenatalnog krvarenja, oštećenja posteljice, čak i traume majke. Volumen krvi koji može proizvesti imunološki odgovor na RhD negativne osobe je 0,45 mL u oko 80% osoba. Imunološki odgovor razvija se sporo i može se otkriti više tjedana nakon izlaganja (11). Anti-D protutijela do uvođenja RhD imunoprolifakse u trudnoći 1970. činila su većinu otkrivenih protutijela. Od tada je u porastu postotak ostalih klinički značajnih protutijela. Anti-D protutijelo slijede protutijela usmjerena na druge antigene iz Rh sustava te anti-Kell protutijela (3).

Tijekom prve trudnoće majka se najčešće senzibilizira na nekompatibilni antigen djeteta. Obzirom da imunološki sustav stvara memorijske stanice, koje se još nazivaju i „rezervna“ IgG protutijela, u slučaju ponovnog kontakta s istim antigenom reakcija je obično teža i češće su posljedice (npr. fetalni hidrops, intrauterina smrt i sl.) kod druge i sljedećih trudnoća. Posljedice su moguće i kod prve trudnoće, ali se najčešće događaju kod sekundarnih imunizacija. Proces je prikazan na slici 2 na primjeru anti-D protutijela. Cirkulirajuća protutijela prolaze kroz posteljicu i opsoniziraju fetalne eritrocite koje fagocitiraju makrofagi u fetalnoj slezeni što dovodi do fetalne anemije (6, 11).



Slika 2. Princip imunizacija trudnice na RhD antigen i HBFN

Izvor: <https://d45jl3w9libvn.cloudfront.net/jaypee/static/books/9789351524236/Chapters/images/90-1.jpg>

Moguć je razvoj nekoliko komplikacija uslijed imunizacije majke čija težina varira od blagih do teških (6). Neke od najtežih komplikacija su hemolitička bolest fetusa i

novorođenčeta (HBFN), fetalni hidrops (lat. *hydrops fetalis*) te je moguća i intrauterina fetalna smrt (11).

1.2.1. Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta

Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta (HBFN), poznata i kao fetalna eritroblastoza (lat. *erythroblastosis fetalis*), posljedica je razgradnje fetalnih eritrocita majčinim protutijelima koja su uspjela proći kroz posteljicu. Francuska primalja opisala je HBFN prvi put 1609., ali je uzrok bolesti ostao nerazjašnjen do 50-ih godina 20. st. Danas se incidencija procjenjuje na 6 – 7/ 1000 živorođene djece. Prije razvoja anti-D profilakse procjenjuje se da je HBFN bio odgovoran za 1% pobačaja u svim trudnoćama. Određena je korelacija pojave HBFN-a s obrascem nasljeđivanja D antigena, ali je isto tako ustanovljeno da je pojava neravnomjerno raspodijeljena po etničkim skupinama što je prikazano u tablici 2 (3, 12, 13).

Tablica 2. Prevalencija RhD antigena u etničkim skupinama (13)

etnička skupina	prevalencija (%)
Afrikanci	4
Afroamerikanci	8
Bijelci	15 – 16
Euroazijati	2,4
Azijati	< 1
Baskijci (Španjolska/Francuska)	30 – 35

HBFN najčešće je potaknuta D antigenom, iako i drugi Rh antigeni (c, C, E i e) mogu uzrokovati bolest. Također može biti uzrokovana nekompatibilnošću ABO krvne grupe što se događa kada majka krvne grupe O nosi dijete druge krvne grupe (A, B), ali u tom je slučaju bolest manje ozbiljna u odnosu na Rh nekompatibilnost. Manje uobičajeni uzroci HBFN-a uključuju protutijela usmjerena na antigene krvne grupe Kell (npr. anti-K i anti-k), Kidd (npr. anti-Jka i anti-Jkb), Duffy (npr. anti- Fya) te MNS. Protutijela usmjerena protiv krvnih grupa P i Lewis nisu povezana s HBFN-om (14).

Glavni patofiziološki mehanizam bolesti je hemoliza koja se može odvijati na svim eritrocitnim razvojnim oblicima hematopoeze (12). Hemoliza fetalnih eritrocita dovodi

do oslobađanja velike količine bilirubina koje posteljica prenosi u majčinu cirkulaciju. Majka eliminira bilirubin, iako može doći do razvoja žutice. HBFN klinički je indiciran: brzom i teškom hiperbilirubinemijom ili trajnom hiperbilirubinemijom; te hemolizom eritrocita. Opseg hematopoeze utječe na težinu poremećaja (13).

Klinička slika ovisi o majčinom individualnom imunološkom odgovoru, stoga bolest varira u oblicima od blagih anemija do fetalnog hidropsa i intrauterine fetalne smrti. Osnovno obilježje bolesti jest anemija koja se može pojaviti već intrauterino. Isto tako se može razviti kod rođenja (rana anemija) ili unutar nekoliko tjedana nakon rođenja (kasna anemija). Vrijeme pojavnosti, ali i stupanj težine anemije ovise ponajviše o intenzitetu imunizacije. Otprilike 25% fetalne hiperbilirubinemije u prvih par dana nakon rođenja rezultira kernikterusom; stanje uzrokovano nakupljanjem bilirubina u središnjem živčanom sustavu. Djeca koja prežive kernikterus često imaju ozbiljne posljedice kao što su razvojna retardacija, hipotonija ili gubitak sluha. U svom najozbiljnijem obliku HBFN uzrokuje *hydrops fetalis* kojeg karakterizira edem, hepatosplenomegalija i zatajenje srca te može dovesti do intrauterine smrti (15).

Postavljanje dijagnoze HBFN-a započinje testovima probira: rozeta test i Kleihauer Betkeov test. Rozeta test je kvalitativni probirni test na uzorku krvi majke kojim se utvrđuje fetomaterialno krvarenje, odnosno je li majčina RhD negativna krv došla u kontakt s fetalnom RhD pozitivnom krvi. Test se provodi inkubiranjem pune venske krvi majke s anti-D imunoglobulinom. Stanice majke ostaju nevezane za anti-D protutijelo jer su RhD negativne. Tijekom ovog perioda inkubacije, sve RhD pozitivne fetalne stanice u majčinom uzorku senzibilizirane su i vezane na anti-D imunoglobulin. Dodaju se indikatorske stanice tretirane enzimima koje se vežu samo za prisutne fetalne stanice što rezultira nakupljanjem eritrocita u formaciju koja se naziva rozeta. Indikatorske stanice nalaze se u središtu rozete, a fetalni eritrociti grupirani su oko rubova kao latice na cvijetu. Ovaj uzorak se može vidjeti mikroskopom. Ukoliko nastane rozeta formacija test se smatra pozitivnim te je potrebno kvantitativno odrediti fetalne eritrocite Kleihauer Betkeovim (KB) testom. KB test je analiza kisele elucije koja se izvodi na majčinoj krvi kako bi se odredila količina fetalnog hemoglobina (HbF) koja je prošla u majčinu cirkulaciju. HbF je otporniji na alkalnu denaturaciju NaOH nego odrasli hemoglobin (HbA). Kada je uronjen u citratni pufer (pH 3,3) HbF ostaje netaknut dok HbA iscuri. Test se provodi izlaganjem razmaza krvi majke otopini kiseline. Obzirom da je otporan

na kiselinu, HbF ostaje netaknut, dok se HbA uklanja. Nakon toga, bris se boji Shepardovom metodom. Fetalni eritrociti ostaju ružičasti, a majčine stanice izgledaju kao „duhovi“ zbog izostanka bojenja. Iako se ručno otkrivanje i kvantifikacija naširoko koriste, protočna citometrija je preciznija. Broji se ukupno 2000 stanica, a izračun postotka fetalnih i majčinih stanica koristi se za procjenu ukupne količine fetomateralnog krvarenja (16). Drugi uzroci novorođenačke žutice i anemije moraju se isključiti prije postavljanja konačne dijagnoze HBFN-a (13).

S vremenom su uspostavljene preventivne i terapijske tehnike od kojih treba istaknuti fototerapiju, intrauterinu transfuziju, eksangvinotransfuziju i amniocentezu. Uvođenjem ovih tehnika stopa perinatalnog preživljenja popela se na 90%. Prva linija liječenja i terapija izbora preko 30 godina je fototerapija koja se može primjenjivati profilaktički ili terapijski. Dijete se izlaže valnim duljinama plavo-zelenom rasponu (460 – 490 nm) čime se nekonjugirani bilirubin konvertira u konjugirani. U odnosu na druge metode izbora ima manje nuspojava te veću učinkovitost u liječenju nedonoščadi. Kod izrazito anemične novorođenčadi preporuka je eksangvinotransfuzija u kojoj se djetetovi eritrociti zamjene RhD negativnima (ukoliko je riječ od anti-D protutijelu) (13).

1.2.2. Profilaksa imunizacija

Razotkrivena patofiziologija poremećaja 1950-ih omogućila je potragu za preventivnim mjerama pa je tako 1960-ih otkriveno da se senzibilizacija RhD pozitivne krvi može spriječiti intravenskom primjenom anti-D imunoglobulina (IgG). Anti-D IgG je sterilna otopina koja sadrži anti-D IgG protutijelo proizvedeno od „bazena“ imuniziranih RhD negativnih osoba (17).

Precizan mehanizam sprječavanja imunizacije primjenom anti-D IgG nije u potpunosti razjašnjen. Pasivno anti-D protutijelo uzrokuje brzo i neupalno čišćenje eritrocita koje oblaže što zaustavlja upalnu destrukciju fetalnih eritrocita izazivajući prirodni imunološki odgovor. Smatra se da imunološka supresija posredovana protutijelima dovodi do smanjene regulacije nezrelih dendritičnih stanica majke ili anti-D-specifičnih B stanica prije nego se razvije anti-D odgovor (17).

Prije otkrića Rh imunoglobulina (RhIG) anti-D HBFN bio je značajan uzrok perinatalne smrtnosti ili dugotrajne invalidnosti. Rutinska primjena RhIG RhD negativnim ženama tijekom trudnoće i nedugo nakon rođenja RhD pozitivne dojenčadi

učinkovito je smanjila učestalost HBFN-a uzrokovanog anti-D protutijelom (15). *Post partum* profilaksa pokazala se učinkovitom u smanjenju pojavnosti imunizacije šest mjeseci nakon primjene te u sljedećim trudnoćama (17). Aloimunizacija majke na druge eritrocitne antigene u Rh, Kell i drugim sustavima krvnih grupa ne može se rutinski spriječiti. Napredak u prenatalnoj skrbi, neinvazivnom praćenju i intrauterinoj transfuziji poboljšali su izgleda za pogođene trudnoće toliko da se čak i fetalni hidrops može anulirati te učinkovito liječiti u mnogim slučajevima (15).

Rutinska antenatalna anti-D profilaksa obično se ne primjenjuje do 28. tjedna trudnoće, budući da se transplacentarna krvarenja, dovoljno velika da izazovu senzibilizaciju, obično ne pojavljuju sve do trećeg tromjesečja pa se anti-D protutijela obično razvijaju nakon 28. tjedna trudnoće. Procjenjuje se da je poluvijek života anti-D protutijela u prosjeku 17 do 22 dana. Postoje dva glavna pristupa antenatalnoj profilaksi; jedna doza od 1500 međunarodnih jedinica (IU) u 28. tjednu i doza od 500 do 625 IU u 28. i 34. tjednu. Oba pristupa teoretski osiguravaju da 12 tjedana nakon primjene postoji dovoljno anti-D za zaštitu od 1 mL eritrocita ili 2 mL pune krvi (17).

Primjena RhIG smatra se sigurnom profilaktičkom intervencijom. Studije su pokazale da male količine pasivnog anti-D protutijela mogu prijeći posteljicu, ali antenatalna primjena anti-D IgG nema štetnih posljedica za fetus (17, 18, 19, 20). Najveći teoretski rizik potječe od činjenice da anti-D IgG potječe od donorskih plazmi pa postoji potencijalni rizik zaraze krvlju prenosivim bolestima (17). Kako je RhIG krvni proizvod, prije primjene obavezan je informirani pristanak. Komplikacije injektiranja RhIG su rijetke; neke žene mogu osjetiti bol, osip i/ili oteklinu na mjestu uboda (7).

1.3. Antenatalno laboratorijsko testiranje

Kao i kod svake dijagnoze, veliku važnost u pravovremenoj i točnoj intervenciji nosi anamneza i fizikalni pregled. Čimbenici rizika fetomateralnog krvarenja su: prethodni HBFN ili fetalni hidrops, biopsija korionskih resica, amniocenteza, prethodni spontani ili inducirani pobačaj, antepartalno krvarenje, prethodne transfuzije i sl. Ovi indikatori upućuju na ozbiljan rizik razvoja HBFN-a. Za dijagnosticiranje i liječenje trudnica s HBFN-om potrebna je opsežna laboratorijska obrada (13).

Antenatalno testiranje ključno je za sigurnost majke i fetusa te utvrđivanje potrebe za ranom intervencijom. Tijekom trudnoće provodi se niz testova probira, uključujući određivanje krvne grupe i protutijela. Krvna grupa trudnice rutinski se određuje tijekom prvog prenatalnog posjeta. Glavne uloge ovih testova su:

- odrediti krvnu grupu majke (posebnu pažnju zahtijevaju trudnice s krvnom grupom 0)
- odrediti RhD antigen, zbog selekcije RhD negativnih trudnica i primjene anti-D IgG
- detekcija imuniziranih trudnica i identifikacija majčinih protutijela (7).

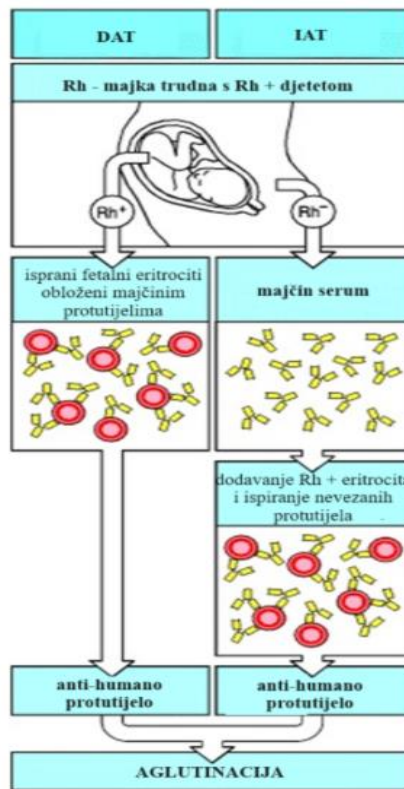
1.3.1. Direktni i indirektni Coombsov test

Antiglobulinsko testiranje, poznato kao Coombsov test, imunološki je laboratorijski postupak koji se koristi za otkrivanje prisutnosti antieritrocitnih protutijela. Može se izvršavati kao direktni antiglobulinski test (DAT) ili indirektni antiglobulinski test (IAT) (21).

U prenatalnom probiru za otkrivanje prenatalno stvorenih protutijela koristi se IAT (13). IAT se koristi za otkrivanje nevezanih protutijela na eritrocite koja mogu biti prisutna u serumu pacijenta. Serum uzorka krvi se izolira, a prirodni eritrociti uklanjaju te se serum inkubira sa stranim eritrocitima poznate antigenosti. Dodaje se antiglobulinski reagens, a prisutnost aglutinacije ukazuje na pozitivan rezultat (21).

Načelo direktnog Coombsovog testa ili DAT-a je otkrivanje prisutnosti protutijela vezanih izravno na eritrocite. Prikupljeni uzorak krvi pere se u fiziološkoj otopini kako bi se izolirali eritrociti pacijenta čime se uklanjaju nevezana protutijela koja bi mogla utjecati na rezultat (21). DAT se ne koristi u antenatalnom testiranju, ali se koristi za detektiranje protutijela prisutnih na djetetovim eritrocitima (22).

Coombsovi testovi upućuju na prisutnost protutijela, ali ne određuju o kojem specifičnom protutijelu je riječ. Negativan rezultat znači da pacijent nema potencijalno opasnih protutijela u svom serumu, dok pozitivan upućuje na prisutnost protutijela čiju specifičnost treba definirati (21). Upotreba Coombsovih testova shematski je prikazana na slici 3.



Slika 3. Princip DAT-a i IAT-a

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10755/bin/APP1FA13.gif>

Ukoliko je IAT pozitivan, sljedeći korak je identificiranje specifičnosti protutijela za što se koristi prošireni panel eritrocita definiranog fenotipa antigena. Specifičnost protutijela određuje se na temelju uzorka reaktivnosti protutijela na panel stanica (23). Primjer panela prikazan je na slici 4.

CELL	Rh							MNS			Lutheran		P ₁	Lewis		Kell		Duffy		Kidd		IS	37C	AHG	Check cells			
	D	C	E	c	e	f	v	C ^w	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	P ₁	Le ^a	Le ^b	K	k	Fy ^a	Fy ^b					Jk ^a	Jk ^b	
1. r'r-2	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	∅	∅	2+	
2. R1 ^w R1-1	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	∅	∅	2+	
3. R1R1-6	+	+	0	0	+	0	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	∅	∅	2+	
4. R2R2-8	+	0	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	∅	∅	∅	✓	
5. r'r-3	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	∅	∅	∅	✓	
6. rr-32	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0	∅	∅	∅	∅	✓	
7. rr-10	0	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	∅	∅	∅	∅	✓	
8. rr-12	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	∅	∅	∅	∅	∅	✓	
9. R ₀ -4	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	0	0	+	∅	∅	∅	∅	✓	
Cord cell	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0	0	/	/	/	/	/	/						
Patient																								∅	∅	∅	✓	

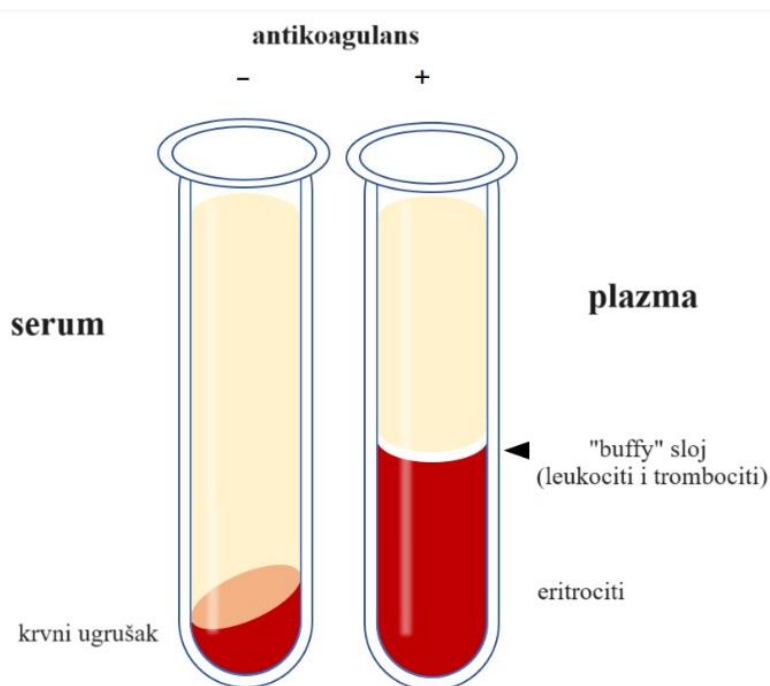
Slika 4. Panel eritrocita

Izvor: <https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780128137260000222-f22-01-9780128137260.jpg>

1.3.2. Titar protutijela

Nakon identifikacije klinički značajnog protutijela procjenjuju se njegove razine i prate svaka dva do četiri tjedna. Titracija protutijela semikvantitativna je metoda određivanja koncentracije protutijela s najčešćom primjenom praćenja klinički značajnih protutijela trudnica (24, 25). Titar (razina) protutijela koristi se kao pokazatelj "jačine" protutijela u majčinoj cirkulaciji (7). Definira se kao mjera razrjeđenja uzorka prije nego što se protutijela više ne mogu otkriti (26).

Uzorak izbora za određivanje titra protutijela je serum, a ne plazma jer je u plazmi blokirana aktivnost komplementa zbog djelovanja antikoagulantne otopine. Na slici 5 prikazani su uzorci krvi u epruveti s antikoagulansom i bez antikoagulansa (24).



Slika 5. Uzorak krvi u epruveti s antikoagulansom i bez antikoagulansa

Izvor: <https://cellgs.e2ecdn.co.uk/Pages/serum-vs-plasma.jpg>

Titar protutijela može se određivati i iz plazme ukoliko se radi o protutijelima koja ne aktiviraju komplement, kao protutijela iz Rh sustava.

Mjerenje titra protutijela provodi se serijskim razrjeđivanjem krvne plazme/ seruma i testiranjem s odgovarajućim eritrocitima kako bi se odredio najviši titar gdje se javlja

reakcija (26). Razina titracije ne odgovara niti predviđa klinički ishod, već se titar može smatrati testom probira koji upućuje na mogućnost razvoja HBFN-a (7).

Kod ponovnog određivanja titra protutijela kod iste pacijentice radi se paralelno testiranje iz novog i prethodnog uzorka. Testiranje se mora raditi s istim testnim eritrocitima.

Kritični titar definiran je kao onaj titar koji je povezan sa značajnim rizikom razvoja fetalnog hidropsa (27). On varira među laboratorijima, ali većina ustanova koristi 1:8 do 1:32 za anti-D metodom u epruveti. Kritični titar za anti-c protutijela se smatra većim od 1:4, dok za anti-Kell protutijela titar većim od 1:2, a za ostala protutijela kritične vrijednosti titra nisu definirane. Ukoliko se dosegne granični titar ili se titar naglo povećava između mjerenja pacijenticu treba uputiti opstetričkom timu na kontinuirano praćenje. Nakon dosega kritičnog titra nisu presudna daljnja ispitivanja titracije. Ukoliko su otkrivena klinički značajna majčina protutijela tijekom rutinskog probira rizik za fetus može se djelomično riješiti određivanjem očevih eritrocitnih antigena (ako je očinstvo sigurno). Ukoliko je prethodna trudnoća rezultirala oboljelim fetusom ili novorođenčetom titri majčinih protutijela nisu od pomoći, a fetus treba pratiti doplerskim ultrazvukom (7, 26).

Protutijelo koje zahtijeva posebnu pažnju je anti-Kell. Povezano je sa supresijom eritropoeze i fetalnom smrću već nakon 12 tjedana (7).

Uz same vrijednosti titra procjenjuje se i snaga aglutinacije kojoj se može dodijeliti broj, a zbroj tih brojeva u svim epruvetama predstavlja rezultat, tj. još jedno semikvantitativno mjerenje reaktivnosti protutijela (28). Međutim, titracija se često opisuje kao „inherentno neprecizan“ i subjektivan postupak te je neophodna standardizacija kako bi se smanjile varijable koje mogu utjecati na točan i smislen rezultat (25).

U upotrebi je nekoliko laboratorijskih tehnika za procjenu titra protutijela. Još uvijek je često korišteno klasično testiranje u epruveti. Također je u vrlo čestoj upotrebi mjerenje titra protutijela u gel mikrometodi (7). Klasični test u epruveti smatra se zlatnim standardom titracije protutijela te je preporučena metoda za određivanje titra protutijela u trudnica zbog dugogodišnjeg iskustva s ovom metodom. Međutim, postoje i neka

ograničenja ove metode kao što su postizanje reproducibilnosti te poteškoće u automatizaciji i standardizaciji (24). Mikrometoda uvedena 1990. stekla je popularnost zbog standardizirane i tehnički jednostavne izvedbe (29). Također je zabilježena veća osjetljivost mikrometode u usporedbi s testom u epruveti u raznim studijama (29, 30, 31). Ostale prednosti mikrometode uključuju manji volumen uzorka (seruma), stabilne rezultate te laku čitljivost. S vremenom je primijećeno da postoje razlike u rezultatima ovih dviju metoda. Uočeno je da se mikrometodom može dobiti viši titar u odnosu na isti uzorak u epruveti (29). U studijama je zabilježeno da kritični titri u epruvetama (1:16) odgovaraju titrima mikrometode u rasponu od 1:32 do 1:128, stoga je teško doći do konačnog zaključka o kritičnim titrima mikrometode kada se pokuša uspostaviti izravna korelacija (29, 32, 33).

Sve se metode mjerenja titra protutijela u principu baziraju na inkubaciji serijskih razrjeđenja seruma s 3 – 5%-tnom suspenzijom prethodno tipiranih eritrocita, tj. eritrocita poznate antigenosti. Dakle, uz serum se koriste i tipirani eritrociti koji eksprimiraju antigen na koji je trudnica imunizirana (28). Testni eritrociti korišteni u ovom radu bili su krvne grupe 0, heterozigotni za antigen kojim se ispituje protutijelo te ukoliko se ispitivalo anti-D protutijelo R2R2 fenotipa. Koristili su se eritrociti iz „*Resolve Panel B*“ proizvođača Ortho-Clinical Diagnostics.

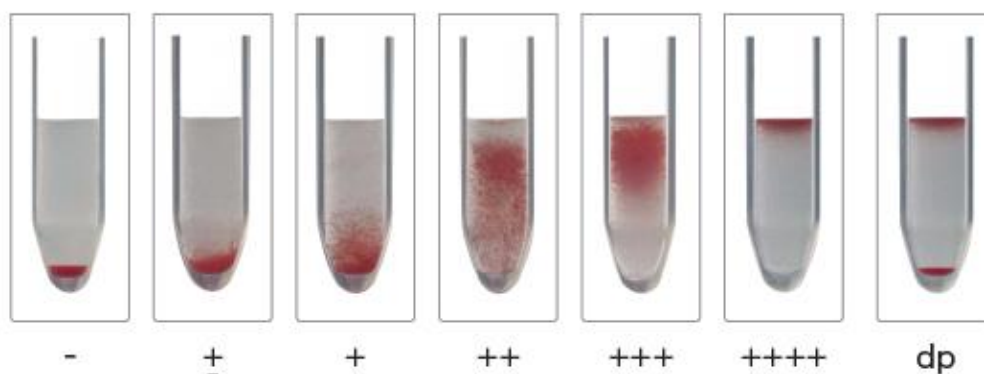
Bitno je napomenuti da kada je u uzorku prisutno više protutijela različite specifičnosti odabrane stanice trebaju biti pozitivne samo za jedan ispitivani antigen. Za svako protutijelo potrebno je raditi odvojeni titar.

Mjerenjem titra protutijela mjeri se pozitivna reakcija protutijela s eritrocitima koji posjeduju specifični antigen (26). Titar se bilježi kao recipročna vrijednost najvećeg razrjeđenja u kojem je došlo do reakcije (npr. titar 1:64, znači pozitivnu reakciju u 7. epruveti). Ukoliko je evidentna aglutinacija u zadnjoj reakcijskoj smjesi, odnosno najvećem odrađenom razrjeđenju nije dosegnuta krajnja točka te je potrebno nastaviti s razrjeđivanjem. Uz same vrijednosti titra protutijela određuje se i opažena snaga aglutinacije kojoj se može dodijeliti broj. Zbroj tih brojeva za sve reakcijske smjese u titracijskoj studiji predstavlja još jedno semikvantitativno mjerenje reaktivnosti protutijela (28).

Rezultati se određuju makroskopski i uz pomoć aglutinoskopa. Interpretacija rezultata prikazana je u tablici 3 koja je kreirana na osnovu slike 6.

Tablica 5. Interpretacija rezultata titracije protutijela (34)

stupanj reakcije	opis reakcije	interpretacija rezultata
-	ravan kompaktni sloj eritrocita s glatkom površinom na dnu jažice bez vidljive aglutinacije	negativno (odsutnost protutijela)
+/-	veći dio eritrocita na dnu jažice s jako malo aglutiniranih eritrocita vidljivih poviše aglutinata ili nepravilan aglutinat	pozitivno (prisutnost protutijela)
+	dio eritrocita na dnu jažice s aglutiniranim eritrocitima u donjoj polovici epruvete	
++	aglutinirani eritrociti po cijeloj epruveti bez aglutinata na dnu	
+++	većina aglutiniranih eritrocita na vrhu epruvete	
++++	aglutinirani eritrociti u liniji na vrhu epruvete	
miješano polje (eng. <i>double positive, dp</i>)	eritrociti su u dvije linije; na vrhu aglutinirani eritrociti, na dnu neaglutinirani	

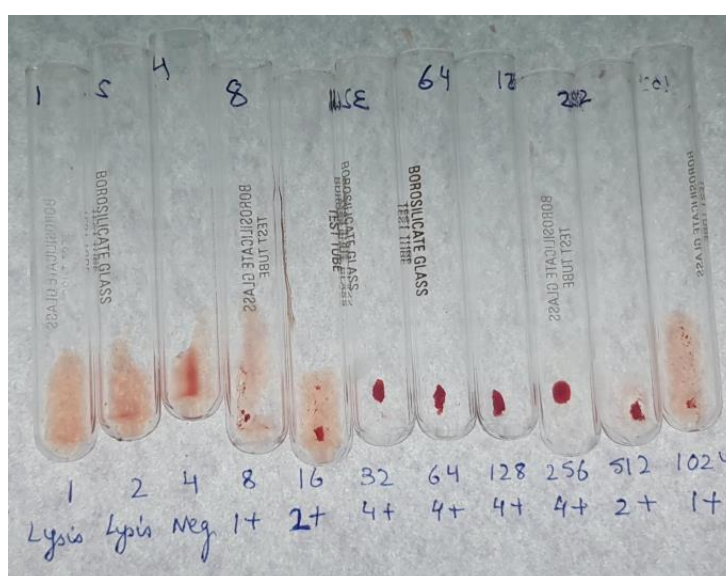


Slika 6. Različite jačine reakcije antigena i protutijela

Izvor: DiaMed GmbH. ID-Titration Solution. Instructions for Use. Version 02. Bio-Rad Laboratories, Switzerland; 2022.

„Score“, odnosno zbroj jačina aglutinacije, označava aviditet protutijela. Ako je manji od pet ne piše se za krajnju točku titracije, već se zbraja u ukupan rezultat.

Bitno je napomenuti da prozonski fenomen, ukoliko antigen i protutijelo nisu u optimalnom omjeru, može uzrokovati da reakcije budu slabije u koncentriranijim pripravcima seruma nego u većim razrjeđenjima jer postoji premalo antigenskih mjesta za umrežavanje molekula i ne formira se pravilna struktura. Kako bi se izbjeglo krivo tumačenje rezultata treba prvo ispitati epruvetu koja sadrži najrazrjeđeniji serum i nastaviti kroz koncentriranije uzorke do nerazrjeđenog uzorka (28). Prozonski učinak prikazan je na slici 7.



Slika 7. Prozonski učinak

Izvor:

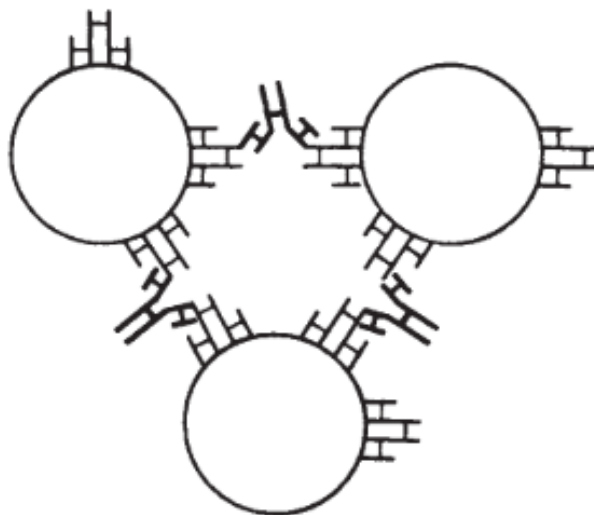
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10064354/bin/12288_2022_1583_Fig2_HTML.jpg

1.3.2.1. Klasična metoda u epruveti

Zlatni standard titracije protutijela je metoda u epruveti. Preporučuje se primarno zbog svoje jednostavnosti jer su za izvedbu potrebni komercijalni tipirani eritrociti, fiziološka otopina, standardna laboratorijska oprema (staklene epruvete, pipete, centrifuga, inkubatori) te anti-humani globulin (AHG) (24).

AHG je, zapravo, protutijelo protiv humanih protutijela. Usmjereno je protiv Fc fragmenta humanih IgG protutijela i/ili komponenata komplementa (C3d), odnosno može biti monospecifično ili polispecifično. Princip rada prikazan je na slici 8. Proizvodi se injiciranjem humanih globulina u životinju (npr. zec, miš). Korak pranja je potreban da AHG ne bi reagirao s nevezanim globulinima prisutnim u uzorku što bi rezultiralo

njegovom neutralizacijom, odnosno lažno negativnim rezultatima (28). Aktivnost IgG protutijela pojačana je AHG-om (35).



Slika 8. Reakcija AHG s Fc fragmentom IgG protutijela

Izvor: Brecher ME. Technical manual, 15th edition. American Association of Blood Banks; 2015.

U fazi ispitivanja bez AHG-a događa se reakcija s hladnim protutijelima, tj. IgM razredom protutijela koja ne zahtijevaju pojačanje da bi reagirala. Ova protutijela obično nisu klinički značajna. AHG poboljšava aglutinaciju toplih IgG protutijela, a ova protutijela smatraju se klinički značajnima (36). Dakle, rezultati bez AHG-a nam daju rezultat prisutnosti kompletnih IgM protutijela, dok rezultati nakon dodavanja AHG-a predstavljaju titar inkompletnih IgG protutijela (35).

1.3.2.2. Mikrometode

Mikrometode, ili gel metode, postepeno se implementiraju u standardnu laboratorijsku praksu. Koncept ovih metoda osmislio je Lapierre 1988., a princip je da se umjesto u epruveti reakcija odvija u mikroepreveti (37). Mikroeprevete su napunjene mješavinom gela, pufera i reagensa. U kontekstu titracije protutijela test koristi neutralni gel koji ne sadrži reagentse (reagensi se dodaju na vrh gela) (38). Šest mikroepreveta ugrađeno je u plastičnu karticu kako bi se omogućilo jednostavno rukovanje, testiranje, očitavanje i odlaganje (37). Reakcijska smjesa centrifugira se kroz gel pod preciznim uvjetima. U negativnim reakcijama eritrociti prolaze kroz gel i stvaraju pelet na dnu mikroeprevete, dok su u pozitivnim reakcijama zarobljeni u gelu i reakcija se može čitati

satima nakon izvođenja metode (38). Mikrokartice te pozitivne i negativne reakcije prikazane su na slici 9.



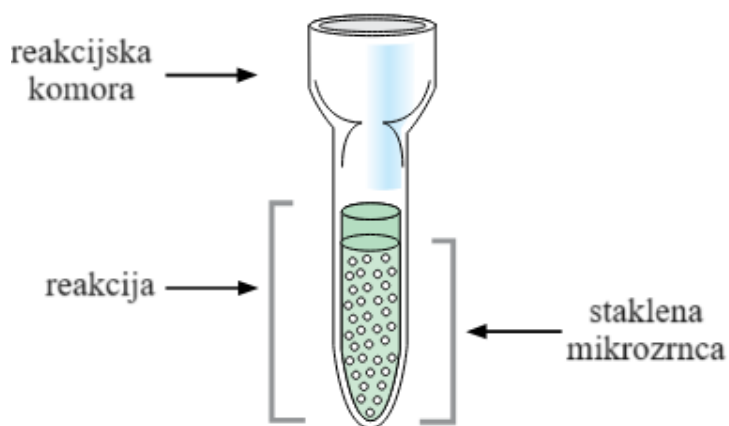
Slika 9. Mikrokartice

Izvor: https://backend.ih-area.bio-rad.com/sites/default/files/styles/large/public/images/Bio-Rad_50531_LISS-Coombs_Antibody-Screening.jpg?itok=sDzgvRq

Mikrometode su manje sklone tehničkim varijacijama u odnosu na klasičnu metodu, a stabilnost reakcije omogućuje ponovljive rezultate (35).

1.3.2.2.1. Ortho mikrometoda

Ortho mikrometoda koristi „Ortho BioVue System“ mikrokartice s anti-IgG i anti-C3d polispecifičnim protutijelima proizvođača Ortho-Clinical Diagnostics. Mikroeprovete sadrže široku reakcijsku komoru u gornjem dijelu, AHG u donjem dijelu te matricu staklenih mikroznaca (39). Shema mikroeprovete prikazana je na slici 10.



Slika 10. Ortho mikroeproveta

Izvor: Atkins S. ORTHO BioVue System Handbook. Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. 2013.

Mikroznrca služe kao površina na koju se protutijela mogu vezati, a ova metoda ih koristi zbog velikog omjera površine i volumena što povećava učinkovitost vezanja protutijela i poboljšava osjetljivost testa, obzirom da mikroznrca pružaju stabilnu i inertnu površinu koja smanjuje nespecifična vezanja i omogućuje preciznije rezultate (40). Ortho mikrokartica prikazana je na slici 11.



Slika 11. Ortho mikrokartica

Izvor: Zavod za transfuzijsku medicinu, KBC Split

1.3.2.2.2. *Diamed mikrometoda*

Diamed mikrometoda po osnovnom mehanizmu slična je Ortho mikrometodi, ali postoje razlike. Mikrokartice proizvođača Bio-Rad koje se koriste za Diamed mikrometodu za odvajanje aglutiniranih eritrocita koriste umreženi gel (Sephadex). Ovaj gel djeluje kao inertna matrica koja omogućava stabilnu i kontroliranu migraciju protutijela smanjujući nespecifične reakcije i poboljšavajući osjetljivost i preciznost testa (38). Također sadrže reakcijsku komoru i AHG kao Ortho mikrokartice (39).

U ovom radu korištene su LISS/ Coombs mikrokartice koje su specijalizirane za precizno određivanje titra protutijela. Svaka kartica sadrži određene eritrocite te

specifičnu kombinaciju reagensa. Otopina niske ionske jakosti (eng. *low ionic strength solution*, LISS) dizajnirana je da pruži optimalnu ionsku snagu za aglutinaciju eritrocita u prisutnosti protutijela (39). Coombsov reagens, koji sadrži AHG, dodatno poboljšava detekciju aglutinacije (41). LISS/ Coombs mikrokartica prikazana je na slici 12.



Slika 12. LISS/ Coombs mikrokartica

Izvor: Zavod za transfuzijsku medicinu, KBC Split

2. CILJ RADA

Cilj rada je usporediti titar antieritrocitnih protutijela u serumu imuniziranih trudnica koristeći tri različite metode:

- titar protutijela u klasičnoj metodi u epruveti
- titar protutijela u mikrohemaglutinacijskoj metodi Ortho
- titar protutijela u mikrohemaglutinacijskoj metodi Diamed.

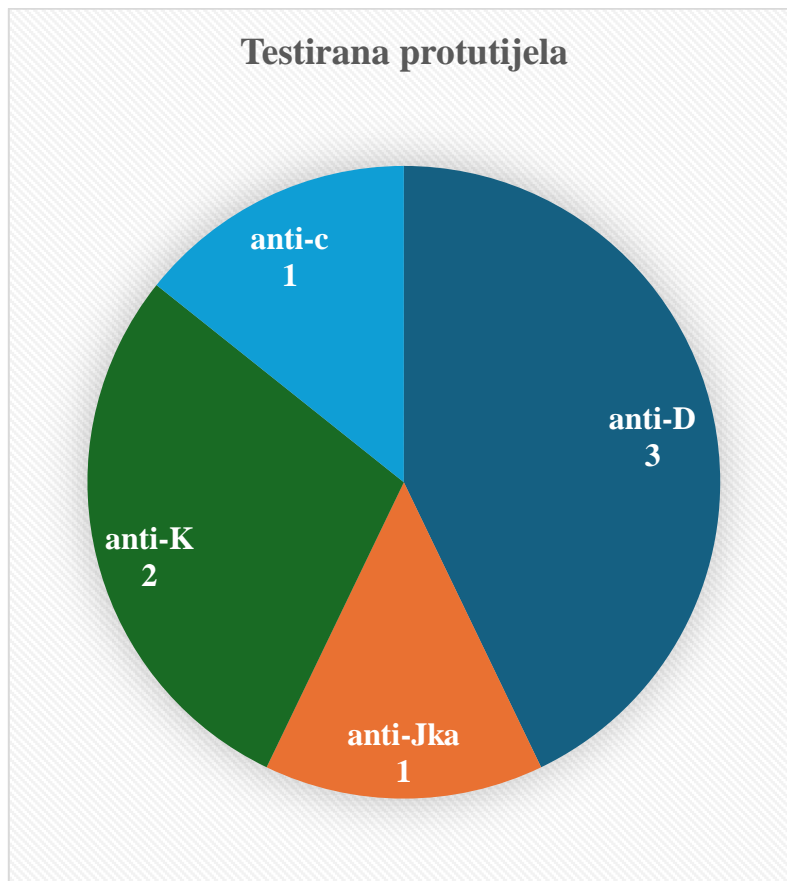
Hipoteza je, mikrohemaglutinacijske metode Ortho i Diamed su osjetljivije od metode u epruveti, iz više prethodno navedenih razloga. Zbog toga će titar protutijela biti veći u mikrohemaglutinacijskim metodama nego klasičnom metodom u epruveti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

Na Zavodu za transfuzijsku medicinu (ZTM) Kliničkog bolničkog centra (KBC) Split odabrano je 7 trudnica s pozitivnim IAT-om za određivanje titra protutijela u serumu. Pacijentice su identificirane rutinskim prenatalnim testiranjem. Nakon identifikacije klinički značajnog protutijela upućene su na ispitivanje titra protutijela.

Za analizu su korišteni zamrznuti uzorci otopljeni neposredno prije analize. Od 7 pacijentica, u IAT-u je jedna bila pozitivna na anti-Jka, dvije na anti-K, jedna pacijentica na anti-c, a sve ostale na anti-D protutijelo. Udio pojedinog protutijela u ukupnom broju protutijela prisutnih kod testiranih trudnica prikazan je na slici 13.



Slika 13. Udio pojedinog protutijela u ukupnom broju protutijela kod pacijentica

Dvije trudnice su tijekom trudnoće imale značajan porast titra protutijela pa su njihovi uzorci uzeti iz dva različita perioda trudnoće. Pacijentice su imale ponovnu

kontrolu te su za njih odrađena po 2 uzorka što ukupno čini 9 uzoraka. Uzorci su prikazani u tablici 4.

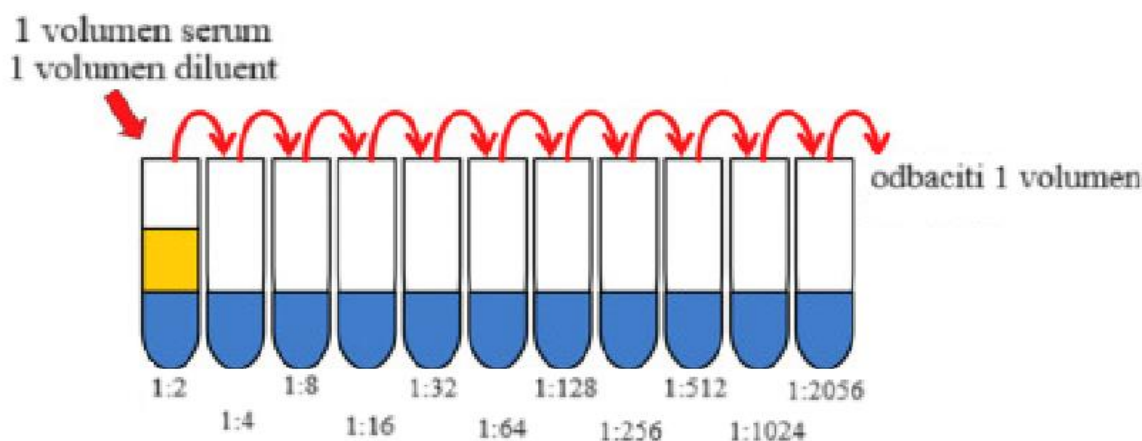
Tablica 4. Testirani uzorci

pacijentica	uzorak	Protutijelo
1	1a	anti-D
	1b	
2	2a	anti-Jka
	2b	
3	3	anti-K
4	4	anti-D
5	5	anti-D
6	6	anti-K
7	7	anti-c

3.2. Protokol titracije protutijela

Ova metoda mjerenja titra protutijela odrađena je prema protokolu ZTM-a. Broj koraka titracije procjenjuje se na osnovu pozitiviteta u IAT-u. Za svaki uzorak odrađene su dvije serije od 12 dvostrukih razrjeđenja (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2056) u dilucijskom sredstvu, odnosno titracija, te su razrjeđenja dalje korištena kao uzorci i podvrgnuta su analizama. Proces titriranja prikazan je na slici 14. Provedene su tri metode: metoda u epruveti te dvije mikrometode u karticama (Ortho i Diamed). Kao dilucijsko sredstvo za metodu u epruveti i Ortho mikrometodu korištena je fiziološka otopina (0,9%-tna otopina natrijevog klorida) te se pipetiralo 130 μ L seruma i 130 μ L fiziološke otopine u prvu epruvetu. U svaku sljedeću epruvetu ispipetirano je 130 μ L prethodne dilucijske otopine u 130 μ L dilucijskog sredstva. Za Diamed mikrometodu kao dilucijsko sredstvo korištena je titracijska otopina „*ID-Titration Solution*“ proizvođača Bio-Rad, a pipetirano je 100 μ L dilucijskog sredstva i 100 μ L

seruma te se u svaku daljnju epruvetu u kojoj se nalazilo 100 μL dilucijskog sredstva prebacilo 100 μL prethodne dilucijske otopine.



Slika 14. Serijsko razrjeđenje seruma

Izvor: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1938973615000914-gr2.jpg>

U svaku epruvetu serijskog razrjeđenja dodano je po 65 μL 3%-tne suspenzije eritrocita te je reakcijska smjesa nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi centrifugirana na 1000 okretaja po minuti (eng. *rotations per minute*, rpm) 1 minutu te su očitani rezultati. Ovaj dio protokola se još naziva i metoda epruvete s trenutačnim centrifugiranjem (eng. *immediate spin*, IS).

Uzorci su zatim inkubirani 1,5 h na 37°C u inkubatoru, odnosno termostatu. Nakon inkubacije su centrifugirani na 1000 rpm 1 minutu te su rezultati ponovno očitani da bi se odredio titar toplih protutijela.

Nakon inkubacije izdvojeno je po 30 μL iz svake epruvete za daljnju analizu Ortho mikrometodom što ostavlja u svakoj epruveti reakcijsku smjesu od 150 μL . Ta se smjesa razrijeđenog seruma i suspenzije eritrocita zatim ispere tri puta u fiziološkoj otopini. Nakon svakog koraka pranja uzorak se centrifugira 2 minute na 2400 rpm te se supernatant otkloni. Nakon toga se na eritrocite koji su ostali u epruveti dodaju 2 kapi (otprilike 100 μL) polispecifičnog AHG (anti-IgG, anti-C3d, proizvođač Bio-Rad), smjesa se centrifugira na 1000 rpm 1 minutu i ponovno se očitavaju rezultati.

Prethodno izdvojenih 30 μL iz svake epruvete ukapa se u Ortho mikrokarticu. Reakcijska smjesa se potom inkubira 20 minuta na 37°C i nakon toga centrifugira 10

minuta na 1000 rpm. Inkubacija i centrifugiranje vrše se u „*ORTHO Workstation*“ sustavu prikazanom na slici 15.



Slika 15. ORTHO workstation

Izvor: Atkins S. ORTHO BioVue System Handbook. Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. 2013.

Kao što je prethodno opisano, dilucija seruma odrađena je na drugačiji način u odnosu na prethodne dvije metode, s posebnim dilucijskim sredstvom „*ID-Titration Solution*“ proizvođača Bio-Rad. „*ID-Titration Solution*“ je standardizirana otopina na bazi govedeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumin*, BSA) bez protutijela u bočicama od 10 mL spremna za uporabu (34). Potencijalne interferencije ovog reagensa prikazane su u tablici 5.

Tablica 3. Interferirajuće tvari s „*ID-Titration Solution*“ (34)

interferirajuća tvar	maksimalna koncentracija
trigliceridi (intralipid)	16,94 mmol/L
bilirubin	684 μ mol/L
ljudski hemoglobin	10 g/L
ljudski albumin (ukupni proteini)	100 g/L

Prebačeno je 25 μ L svake reakcijske smjese u mikrokarticu zajedno s 50 μ L 0,8% suspenzije eritrocita. Eritrociti su razrijeđeni u „*ID-Diluent 2*“ proizvođača Bio-Rad. Mikrokartica se potom inkubira 20 minuta na 37°C i centrifugira 10 minuta na 1000 okretaja. Inkubacija i centrifugiranje se odvijaju u „*DiaMed-ID Micro Typing System*“ koji je prikazan na slici 16.



Slika 16. DiaMed-ID Micro Typing System

Izvor: <https://2.imimg.com/data2/NS/UI/MY-2265337/13-500x500.jpg>

4. REZULTATI

Određivanjem titra protutijela metodom u epruveti dobivaju se rezultati IgM (bez AHG-a) i IgG protutijela (s AHG-om), dok se mikrometodama može odrediti isključivo titar IgG protutijela, budući da se metoda provodi samo uz prisutnost AHG-a. Čim se dokažu protutijela trudnice su imunizirane. Od 7 testiranih trudnica 6, odnosno od 9 uzoraka 7 je imalo titar u klasičnoj metodi 1:4 ili veći. Za mikrometode još nije utvrđen granični titar, stoga se rezultati interpretiraju u usporedbi s rezultatima klasične metode u epruveti. Rezultati mjerenja titra protutijela u 9 odabranih uzoraka ZTM-a metodom u epruveti, Ortho i Diamed mikrometodom prikazani su u tablici 6 i tablici 7.

Tablica 4. Rezultati mjerenja titra protutijela metodom u epruveti, Ortho i Diamed mikrometodi, prikazani kao vrijednost titra protutijela

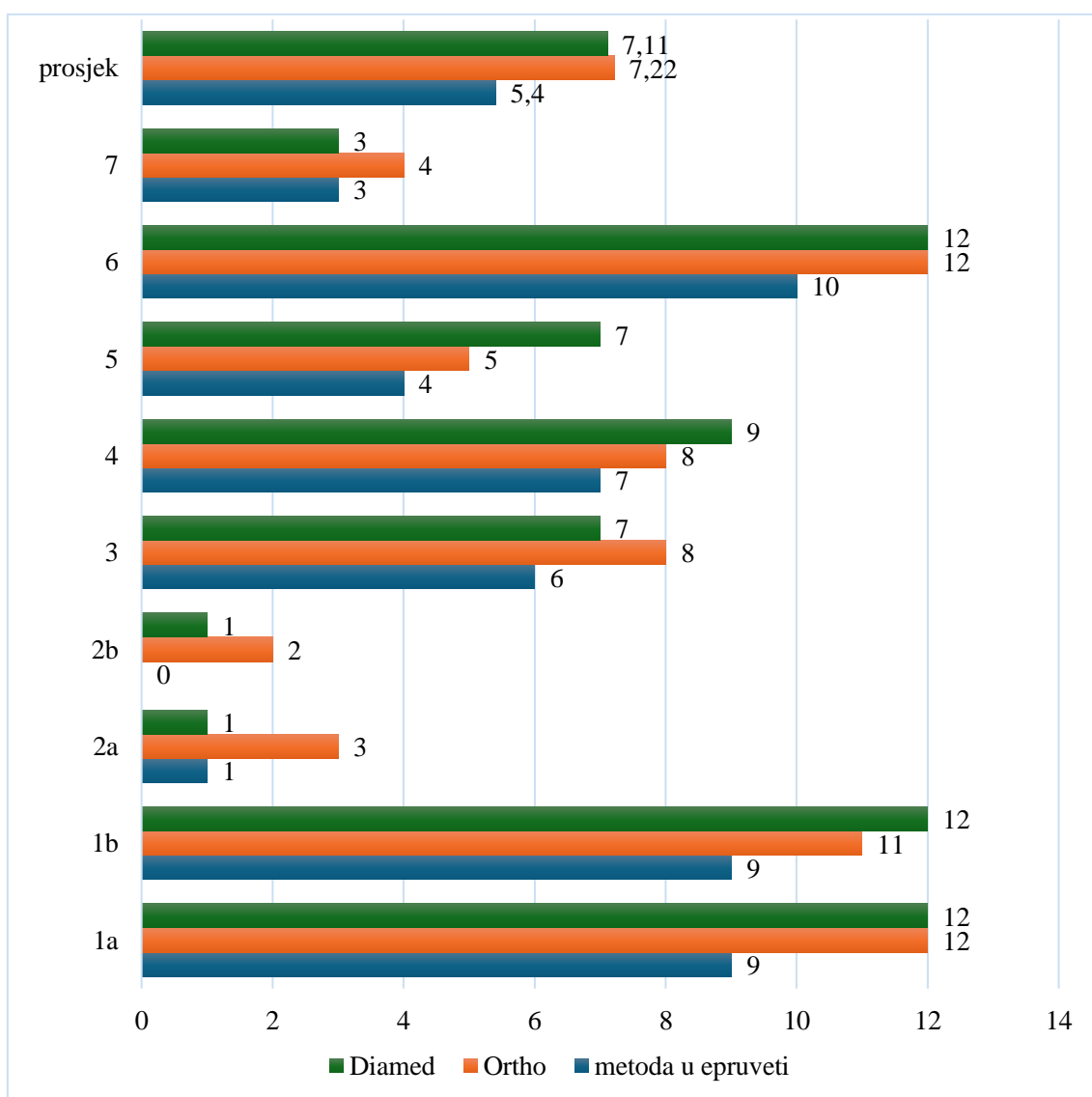
uzorak	Protutijelo	metoda u epruveti (AHG)	Ortho mikrometoda	Diamed mikrometoda
1a	anti-D	1:256	1:2048	1:2048
1b	anti-D	1:256	1:1024	1:2048
2a	anti-Jka	1:1	1:4	1:1
2b	anti-Jka	neg	1:2	1:1
3	anti-K	1:32	1:128	1:64
4	anti-D	1:64	1:128	1:256
5	anti-D	1:8	1:16	1:64
6	anti-K	1:512	1:2048	1:2048
7	anti-c	1:4	1:8	1:4
prosjek	/	125,88	600,67	726

Tablica 7. Rezultati mjerenja titra protutijela metodom u epruveti, Ortho i Diamed mikrometodi, prikazani kao krajnja pozitivna epruveta/mikrometoda

uzorak	protutijelo	metoda u epruveti (AHG)	Ortho mikrometoda	Diamed mikrometoda
1a	anti-D	9	12	12
1b	anti-D	9	11	12
2a	anti-Jka	1	3	1
2b	anti-Jka	neg	2	1
3	anti-K	6	8	7
4	anti-D	7	8	9
5	anti-D	4	5	7
6	anti-K	10	12	12
7	anti-c	3	4	3
prosjeak	/	5,4	7,22	7,11
najmanja razlika u titru u odnosu na metodu u epruveti			1	0
najveća razlika u titru u odnosu na metodu u epruveti			3	3

Rezultati su također grafički prikazani na slici 17 kako bi se vizualno mogla usporediti razlika u rezultatima za pojedini uzorak u tri metode mjerenja titracije. Uzorci 1a i 1b pokazuju značajne razlike između metoda, pri čemu su mikrometode (Ortho i Diamed) dale znatno više rezultate titra protutijela u usporedbi s metodom u epruveti. Uzorak 2a pokazuje titar 1:1 metodom u epruveti i Diamed mikrometodom, dok je Ortho

mikrometoda pokazala titar 1:4 što ukazuje na razlike u osjetljivosti metoda za niske titreve, dok je s druge strane uzorak 2b negativan u klasičnoj metodi, a titar nije klinički značajan u mikrometodama što je u skladu s očekivanjima. Kod uzorka 3 mikrometode daju titar 1:128 i 1:64, dok metoda u epruveti daje titar 1:32, potvrđujući veću osjetljivost mikrometoda. Uzorak 4 pokazuje titar 1:64 u epruveti i 1:128 i 1:256 u mikrometodama, što potvrđuje isti trend, kao i uzorak 5 koji pokazuje titar 1:8 u epruveti i 1:16, odnosno 1:64 u mikrometodama. Što se tiče uzorka 6, pokazuje titar 1:512 u epruveti, dok mikrometode daju još veći titar, što ukazuje na razlike kod visokih titreva. Konačno, uzorak 7 pokazuje titar 1:4 u epruveti, dok Ortho mikrometoda pokazuje 1:8 što ukazuje na potencijalne varijabilnosti između metoda kod određenih uzoraka.



Slika 17. Grafički prikaz rezultata titracije protutijela s 3 različite metode, rezultati su prikazani kao zadnja pozitivna epruveta/ mikrometoda

Prosječna vrijednost titra, odnosno prosječna zadnja pozitivna epruveta mjerenjem u epruveti je peta epruveta, dok je s druge strane u Ortho mikrometodi to sedma, kao i u Diamed mikrometodi. Iz ovoga se jasno može vidjeti veća osjetljivost mikrometoda.

Anti-D protutijela su najčešće klinički značajna protutijela jer su povezana s Rh inkompatibilnošću, što je evidentno i u ovom istraživanju budući da je to protutijelo s najvećim udjelom u ovoj ispitivanoj populaciji (tri od sedam trudnica). Klinički značajan titar za anti-D protutijela varira, ali vrijednosti od 1:16 ili više smatraju se klinički značajnima i zahtijevaju pažljivo praćenje i moguću intervenciju (27). Rezultati pokazuju značajne razlike u titraciji anti-D protutijela između metoda. Primjerice, uzorak 1a i 1b imaju značajno veći titar kod mikrometoda (1:2048) u usporedbi s klasičnom metodom (1:256). Uzorak 4 također prati ovaj trend (epruveta 1:64, Ortho mikrometoda 1:128, Diamed 1:256). Razlika je klinički značajna jer visoki titri mogu ukazivati na veći rizik za HBFN. To se vjerojatno najbolje vidi na uzorku 5 gdje je metodom u epruveti određen subklinički titar 1:8 (ali se trudnica smatra imuniziranom), dok mikrometode pokazuju klinički značajne titre (Ortho 1:16, Diamed 1:64). Rezultati naglašavaju važnost korištenja konzistentnih metoda za praćenje trudnica s anti-D protutijelima.

Za anti-K protutijela, klinički značajan titar je često niži nego za anti-D, s vrijednostima od 1:8 ili 1:16 koji se smatraju indikativnima za povećani rizik od fetalne anemije. Kell protutijela mogu uzrokovati teže oblike anemije jer utječu na eritropoezu pa se često kao granični titar uzima i 1:4 (7). Rezultati za anti-K protutijela također pokazuju veće titre kod mikrometoda u usporedbi s klasičnom metodom. Uzorak 3 pokazuje titar 1:128 kod Ortho mikrometode i 1:64 kod Diamed mikrometode u usporedbi s titrom 1:32 kod klasične metode. Slično tome, uzorak 6 pokazuje titar 1:2048 kod obje mikrometode, dok klasična metoda pokazuje titar 1:512. Razlike ukazuju na potrebu za pažljivim praćenjem trudnica s anti-K protutijelima zbog mogućih kliničkih implikacija. Obe trudnice, u svakom slučaju, zahtijevaju daljnje intervencije i praćenje.

Što se tiče ostalih klinički značajnih protutijela u ovom radu, anti-Jka protutijela, koja su dio Kidd sustava, poznata su po varijabilnosti u detekciji. Ova protutijela također mogu uzrokovati HBFN, a klinički značajan titar za anti-Jka protutijela varira, ali titri iznad 1:8 obično se smatraju klinički značajnima i zahtijevaju daljnje praćenje (14). U ovom istraživanju testirana je jedna trudnica s anti-Jka protutijelima, ali u dva uzorka. Uzorak 2a pokazuje titar 1:4 kod Ortho mikrometode u usporedbi s titrom 1:1 kod

klasične metode, dok uzorak 2b pokazuje titar 1:2 kod Ortho mikrometode i negativan rezultat kod klasične metode što sugerira da mikrometode mogu otkriti niže titre protutijela koje klasična metoda možda ne detektira, ali je upitno koliko su ti titri klinički značajni. Anti-c protutijela, kao i druga protutijela protiv Rh sustava, mogu biti klinički značajna. Ona su rjeđa, ali mogu uzrokovati ozbiljne komplikacije slične onima koje uzrokuje anti-D protutijelo (26). Za interpretaciju titra referentno se uzimaju isti granični titri kao i za anti-D protutijelo. Rezultati za anti-c protutijela također pokazuju razlike između metoda. Uzorak 7 pokazuje titar 1:8 kod Ortho mikrometode i 1:4 kod klasične metode potvrđujući da mikrometode mogu otkriti više titre protutijela što može biti od kliničkog značaja, ali oba titra su u ovom slučaju subklinička. Dakle, ova trudnica smatra se imuniziranom, ali nije potrebna klinička intervencija ukoliko nisu evidentni simptomi HBFN-a.

4.1. Rezultati titracije metodom u epruveti

Titracijom protutijela u epruveti dobivaju se rezultati i IgM protutijela i IgG protutijela. Titar IgM protutijela određuje se u prvoj vrtnji prije odnosno onaj prije dodavanja AHG-a. Budući da AHG omogućuje vizualizaciju IgG protutijela, rezultati nakon njegovog dodavanja predstavljaju IgG titar. Rezultati titracije metodom u epruveti koji uključuju IgM i IgG titar prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Rezultati titracije metodom u epruveti

uzorak	IgM	IgG
1a	1:2	1:256
1b	1:8	1:256
2a	Neg	1:1
2b	Neg	neg
3	Neg	1:32
4	Neg	1:64
5	Neg	1:8
6	Neg	1:512
7	1:2	1:4

Klasičnom metodom u epruveti određeno je da su samo tri uzorka imala IgM protutijela, a s druge strane šest je bilo pozitivno na IgG protutijela.

4.2. Rezultati titracije Ortho mikrometodom

Ortho mikrometodom određuje se isključivo titar IgG protutijela. Brojčani rezultati prethodno su prikazani u tablici 6 i tablici 7, a na slici 18 prikazani su primjeri rezultata u mikrokarticama uzoraka 5 i 1a.

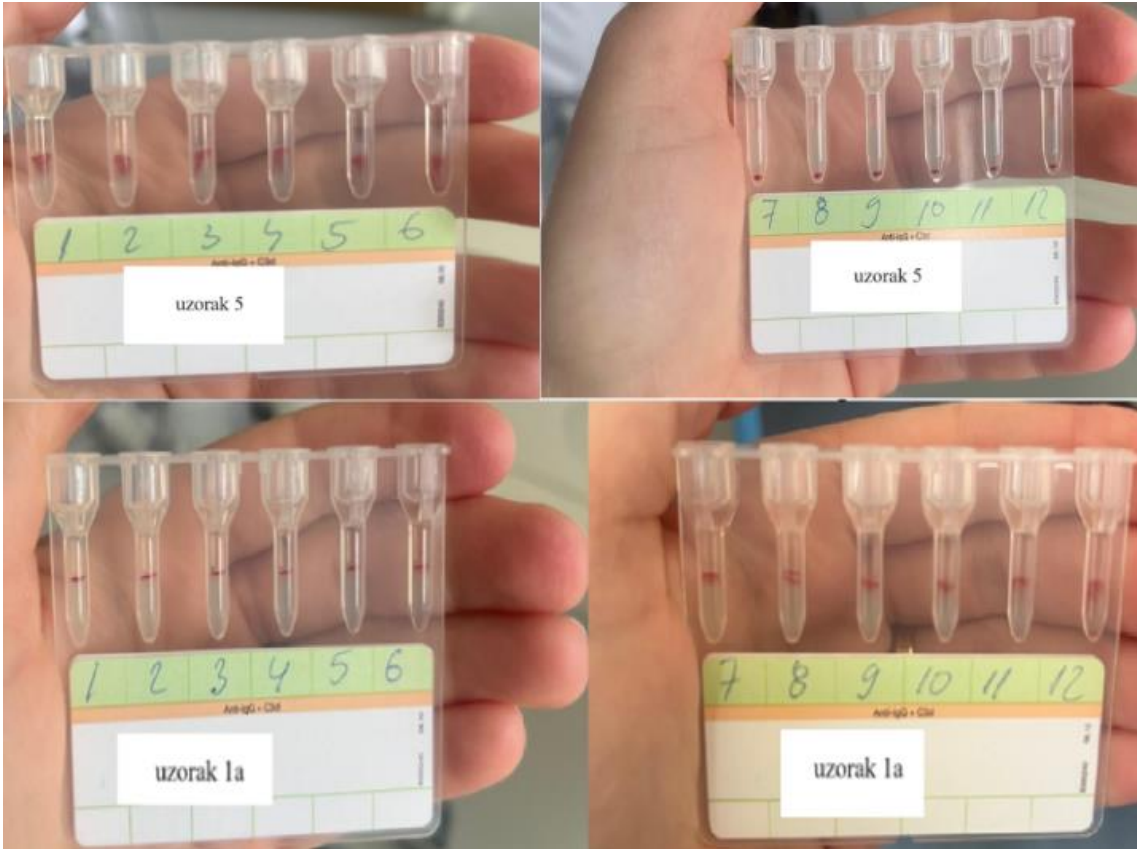


Slika 18. Rezultati uzoraka 5 i 1a u Ortho mikrometodi

Izvor: Zavod za transfuzijsku medicinu, KBC Split

4.3. Rezultati titracije Diamed mikrometodom

Diamed mikrometodom određuje se isključivo titar IgG protutijela. Brojčani rezultati prethodno su prikazani u tablici 6 i tablici 7, a na slici 19 prikazani su primjeri rezultata u mikrokarticama uzoraka 5 i 1a.



Slika 19. Rezultati uzoraka 5 i 1a u Diamed mikrometodi

Izvor: Zavod za transfuzijsku medicinu, KBC Split

5. RASPRAVA

U ovom radu uspoređujući vrijednosti titra antieritrocitnih protutijela rađenih klasičnom metodom u epruveti s vrijednostima titra u dvije mikrometode, Ortho i Diamed, utvrđeno je da klasična metoda u epruveti pokazuje manje vrijednosti titra i to, u odnosu na Ortho mikrometodu prosječno manje za 1,8, a u odnosu na Diamed mikrometodu manje za 1,7. Veće vrijednosti titra u mikrometodi u odnosu na epruvetu prisutne su kod većine uzoraka, ali ne kod svih. Razlike titra klasične metode i mikrometoda bile su u rasponu od nula do tri epruvete. Odnosno, vrijednosti titra u mikrometodi ne koreliraju većim vrijednostima jednako za sve uzorke. Prema tome, dobiveni rezultati zahtijevaju daljnje istraživanje u cilju standardizacije mikrometode, odnosno prije uvođenja testa, titar antieritrocitnih protutijela u mikrometodi.

Rezultati istraživanja podudaraju se s rezultatima Flesiopoulou i sur. Autori studije uspoređivali su osjetljivost mikrometoda (Bio-Rad i Grifols) s klasičnom metodom u epruveti. Istraživanje je provedeno na 137 uzoraka te je utvrđeno da gel mikrometode imaju veću osjetljivost i mogu detektirati protutijela koja klasična metoda u epruveti propušta. S druge strane, uočeno je da istovremeno gel metode imaju nižu specifičnost zbog njihove veće osjetljivosti (24).

Slične nalaze pokazuju Dubey i sur. koji su uspoređivali Diamed mikrometodu s klasičnom metodom na 50 uzoraka. Utvrdili su da mikrometode imaju veću osjetljivost i pokazuju jaču reaktivnost u usporedbi s klasičnom metodom u epruveti, iako s većom varijabilnošću. Titar u mikrometodi bio im je duplo do četveroduplo veći u odnosu na klasičnu metodu. Međutim, naglašavaju da mikrometoda ima značajno bolju reproducibilnost u odnosu na klasičnu metodu. Ova usporedba dodatno podupire hipotezu da gel metode mogu pružiti osjetljiviju detekciju, ali zahtijevaju pažljivu interpretaciju kako bi se izbjegla precijenjenost titra protutijela (42). Veća osjetljivost mikrometoda, zabilježena je u oba istraživanja, te autori preporučuju korištenje mikrometoda zbog njihove veće osjetljivosti, ali uz oprez pri interpretaciji rezultata (24, 42). Postoji niz sličnih studija provedenih na većem broju uzoraka koji potvrđuju naše rezultate te navode veću osjetljivost mikrometoda i naglašavaju njihove prednosti (33, 43, 44).

Autori kao objašnjenje više vrijednosti titra u mikrometodi u usporedbi s metodom u epruveti navode više razloga. Novaretti i sur., koji su uspoređivali Diamed mikrometodu s klasičnom u 79 uzoraka, navode kako bi problem mogao biti LISS kao razrjeđivač koji zahtijeva kraću inkubaciju i pokazuje varijabilnost u detekciji antieritrocitnih protutijela. (33). LISS kao komponentu koja može utjecati na varijabilnost titrova navode i Adriaansen i sur. u sličnoj studiji proučavajući iste metode na 42 uzorka (43). Loschmann i sur. su uspoređujući Diamed mikrometodu s klasičnom metodom u 20 uzoraka plazmafereze utvrdili da se klasičnom metodom mogu dobiti lažno negativni rezultati kod slabih reakcija zbog interindividualnih razlika u očitavanju rezultata (44). Isto tako, u mikrometodama su veći omjeri seruma i suspenzije eritrocita, a time i veći omjeri protutijela i eritrocita. Zatim, klasičnom metodom u epruveti eritrociti se nakon inkubacije peru, dok se u mikrometodama ne peru. Tijekom postupka pranja dio protutijela, posebno onih koja su slabije vezana za eritrocite će eluirati što će rezultirati manjim titrom do negativnim rezultatom. Upravo ova činjenica može biti objašnjenje zašto pozitivitet ne korelira jednako kod svih uzoraka. Sljedeća prednost mikrometoda je u tome što su standardizirane čime se eliminiraju ljudske pogreške. Titar u epruveti je semikvantitativna metoda, gdje najveća razlika nastaje prilikom očitavanja rezultata odnosno trešnje i interpretacije rezultata. Konačno možemo reći da mikrometode mogu riješiti problem standardizacije, reproducibilnosti i automatizacije određivanja titra protutijela.

Važno je napomenuti da, iako mikrometode još nemaju utvrđene granične titre, rezultati ovog istraživanja pokazuju značajnu korelaciju između metoda. No, tendencija mikrometoda da prikazuju više titre mora biti dodatno istražena kako bi se utvrdilo je li to zbog tehničkih karakteristika metoda ili inherentnih razlika u detekciji protutijela. Na primjer, trudnice koje bi prema klasičnoj metodi imale subklinički značajne titre, mogle bi prema mikrometodama biti klasificirane kao klinički značajno imunizirane, što bi moglo dovesti do nepotrebnog intenziviranja praćenja ili terapije (29). Loschmann i sur. predložili su granični titar u mikrometodama 1:64 budući da je pokazano da mikrokartice pokazuju pozitivitet u prosjeku 0,8 razrjeđenja viši od metode u epruveti (44). Potrebna su daljnja istraživanja na većem uzorku kako bi se ovaj nalaz implementirao u praksu. Isto tako su potrebna slična istraživanja za ostala klinički značajna protutijela kako bi se bolje definirali njihovi granični titri.

U ovom istraživanju pokazano je da se metodom u epruveti mogu razlikovati kompletna (IgM) od inkompletnih (IgG) protutijela, dok se mikrometodama određuje isključivo titar IgG protutijela. Ovo je važno za kliničku primjenu jer IgG protutijela imaju značajniju ulogu u imunizaciji trudnica.

U kliničkom smislu, rezultati ponovnog testiranja trudnica 1 i 2 daju važne informacije o tijeku imunizacije i odgovoru na liječenje. Ponovno testiranje omogućava praćenje promjena u razinama protutijela, što je ključno za pravovremeno reagiranje. Trudnica 1 ima izrazito visoke titre protutijela u oba testiranja. Stalnost titra u epruveti (1:256) sugerira da nema značajnog povećanja količine anti-D protutijela, što je dobar znak u smislu da imunizacija nije progresivna. To ukazuje na kontroliranu situaciju što je povoljno za nastavak trudnoće, ali je potrebno praćenje situacije. Za trudnicu 2, smanjenje ili nestanak anti-Jka protutijela je vrlo povoljno, sugerirajući uspješno upravljanje imunizacijom i smanjen rizik za fetus. Rezultati su važni za donošenje odluka o daljnjem praćenju i eventualnim terapijama tijekom, ali i profilaksom prije sljedeće trudnoće.

Zaključno, rezultati ovog istraživanja ukazuju na visok potencijal mikrometoda kao pouzdanog alata za određivanje titra antieritrocitnih protutijela kod imuniziranih trudnica, uz važnu napomenu da više vrijednosti titra trebaju biti uzete u obzir pri interpretaciji. Daljnje studije trebale bi se usmjeriti na definiranje graničnih vrijednosti titra za mikrometode i standardizaciju protokola za kliničku upotrebu.

6. ZAKLJUČAK

Uspoređujući klasičnu metodu u epruveti s mikrometodama, dobiveni rezultati pokazuju da mikrometode (Ortho i Diamed) zaista pokazuju veće titre protutijela. Ova razlika je dosljedna kroz sve uzorke, potvrđujući osjetljivost mikrometoda. Dokazano je da su mikrometode osjetljivije od metode u epruveti. Usporedbom titra protutijela, rezultati su pokazali veće vrijednosti u mikrometodama, što potvrđuje veći omjer seruma i suspenzije eritrocita u tim metodama.

U ovom istraživanju potvrđeno je da se metodom u epruveti mogu razlikovati kompletna (IgM) od inkompletnih (IgG) protutijela, dok se mikrometodama određuje isključivo titar IgG protutijela. Ovo je važno za kliničku primjenu jer IgG protutijela imaju značajniju ulogu u imunizaciji trudnica.

Razlike u vrijednostima titra protutijela između metoda upućuju na potrebu standardizacije i pažljivog odabira metode u kliničkoj praksi, osobito u prenatalnoj skrbi gdje je precizna detekcija i kvantifikacija protutijela ključna za pravovremeno prepoznavanje i liječenje HBFN-a. Uzorci s visokim titrom protutijela pokazuju veće varijacije između metoda, što sugerira da bi mikrometode mogle biti korisnije u praćenju trudnica s visokim rizikom. S druge strane, razlike u osjetljivosti za niske titreve ukazuju na potrebu dodatnog istraživanja i potencijalne kombinacije metoda kako bi se osigurala najviša razina skrbi za trudnice.

Iako su rezultati obećavajući, buduća istraživanja trebaju uključivati veći broj uzoraka i trudnica kako bi se potvrdili ovi preliminarni nalazi i omogućilo usvajanje najpouzdanijih metoda u kliničku praksu. Standardizacija protokola i kontinuirana edukacija zdravstvenih djelatnika o prednostima i ograničenjima svake metode također su ključni za poboljšanje ishoda liječenja i osiguranje optimalne prenatalne skrbi.

Ova studija je pokazala da mikrometode imaju značajan potencijal kao pouzdan alat za određivanje titra antieritrocitnih protutijela, što je posebno važno za praćenje trudnica s rizikom od imunizacije. Mikrometode pružaju brže i jednostavnije rezultate uz manju količinu reagensa i uzoraka, što ih čini praktičnijima za upotrebu u kliničkoj praksi.

7. LITERATURA

1. Mitra R, Mishra N, Rath GP. Blood groups systems. *Indian J Anaesth.* 2014.;58(5):524–8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4260296/>
2. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M. *Imunologija.* Medicinska naklada; 2010.
3. Starčević M, Sović D, Dodig J, Zah-Mataković V, Zakanj Z. Teška hemolitička bolest novorođenčeta uzrokovana anti-K protutijelom. *Paediatrica Croatica.* 2008.;52(4):249–51. <https://hrcak.srce.hr/34971>
4. ISBT. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology | ISBT Working Party0. <https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html>
5. Dean L. The ABO blood group. U: *Blood Groups and Red Cell Antigens.* National Center for Biotechnology Information (US); 2005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2267/>
6. Hemolytic Disease | Boston Children's Hospital. <https://www.childrenshospital.org/conditions/hemolytic-disease>
7. Minuk L, Clarke G, Lieberman L. Approach to red blood cell antibody testing during pregnancy. *Can Fam Physician.* 2020.;66(7):491–8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7365158/>
8. Hundrić Hašpl Ž. Poslijetransfuzijske hemolitičke reakcije. *Liječ vjesn. ožujak* 2014.;136(supplement 1):149–51.
9. Erickson ML. Chapter 9 - Alloimmunization in Pregnancy. *Immunologic Concepts in Transfusion Medicine,* Elsevier; 2020. str. 149–65. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323675093000093>
10. Porrett PM. Biologic mechanisms and clinical consequences of pregnancy alloimmunization. *American Journal of Transplantation.* 2018.;18(5):1059–67. [https://www.amjtransplant.org/article/S1600-6135\(22\)09524-7/fulltext](https://www.amjtransplant.org/article/S1600-6135(22)09524-7/fulltext)
11. Dumitru A, Gica N, Botezatu R, Peletecu G. Prognosis and Management in Subsequent Rh Alloimmunized Pregnancies. *Maedica (Bucur).* 2021.;16(4):681–4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8897780/>
12. Starčević M, Mataija M, Sović D, Dodig J, Matijević R, Kukuruzović M. Važnost antenatalne imunopofilakse u prevenciji hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta. *Acta medica Croatica : Časopis Akademije medicinskih znanosti Hrvatske.* 2011.;65(1):49–54. <https://hrcak.srce.hr/clanak/128191>
13. Myle AK, Al-Khattabi GH. Hemolytic Disease of the Newborn: A Review of Current Trends and Prospects. *Pediatric Health Med Ther.* 2021.;12:491–8. <https://doi.org/10.2147/PHMT.S327032>

14. Dean L. Hemolytic disease of the newborn. U: Blood Groups and Red Cell Antigens. National Center for Biotechnology Information (US); 2005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2266/>
15. Eder AF. Update on HDFN: new information on long-standing controversies. *Immunohematology*. 2006.;22(4):188–95. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17430078/>
16. Krywko DM, Yarrarapu SNS, Shunkwiler SM. Kleihauer Betke Test. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430876/>
17. McBain RD, Crowther CA, Middleton P. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015. ;2015(9):CD000020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7061251/>
18. Liembruno GM, D'Alessandro A, Rea F, Piccinini V, Catalano L, Calizzani G, i ostali. The role of antenatal immunoprophylaxis in the prevention of maternal-foetal anti-Rh(D) alloimmunisation. *Blood Transfus*. 2010.;8(1):8–16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2809506/>
19. Bowman JM, Pollock JM. Antenatal prophylaxis of Rh isoimmunization: 28-weeks' -gestation service program. *Can Med Assoc J*. 1978.;118(6):627–30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1818036/>
20. Thornton JG, Page C, Foote G, Arthur GR, Tovey LA, Scott JS. Efficacy and long term effects of antenatal prophylaxis with anti-D immunoglobulin. *BMJ*. 1989. ;298(6689):1671–3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1836780/>
21. Theis SR, Hashmi MF. Coombs Test.. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547707/>
22. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Appendix I. Immunologists' Toolbox. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* 5th edition. Garland Science; 2001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10755/>
23. Basavarajegowda A, Shastry S. Pretransfusion Testing. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585033/>
24. Flesiopoulou I, Pouliakis A, Politou M, Dourouki A, Damaskos C, Koutsouri T, i ostali. Red Blood Cell Alloantibody Titration - Does the Titration Method Matter? *Clin Lab*. 2020.;66(6). <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2019.191021>
25. Bio-Rad Laboratories, Inc. Titration Procedures - A Guide to Good Laboratory Practices. 2019.
26. Antibody Titer - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/antibody-titer>

27. Cacciatore A, Rapiti S, Carrara S, Cavaliere A, Ermito S, Dinatale A, i ostali. Obstetric management in Rh alloimmunized pregnancy. *J Prenat Med.* 2009.;3(2):25–7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3279102/>
28. Brecher ME. Technical manual, 15th edition. American Association of Blood Banks; 2015.
29. Thakur M, Marwaha N, Kumar P, Saha S, Thakral B, Sharma R, i ostali. Comparison of gel test and conventional tube test for antibody detection and titration in D-negative pregnant women: Study from a tertiary-care hospital in North India. *Immunohematology / American Red Cross.* 2010.;26:174–7. <https://sciendo.com/article/10.21307/immunohematology-2019-216>
30. Judd WJ, Steiner EA, Knafl PC. The gel test: sensitivity and specificity for unexpected antibodies to blood group antigens. *Immunohematology.* 1997.;13(4):132–5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15387766/>
31. Delaflor-Weiss E, Chizhevsky V. Implementation of Gel Testing for Antibody Screening and Identification in a Community Hospital, a 3-Year Experience. *Laboratory Medicine.* 2005.;36(8):489–92. <https://doi.org/10.1309/JAP6EC69BAAUG9B3>
32. Judd WJ. Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited. *Transfusion.* 2001.;41(11):1445–52. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1537-2995.2001.41111445.x>
33. Novaretti MCZ, Silveira EJ, Filho EC, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone D a. F. Comparison of tube and gel techniques for antibody identification. *Immunohematology.* 2000.;16(4):138–41. <https://sciendo.com/article/10.21307/immunohematology-2019-595>
34. DiaMed GmbH. ID-Titration Solution. Instructions for Use. Version 02. Bio-Rad Laboratories, Switzerland; 2022.
35. Park E, Jo K, Shin JW, Park R, Choi T, Bang HI, i ostali. Comparison of Total and IgG ABO Antibody Titers in Healthy Individuals by Using Tube and Column Agglutination Techniques. *Annals of laboratory medicine.* 2014.;34:223–9. <https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.3.223>
36. Lance AWI, Huy P. Clinical Principles of Transfusion Medicine. Antibody Screening - an overview | ScienceDirect Topics. 2018. <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/antibody-screening>
37. Swarup D, Dhot P, Kotwal J, Verma A. Comparative Study of Blood Cross Matching Using Conventional Tube and Gel Method. *Med J Armed Forces India.* 2008.;64(2):129–30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4921578>
38. Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, i ostali. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion.* 1990. ;30(2):109–

13. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1537-2995.1990.30290162894.x>
39. Blomme S, De Maertelaere E, Verhoye E. A comparison of three column agglutination tests for red blood cell alloantibody identification. *BMC Res Notes*. 2020.;13(1):129. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-04974-x>
40. Sawierucha J, Posset M, Hähnel V, Johnson CL, Hutchinson JA, Ahrens N. Comparison of two column agglutination tests for red blood cell antibody testing. *PLOS ONE*. 2018.;13(12):e0210099. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0210099>
41. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A New Test for the Detection of Weak and “Incomplete” RH Agglutinins. *Br J Exp Pathol*. 1945.;26(4):255–66. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2065689/>
42. Dubey A, Sonker A, Chaudhary RK. Comparative evaluation of gel column agglutination and erythrocyte magnetized technology for red blood cell alloantibody titration. *Immunoematology*. 2015.;31(1):1–6. <https://sciendo.com/article/10.21307/immunoematology-2019-063>
43. Adriaansen MJ, Perry H. Validation of column agglutination technology for blood group alloantibody titration. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science*. 2013.;67:92–6. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:53316676>
44. Loschmann TM, Patel M, Garrett NK, Perry HE. Comparison of tube and column agglutination technique for the quantification of blood group antibody anti-D by titration. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science*. 2023.;77(1):24–7. <https://search.informit.org/doi/abs/10.3316/informit.925084088997770>

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODATCI

- ▶ ime i prezime: **Dora Brnada**
- ▶ datum i mjesto rođenja: 9. lipnja 1995., Split

OBRAZOVANJE

- ▶ **Osnovna škola Žrnovnica** (2002. – 2010.)
- ▶ **Zdravstvena škola Split** (2010. – 2014.) – smjer **zdravstveno laboratorijski tehničar**
- ▶ **Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Split** (2020. – 2024.) – preddiplomski sveučilišni studij **medicinsko laboratorijske dijagnostike**

RADNO ISKUSTVO

- ▶ **Pripravnički staž KBC Split** (2015. – 2016.)
 - ⇒ medicinska biokemija, hematologija s koagulacijom, mikrobiologija, transfuzijska medicina
- ▶ **Medicinsko-biokemijski laboratorij Delić-Bilić, Split** (2018.)
 - ⇒ laboratorijski tehničar
- ▶ **Poliklinika LabPlus, Split** (2018. – 2019.)
 - ⇒ laboratorijski tehničar
- ▶ **Zavod za transfuzijsku medicinu KBC Split** (2.7.2019. – u tijeku)
 - ⇒ laboratorijski tehničar

OSOBNİ VJEŠTINE

- ▶ jezici:
 - ⇒ materinski jezik: **hrvatski**
 - ⇒ strani jezici: engleski
- ▶ samostalan rad na računalu, Microsoft Office
- ▶ vozačka dozvola B kategorije