

# Indirektni antiglobulinski test u mikrohemaglutinacijskoj metodi i klasičnoj metodi u epruveti

---

Raljević, Bruna

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:176:209974>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



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

**Bruna Raljević**

**INDIREKTNI ANTIGLOBULINSKI TEST U  
MIKROHEMAGLUTINACIJSKOJ METODI I KLASIČNOJ  
METODI U EPRUVETI**

**Završni rad**

Split, 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Bruna Raljević**

**INDIREKTNI ANTIGLOBULINSKI TEST U  
MIKROHEMAGLUTINACIJSKOJ METODI I KLASIČNOJ  
METODI U EPRUVETI**

**INDIRECT ANTIGLOBULIN TEST IN  
MICROHEMAGGLUTINATION METHOD AND CLASSIC  
TUBE METHOD**

**Završni rad/Bachelor's Thesis**

**Mentor:**

**Doc. dr. sc. Slavica Dajak**

Split, 2017.

## **SKRAĆENICE:**

AIHA- Autoimuna hemolitička anemija

AHG- Antihumani globulin

DAT- Direktni antiglobulinski test

EDTA- Etilendiaminotetraoctena kiselina

HAT- Hipoksantin- aminopterin- timidin

HBN- Hemolitička bolest novorođenčeta

HTR- Hemolitička transfuzijska reakcija

IAT- Indirektni antiglobulinski test

IHA- Imunosna hemolitička anemija

LISS- Low ionic strength solution (otopina niske ionske jakosti)

PCR- Polymerase chain reaction (lančana reakcija polimerazom)

PEG- Polietilenglikol

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	Uvod u transfuzijsku medicinu .....	1
1.2.	Imunohematološka ispitivanja .....	2
1.3.	Faktori koji utječu na aglutinaciju.....	4
1.3.1.	Kemijske veze .....	4
1.3.2.	Ekvilibrij .....	4
1.3.3.	Temperatura.....	5
1.3.4.	pH .....	5
1.3.6.	Ionska jakost.....	6
1.3.7.	Omjer antigena i protutijela .....	6
1.4.	Antiglobulinski test.....	7
1.5.	Antiglobulinski reagens .....	7
1.5.1.	Proizvodnja antihumanog globulina.....	8
1.7.	Dodaci za bolju detekciju protutijela.....	12
1.7.1.	Albumin .....	12
1.7.2.	Enzimi .....	12
1.7.3.	Pozitivno nabijene molekule .....	14
1.7.4.	Polietilenglikol .....	14
1.7.5.	Otopina niske ionske jakosti.....	14
1.6.	Najvažnija primjena indirektnog antiglobulinskog testa .....	15
1.6.1.	Prijetransfuzijsko ispitivanje.....	15
1.6.2.	Ispitivanje antieritrocitnih protutijela kod trudnica .....	17
1.6.3.	IAT u drugim indikacijama .....	17
1.7.	Izvori pogrešaka u indirektnom antiglobulinskom testu.....	18
1.8.	Metode za određivanje IAT-a .....	19
2.	CILJEVI RADA .....	21
3.	MATERIJALI I METODE.....	22
3.1.	Mjesto i vrijeme istraživanja .....	22
3.2.	Pribor i materijali.....	22
3.3.	Opis aktivnosti .....	23
3.4.	Tumačenje rezultata indirektnog antiglobulinskog testa.....	25

5.	RASPRAVA.....	30
6.	ZAKLJUČCI.....	32
9.	SUMMARY .....	36

# 1. UVOD

## 1.1. Uvod u transfuzijsku medicinu

Povijest transfuzijske medicine seže daleko u prošlost. Još u starom Egiptu krv su smatrali izvorom života. Prije 2500 godina bolesnici u Egiptu liječeni su puštanjem krvi. Ispuštanjem, kupanjem ili ispijanjem krvi pokušavalo se mijenjati karakter i svojstva čovjeka. Od tada primjena krvi u liječenju bolesnika je postala predmetom interesa raznih proučavanja. Međutim, transfuzijsko liječenje je moralo čekati otkrića cirkulacije krvi, krvnih grupa i stvaranje tehnoloških uvjeta za svoj potpuni razvoj. Kroz stoljeća koja su uslijedila mnogi su znanstvenici pokušali transfuzirati i izmijeniti staru krv novom krvi. Ti su pokušaji malokad bili uspješni. Godine 1818. James Blundell je, oko 200 godina nakon otkrića cirkulacije, opisao transfuzijsko liječenje u kojem je krv nekolicine svojih kolega pomiješao i transfuzirao bolesniku zvanom Brazier. Tom transfuzijom započinje prava povijest transfuzijske medicine. Transfuzijska medicina obuhvaća sve postupke od uzimanja krvi od dobrovoljnog davatelja, imunohematološkog i serološkog ispitivanja, proizvodnje krvnih pripravaka, i liječenja bolesnika, odnosno sve radnje od davateljeve vene do bolesnikove vene. Transfuzijska se medicina razlikuje od drugih medicinskih struka. Središnji interes svih medicinskih struka je bolesnik, a u transfuzijskoj medicini jednako su značajni bolesnik i davatelj krvi. U takvom liječenju postoje čak tri interesne skupine: davatelji, bolesnici i zdravstveni djelatnici koji imaju ulogu posrednika. (1)

Ciljevi transfuzijske medicine su:

- Osiguranje dovoljnog broja krvnih pripravaka i drugih lijekova koji se proizvode od ljudske krvi,
- Učinkovito transfuzijsko liječenje,
- Liječenje koje neće uzrokovati nuspojave, pobol ili smrt,
- Jednako liječenje za sve bolesnike bez obzira na mjesto boravka ili socijalno-ekonomski status
- Ekonomičnost u liječenju. (1)

Usprkos velikom oprezu i strogom pravilniku o ponašanju, u transfuzijskom liječenju povremeno nastaju nuspojave. One nisu jako učestale, ali znaju biti veoma pogubne pa se u novije vrijeme sve više ulaže u prijetransfuzijska ispitivanja i testove. Svaki novi postupak ima definiranu i ograničenu primjenu, a za njihovo uvođenje potrebna su velika materijalna i ljudska sredstva. Međutim, od presudne je važnosti da krvni pripravak koji će se koristiti u liječenju bude siguran u tolikoj mjeri da ne može naštetiti pacijentu. Upravo zbog toga ne treba štedjeti ni vremena ni novca koji se utroše na prijetransfuzijsko ispitivanje. (1)

## 1.2. Imunohematološka ispitivanja

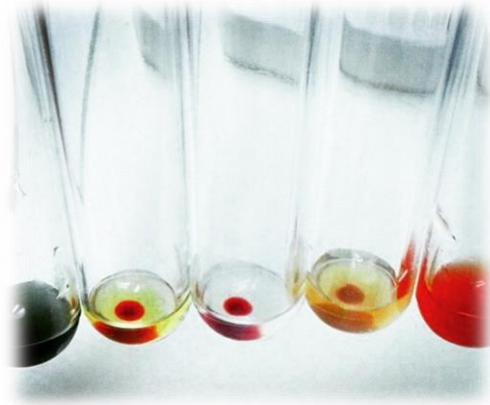
U laboratoriju se provode imunohematološka ispitivanja kojima se prije transfuzije krvi s velikom vjerojatnošću dokazuje da transfuzirani bolesnik neće imati nuspojava uzrokovanih davateljevim eritrocitima. Princip imunohematoloških ispitivanja je reakcija između antigena na davateljevim eritrocitima i protutijela u pacijentovom serumu ili plazmi. Kombinacija ovakve reakcije može izazvati vidljive rezultate na kraju testova poput aglutinacije i hemolize koje su ujedno i pozitivni rezultati ovih ispitivanja. (1)

**Aglutinacija** je reakcija između protutijela i antigena na eritrocitima. Protutijela vezanjem za antigene na eritrocitima stvaraju mostove, time i vidljive nakupine stanica (Slika 1.). (2) Antieritrocitna protutijela dijelimo na kompletna i inkompletna. Samo vezanje kompletnih, IgM protutijela uzrokuje aglutinaciju eritrocita. Inkompletna, IgG protutijela, iako se vežu za eritrocite, ne mogu sama premostiti udaljenost između eritrocita, nego za to trebaju određene „pomagače“ (antiglobulinski reagens ili AHG). Razlog tomu je građa spomenutih imunoglobulina. Svi imunoglobulini su građeni od četiri polipeptidna lanca. Dva jednaka teška i dva jednaka laka lanca su povezana disulfidnim vezama. IgM je građen kao pentamer i mnogo je veći od IgG-a koji je monomer pa zbog toga može premostiti potencijal odbijanja (zeta potencijal) eritrocita. (3)

**Hemoliza** je puknuće eritrocitne membrane uzrokovano aktiviranjem komponenti komplekta pri kojem se oslobađaju unutarstanične komponente ovih stanica (Slika 2.). Aktiviraju ih određena protutijela, ali ovisi i o osobinama antigena. (2) Primjerice, prirodna (IgM) protutijela aktiviraju komplement do kraja kaskade i uzrokuju intravaskularnu hemolizu, dok imuna (IgG) protutijela mogu ali i ne moraju aktivirati komplement. IgG protutijela uzrokuju isključivo ekstravaskularnu hemolizu. (3)



Posljednjih desetljeća su, osim ovih tehnika, uvedene i tehnike poput imunoprecipitacije, enzimatskog imunotesta, fluorescencije i lančane reakcije polimerazom (PCR). Ipak, nedvojbjeni vladar u rutinskom ispitivanju, ostaje aglutinacija zbog svoje jednostavnosti, brzine i osjetljivosti. (1)



**Slika 1. Aglutinacija u epruveti**

Izvor: WEB (11)



**Slika 2. Hemoliza u epruveti**

Izvor: WEB (12)

### **1.3. Faktori koji utječi na aglutinaciju**

Aglutinacija je reverzibilna pojava koja se odvija u dvije faze:

1. Senzibilizacija, vezanje protutijela za površinu eritrocita.
  2. Formiranje mostova među senzibiliziranim stanicama kako bi se stvorili vidljivi aglutinati.
- Mnogi faktori utječu na ove dvije faze i mogu poboljšati ili spriječiti aglutinaciju crvenih krvnih stanica. (2)

#### **1.3.1. Kemijske veze**

Kemijske veze između antigena i protutijela od velike su važnosti za imunohematološka ispitivanja. To su najčešće slabe (nekovalentne) veze i uključuju vodikove, hidrofobne, ionske i van der Waalsove veze. One imaju različita termodinamička svojstva koja je iznimno važno poštovati pri izvođenju određenog testa kako bi se osigurao što bolji i točniji rezultat. Primjerice, ugljikovodični antigeni stvaraju sa protutijelima vodikove veze koje su egzotermne. To znači da bolje reagiraju i da su jače pri nižim temperaturama. S druge strane, proteinski antigeni stvaraju s protutijelima hidrofилne veze koje su endotermne pa bolje reagiraju na višim temperaturama.(2)

#### **1.3.2. Ekvilibrij**

Kao što je već spomenuto, reakcija između antigena i protutijela je reverzibilna, što znači da se veze među njima stalno prekidaju i stvaraju. To traje sve dok se ne postigne stanje ekvilibrija. Ekvilibrij je zapravo konstanta afiniteta reakcije i označava se  $K_0$ .  $K_0$  je različita za svaku reakciju. Što je konstanta veća, bolja je asocijacija reakcije i reakcija je brža. Nastali produkt (kompleks Ag-At) na taj način teže disocira. Ako je  $K_0$  mala, potreban je mnogo veći udio vezanja antigena i protutijela da bi se detektirao. Na ekvilibrij utječe vrsta veze koja prevladava u reakciji. Tako su na primjer hidrofobne veze najčešće povezane sa višom  $K_0$  od vodikovih veza. Na  $K_0$  također utječu i fizikalni uvjeti reakcije. Tu ubrajamo temperaturu, pH, ionsku jakost medija, te omjer koncentracije antigena i protutijela. Fizikalne uvjete je posebno

važno zadovoljiti kad je završna točka reakcije aglutinacija. Postizanjem pravih uvjeta može se jako povećati osjetljivost testa. (2)

#### Jednadžba ekvilibrija:



\* $k_a$ -konstanta asocijacije

\* $k_d$ - konstanta disocijacije

### 1.3.3. Temperatura

Većina protutijela krvnih grupa reagiraju unutar točno određenog temperaturnog raspona. Prema tome, najčešće ih dijelimo u dvije kategorije: ona koja reagiraju na „hladnim“ temperaturama (4-25 °C) i ona koja reagiraju na „toplim“ temperaturama (30-37 °C). Protutijela koja *in vitro* reagiraju sa temperaturama manjima od 30 °C rijetko uzrokuju razaranje eritrocita i općenito se smatraju klinički manje značajnima. To su pretežno protutijela IgM klase. IgG klasa je reaktivna na tjelesnoj temperaturi. Ovo često dovodi do pogrešnog zaključka da vrsta imunoglobulina određuje temperaturu na kojoj će se odvijati reakcija. Naime, to je više povezano sa kemijskim vezama reakcije. Primjerice, ugljikovodični antigeni se povezuju sa „hladnim“ protutijelima dok se proteinski antigeni povezuju sa „toplim“. (2)

### 1.3.4. pH

Promjene pH reakcijske smjese mogu utjecati na elektrostatske veze. Za većinu klinički značajnih protutijela, optimalni pH nije određen. Pretpostavlja se da je otprilike jednak fiziološkim uvjetima, pa se najviše koristi područje oko 7.0. Pohranjena fiziološka otopina ima pH 5.0-6.0, pa se u serološkim testiranjima koristi puferirana otopina. Povremeno neka protutijela reagiraju u drugačijim pH uvjetima. Primjerice anti-M protutijelo reagira na nižim pH vrijednostima.(2)

### **1.3.5. Vrijeme inkubacije**

Reakcijsku smjesu je važno inkubirati kako bi se osiguralo vrijeme za postizanje ekvilibrija. Koliko će za to vremena biti potrebno ovisi o nekoliko faktora: 1. temperaturni zahtjevi, 2. klasa imunoglobulina i 3. specifična reaktivnost između antigenske determinante i Fab ulomka protutijela. Za testove u kojima se koristi AHG za dokaz klinički značajnih protutijela, inkubacija se odvija na 37 °C od 60 do 90 minuta. Za neka slabije reaktivna protutijela potrebno je produžiti vrijeme inkubacije, jer to pomaže osjetljivosti testa. Međutim, produženje inkubacije može imati i određene nedostatke. U transfuzijskoj medicini imunohematološka ispitivanja su često hitna i brzina izvođenja testova je od velike važnosti, a produženje inkubacije samo odgađa izdavanje konačnih rezultata. Zato se u novije vrijeme sve više koriste određeni dodaci koji smanjuju vrijeme inkubiranja. Tada se posebno mora paziti da pri određenim dodacima (otopina niske ionske jakosti ili LISS) ne produžujemo inkubaciju iznad dozvoljene, jer tako smanjujemo osjetljivost testa. (2)

### **1.3.6. Ionska jakost**

U normalnim fiziološkim uvjetima, ioni natrija i klora kruže uokolo i neutraliziraju veze na antigenima i protutijelima. To otežava njihovo povezivanje. Smanjenjem ionske jakosti medija u kojem se reakcija odvija, taj efekt neutralizacije može biti oslabljen. Reduciranjem koncentracije soli u smjesi povećavamo elektrostatsku privlačnost među molekulama i omogućujemo da se antigeni i protutijela potpuno približe jedni drugima. Time raste broj ostvarenih veza Ag-At. (2)

### **1.3.7. Omjer antigena i protutijela**

Antigeni i protutijela moraju biti u točno određenom omjeru kako bi se reakcija odvijala što brže i što bolje. Višak protutijela u odnosu na antigene je poželjan u većini rutinskih testova. Kod indirektnog antiglobulinskog testa u epruveti stavljaju se dvije kapi (100 µl) seruma na jednu kap (50µl) 3-5% suspenzije eritrocita. Ako je neko protutijelo slabo reaktivno, povećanje udjela protutijela povećava razinu njegove detekcije. Veoma rijetko, povećanje tog udjela stvara „prozon efekt“. Efekt utječe na usporeno stvaranje kompleksa Ag-

At, a samim time utječe i na aglutinaciju. Ponekad je poželjno potpuno promijeniti volumen seruma, posebno kod istraživanja hemolitičkih anemija, ali se pri tome mora biti oprezan. Dodavanjem većih količina seruma, odnosno protutijela, utječemo na ionsku jakost otopine. Zbog toga se dodavanje LISS-a koji smanjuje tu jakost mora dobro uskladiti sa omjerom protutijela. (2)

#### **1.4. Antiglobulinski test**

Godine 1945. imunolog Robin Coombs je sa svojim suradnicima opisao proceduru za otkrivanje protutijela koja su se vezala na eritrocite. Ovaj test koristi protutijelo na ljudski imunoglobulin i poznat je kao antihumani globulin (AHG). Prvo je korišten kako bi dokazao protutijela u serumu, ali poslije je korišten i za dokazivanje *in vivo* vezanja protutijela ili komponenti komplementa na eritrocitima. Postoji, dakle, direktni antiglobulinski test (DAT) koji demonstrira *in vivo* senzibilizaciju crvenih krvnih stanica, te indirektni antiglobulinski test (IAT) koji dokazuje prisutnost antieritrocitnih protutijela u serumu ili plazmi. Princip testa veoma je jednostavan. Zasniva se na činjenici da su sva ljudska protutijela globulini. AHG je protutijelo proizvedeno imunim odgovorom neke životinje, usmjereno specifično na ljudsko protutijelo. U našem organizmu postoji nekoliko razreda imunoglobulina. Nisu svi od njih sposobni izazvati aglutinaciju odnosno vidljiv rezultat u ovom testu. Neki, poput IgG-a jednostavno su premaleni da bi premostili sile odbijanja koje prirodno postoje među eritrocitima. Upravo zbog takvih imunoglobulina ovom testu je potreban AHG reagens. On se veže na Fc ulomak vezanog protutijela, a dvije Fab strane AHG molekule čine most za senzibilizirane stanice čineći tako vidljive nakupine. Stanice na koje se protutijelo nije vezalo neće biti aglutinirane pa se mjerenjem jačine aglutinacije može zaključiti količina vezanih protutijela. (2)

#### **1.5. Antiglobulinski reagens**

Nekoliko AHG reagenasa može biti korišteno u antiglobulinskom testu. Postoje polispecifični i monospecifični reagensi. Oni su sastavljeni od različitih komponenti i dobiveni su različitim načinima. Polispecifični AHG sadrži protutijela na ljudski IgG i komponentu komplementa C3d. Druge komponente komplementa poput C4b i C4d također mogu biti prisutne. Komercijalno pripremljeni polispecifični AHG sadrže malo ili uopće ne

sadrže protutijela protiv IgA i IgM imunoglobulina. Najveći dio klinički značajnih protutijela pripada IgG klasi protutijela i upravo je ta komponenta (anti-IgG) AHG reagensa najvažnija. Anti-C3d komponenta je važna kod dijagnostike protutijela koja aktiviraju komplement. Monospecifični AHG reagens sadrži samo jednu specifičnu komponentu: ili IgG ili C3b ili C3d. Monospecifični anti-IgG je usmjeren na Fc ulomak gama teških lanaca IgG molekule i ne sadrži protutijelo na komponentu komplementa. Nekađ može biti usmjeren na lake lance, pa slijedom toga reagira sa IgM ili IgA molekulama, no to je vrlo rijetko. Monospecifični anti-C3d ili anti-C3b reagiraju samo sa označenim komponentama komplementa i nemaju aktivnost sa IgG protutijelima. (4)

### **1.5.1. Proizvodnja antihumanog globulina**

Klasične metode proizvodnje AHG-a uključuju injektiranje ljudskog seruma ili pročišćenog globulina u laboratorijsku životinju, najčešće zeca. Ljudski globulin se ponaša kao strani antigen, pa imuni sustav zeca odgovara stvaranjem protutijela na taj globulin. Primjerice, ako je injektiran IgG, stvorit će se anti-IgG. Ako je pak injektiran komplement, stvorit će se anti-komplement. Na ovaj način se dobiju protutijela koja su poliklonalna. To je mješavina protutijela nastalih od različitih klonova plazma stanica. Oni prepoznaju različite antigenske determinante, odnosno epitope. Hibridomska tehnika može biti korištena ukoliko želimo dobiti monoklonalna protutijela. To je homogena smjesa protutijela nastala od jednog klona hibridomske stanice. Prepoznaju samo jednu vrstu epitopa na antigenu. (4)

#### **a) Poliklonalni AHG**

Poliklonalni AHG je pravljen obično pomoću imunizacije laboratorijskih zečeva, no kad su potrebne velike količine reagensa mogu se koristiti i veće životinje, poput ovce ili koze. U početku su se ovim životinjama ubrizgavale sirove frakcije imunoglobulina kao imunogen, no moderni komercijalni pripravci koriste velike količine pročišćenog imunoglobulina iz običnog seruma. Konvencionalni polispecifični pripravak se dobiva imunizacijom zeca na IgG i na komponentu komplementa. Zbog heterogenosti IgG molekule, koristi se serum različitih donora kako bi se stvorio dovoljno dobar imunogen pri imunizaciji. To je od presudne važnosti za dobar reagens, jer je tako stvoreno protutijelo u stanju prepoznati više različitih IgG molekula. To je ujedno i prednost korištenja anti-IgG poliklonalnog podrijetla. Od

imunizirane životinje se izvuče uzorak krvi i testira se kvaliteta dobivenog reagensa. Provjerava se titar protutijela, aviditet i specifičnost, te se izračunava količina protutijela koja su spremna za uporabu. Jedan od nedostataka ovakvog načina dobivanja protutijela je da se ne može posebno ispitati kvaliteta pripravka za C3d i C3b. Moraju se ispitivati zajedno, pa takvo ispitivanje nije dovoljno točno. To se može izbjeći monoklonalnim produktima ovih komponenti. Kada su zadovoljene sve unaprijed određene karakteristike, produkcija dva odvojena pripravka (anti IgG i anti-C3 komponente) je dovršena. (4)

#### **b) Monoklonalni AHG**

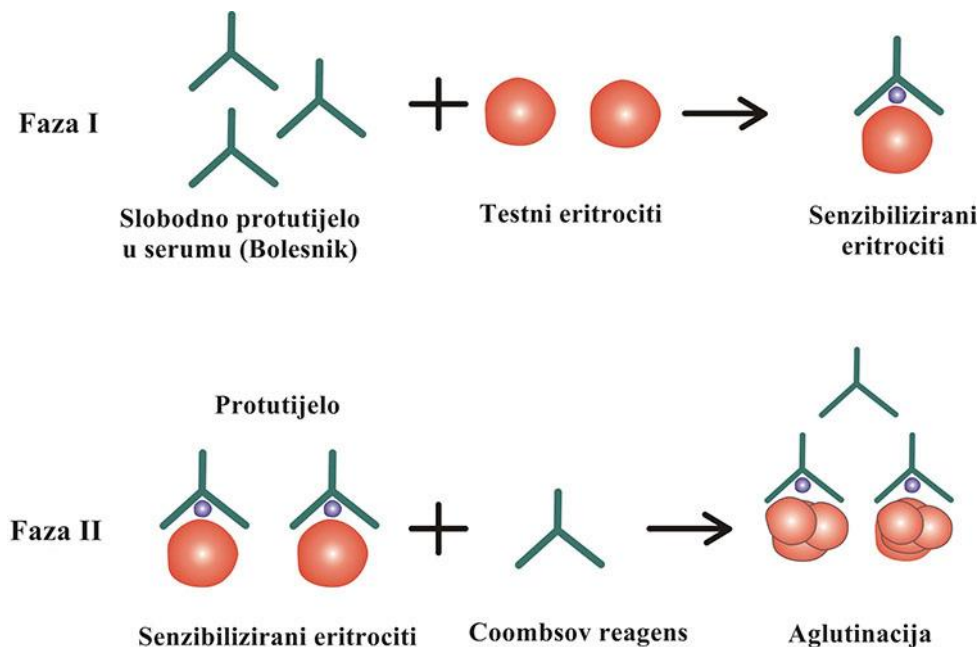
Monoklonalna produkcija protutijela započinje imunizacijom laboratorijskih miševa uz pomoć pročišćenog imunoglobulina. Nakon prikladnog imunog odgovora te životinje, stanice mišje slezene su spojene sa mijelomskom stanicom u hibridome. Stanice slezene sadrže limfocite koji mogu izlučivati protutijela, a mijelomska stanica posjeduje određene karakteristike pogodne za daljnju proizvodnju. Naime, mijelomska stanica je zapravo maligno transformirana plazma stanica koja hibridu daje „besmrtnost“. Te su stanice poznate po dugovječnosti jer im je apoptoza izmijenjena. Ovako stvoreni hibridi sadrže karakteristike obaju tipova stanica (besmrtnost i proizvodnju specifičnih protutijela). Nakon stvaranja hibrida, slijedi uzgoj u hipoksantin-aminopterin-timidin (HAT) mediju. On se koristi za probir određenog hibridoma iz mješavine stanica. U takvom mediju slobodni B limfociti podliježu staničnoj smrti, a mijelomske stanice ne mogu rasti u HAT mediju, tako da u mediju na kraju ostaju samo hibridomske stanice. Nakon toga se odabrani hibridomi prenose u mikrotitarske jažice kako bi se dobili klonovi. Zatim se ispituje specifičnost protutijela koju proizvodi određeni klon, a za daljnju proizvodnju se koriste samo oni koji stvaraju protutijela željene specifičnosti. Uzgoj odabranih klonova se provodi injektiranjem u histokompatibilnog miša, te sakupljanjem njegovog ascitesa. Nakon toga slijedi pročišćavanje dobivenih protutijela kako bi se neometano mogla koristiti u dijagnostičke svrhe. (4)

## 1.6. Indirektni antiglobulinski test

Uzorci za indirektni antiglobulinski test moraju biti uzeti u epruvete s antikoagulantnom otopinom (etilen tetra-octenom kiselinom/EDTA uzorak) ili u nativnu biokemijsku epruvetu. Antikoagulans sprječava zgrušavanje, ali se gubi aktivnost komplementa, dok je aktivnost komplementa sačuvana u nativnoj epruveti. (5) Indirektnim antiglobulinskim testom se dokazuje *in vitro* reakcija slobodnih protutijela i /ili komplementa s testnim eritrocitima.

IAT se primjenjuje kod:

1. testa pretraživanja antieritrocitnih protutijela,
2. identifikacije antieritrocitnih protutijela kod pozitivnog testa pretraživanja,
3. određivanja eritrocitnih antigena (slabi RhD antigen) ,
4. titracije inkompletnih protutijela,
5. križne reakcije. (1)



Slika 3. Shematski prikaz indirektnog antiglobulinskog testa

Izvor: WEB (13)



### 1.6.1. Testni eritrociti u IAT-u

Detekcija i identifikacija antieritrocitnih protutijela od velike je važnosti za osiguravanje sigurnog ishoda trudnoće, transfuzije i određenih bolesti. Za tu svrhu služi indirektni antiglobulinski test čiji se postupak ne bi mogao izvesti bez testnih eritrocita (Slika 4.). Testni eritrociti su suspenzija eritrocita krvne grupe 0 prikupljene od različitih davatelja krvi. Na njima se nalaze već poznati antigeni koji će eventualno reagirati sa protutijelima u pacijentovu serumu/plazmi. Panelu testnih eritrocita su dodane određene supstance koje služe kao stabilizatori. Kako bi se spriječila hemoliza i održala reaktivnost, dodani su purini (steroidi i nukleotidi) u diluent koji sadrži fosfatni citrat, a kloramfenikol, neomicin sulfat i gentamicin su dodani zbog sprječavanja bakterijske kontaminacije. (4)

Bočice sa testnim eritrocitima se čuvaju na temperaturi 2-8 °C i nikako se ne smiju zamrzavati. Prije upotrebe ih treba ostaviti na sobnoj temperaturi i dobro ih promiješati. Ne smije se miješati sadržaje dviju različitih bočica i zabranjeno je korištenje nakon isteka datuma koji je naznačen. (4)

Prilikom izvođenja IAT-a potrebna je posebna pažnja. Kod pretjeranog centrifugiranja, eritrociti čvrsto adheriraju na dno epruvete i potrebna je snažnija agitacija da ih se resuspendira. Pri tako snažnoj agitaciji sitni aglutinanti mogu biti raspršeni i dolazi do lažno negativnog rezultata. S druge strane, ako se centrifugira premalo, crvene krvne stanice nisu u stanju formirati „dugme“ na dnu i bistri supernatant pa to također dovodi do slabe ili negativne reakcije. Jako je važan i omjer između testnih eritrocita i seruma/plazme pacijenta. Klasičan omjer za epruvetu je: dvije kapi seruma/plazme (100µl) i jedna kap (50µl) testnih eritrocita. (4)



Slika 4. Bočice sa testnim eritrocitima. (14)

## 1.7. Dodaci za bolju detekciju protutijela

### 1.7.1. Albumin

Iako se dugo rutinski koristio za poboljšanu detekciju, albumin vjerojatno ne čini puno kad je riječ o iskorištenju protutijela. Njegovi efekti se mogu povezati sa otopinama niske ionske jakosti, jer se gotovo uvijek koristi u takvim puferima. On djeluje na način da smanjuje odbijanje među eritrocitima i tako potiče senzibilizirane stanice na aglutinaciju. (2)

### 1.7.2. Enzimi

Proteolitički enzimi koji se najviše koriste u imunohematološkim laboratorijima su bromelin, ficin, papain i tripsin. Oni su po kemijskom djelovanju hidrolaze, a po supstratu na

kojeg djeluju proteaze i glikozidaze. Dobivaju se ekstrakcijom iz raznog voća (Slika 5.a/b). Smanjuju antigensku površinu na crvenim krvnim stanicama cijepanjem polipeptida koji u sebi sadrže negativno nabijenu sijalinsku kiselinu. Ta kiselina je glavni stabilizator negativno nabijenoj mreži na eritrocitima. Svaka tvar koja uspije razbiti tu mrežu doprinosi poboljšanoj aglutinaciji. Upravo ovaj mehanizam djelovanja proteolitičkih enzima osigurava odvijanje reakcije u boljim uvjetima što posljedično rezultira i boljom detekcijom protutijela. (2)



**Slika 5.a. Enzim FICIN je dobiven iz ploda smokve**

Izvor: WEB (15)



**Slika 5.b. Enzim PAPAİN je dobiven iz ploda papaje**

Izvor: WEB (16)

### **1.7.3. Pozitivno nabijene molekule**

U prisustvu pozitivno nabijenih molekula kao što su heksadimetribromid (Polybren), protamin sulfat i poli-L-lizin, crvene krvne stanice normalno podliježu aglutinaciji. Razlog tomu je što one neutraliziraju negativni naboj eritrocita i smanjuju elektrostatske odbojne sile. Naboj je pak posljedica ostataka sijalinske kiseline na membranama tih stanica. Ovu teoriju podržava činjenica da Polybren ne pridonosi aglutinaciji stanica koje u sebi početno ne sadrže sijaličnu kiselinu. Pozitivno nabijene čestice se inkubiraju sa LISS-om i niskim pH. Ako se u ovakvom sustavu koristi AHG, pažnja mora biti usmjerena na lažno pozitivne rezultate koji su nekad zabilježeni. Molekule Polybrena uzrokuju smanjenu osjetljivost detekcije kad je riječ o Kell sustavu protutijela. (2)

### **1.7.4. Polietilenglikol**

Polietilenglikol (PEG) je topljivi linearni polimer korišten kako bi potencirao reakciju antigen-protutijelo. Mehanizam djelovanja zasniva se na steričnom isključenju molekule vode iz diluenta i omogućava molekulama antigena i protutijela da se maksimalno približe. Povećava se broj sudara tih čestica i posljedično veza među njima. Mnoga su istraživanja pokazala kako je PEG dobar u otkrivanju klinički značajnih protutijela i toplih autoprotutijela niske osjetljivosti. (2)

### **1.7.5. Otopina niske ionske jakosti**

Otopina niske ionske jakosti (LISS) jako povećava brzinu senzibilizacije eritrocita u usporedbi sa normalnom fiziološkom otopinom, zato što slabi zaštitni efekt iona i jača elektrostatsko privlačenje između antigena i protutijela. Tako posredno smanjuje vrijeme inkubacije. Inkubacija bez ovog dodatka traje više od 60 minuta, a sa LISS-om upola manje. To je velika prednost za što brže izdavanje rezultata. Da bi se spriječila liza stanica u tako niskom ionskom okruženju, LISS-u se dodaje glicin. Komercijalno pripravljene otopine nekad sadrže i aditive albumina, ionske soli te pufere. Kada su volumne proporcije u testu ispravne, LISS povećava vjerojatnost asocijacije protutijela. Svako povećanje volumena seruma zahtjeva ponovan izračun omjera LISS otopine u odnosu na to povećanje. Valja paziti i pri

inkubaciji, jer ako se ona produži iz nekog razloga, to može smanjiti osjetljivost testa ukoliko je korištena LISS otopina. (2)

## **1.6. Najvažnija primjena indirektnog antiglobulinskog testa**

### **1.6.1. Prijetransfuzijsko ispitivanje**

Prijetransfuzijsko ispitivanje provodi se nakon donesene odluke i zatraženog transfuzijskog liječenja eritrocitnim pripravcima ili ostalim pripravcima koji u sebi sadrže više od 5mL eritrocita. Ono uključuje:

- Provjeru ABO i Rh antigena bolesnika i pripravka,
- Test pretraživanja antieritrocitnih protutijela
- Križnu probu između davateljnih eritrocita i primateljevog seruma. (5)

Temelj prijetransfuzijskog ispitivanja je otkrivanje antieritrocitnih protutijela u primateljevu serumu jer ona mogu uzrokovati hemolitičku transfuzijsku reakciju (HTR). Osnovni preduvjet za dobre i sigurne rezultate su korištenje tehnike indirektnog antiglobulinskog testa te osjetljivost i specifičnost testa. Tijekom primarnog preglednog prijetransfuzijskog ispitivanja nije poznato jesu li klinički značajna antieritrocitna aloprotutijela prisutna u cirkulaciji bolesnika. Indirektni antiglobulinski test je općenito najbolja metoda u sigurnom otkrivanju najvećeg broja takvih protutijela. Metoda IAT-a koja se odabire za rutinski rad mora biti dovoljno osjetljiva za otkrivanje malih količina antieritrocitnih aloprotutijela u bolesnikovu serumu/plazmi, jer je posljedica lažno negativnih rezultata, hemolitička transfuzijska reakcija. Odabrana metoda mora biti i specifična. Posljedica visoke osjetljivosti testa s nespecifičnim lažno pozitivnim rezultatima su nepotrebna dodatna ispitivanja i odlaganje transfuzijske terapije. Danas na tržištu postoje automatski i poluautomatski kompjutorizirani sustavi kojima se izvodi IAT . Prednosti ovakvog načina rada su mogućnost ispitivanja većeg broja uzoraka, preciznost i standardizacija u izvođenju testova te softverski programi za interpretaciju rezultata koji uvelike omogućuju isključivanje ljudske pogreške. Uvjeti za kvalitetan rad u ovakvim sustavima su dodatna edukacija zdravstvenog osoblja, trajna kontrola ispravnosti rada sustava i procesna kontrola točnosti izvođenja testova implementirana u softverski program. Ako se IAT test pokaže pozitivnim ukazujući time prisutnost antieritrocitnih

aloprotutijela, potrebno je izvesti indetifikaciju protutijela. Njome se određuje specifičnost i kliničko značenje antieritrocitnih protutijela. Potrebno se pridržavati određenih pravila pri njihovoj indetifikaciji:

1. metoda identifikacije mora biti u istoj tehnici kojom su izvođeni pregledni testovi pretraživanja (IAT)
2. identificira se panelom testnih eritrocita koji moraju biti u roku valjanosti
3. rezultati se smiju interpretirati samo ako su tijekom ispitivanja korištene sve vrste testova specifične za serološke karakteristike pronađenih protutijela. (5)

Prijetransfuzijsko ispitivanje uključuje i križnu probu između davateljevih eritrocita i primateljevog seruma. Test se izvodi u dva stupnja. U prvom se dokazuje podudarnost ABO krvnih grupa davatelja i primatelja (immediate spin). U drugom stupnju se otkrivaju klinički značajna protutijela na eritrocitne antigene davatelja IAT-om. U slučaju pozitivne križne reakcije kada nije određena specifičnost i klinička značajnost protutijela, bolesnika se smije transfuzirati samo u hitnim stanjima, ako se zbog vitalne indikacije ne smije odgoditi transfuzijsko liječenje. Rizik nepodudarne transfuzije je manji od rizika opasnosti po bolesnikov život. Jako je važno voditi računa o tome da ako se sadašnjim imunohematološkim ispitivanjem ne dokažu antieritrocitna protutijela koja su prije već bila dokazana, za transfuziju uvijek treba tražiti eritrocite kojima nedostaje taj antigen. (5)

Posljednih desetak godina, uvođenjem novih kirurških zahvata (npr. transplatacija jetre) učestali su hitni zahtjevi kliničara za velikim volumenima krvi. Sve se više primjenjuju operacije na dan prijema u bolnicu, čime se skraćuje vrijeme za prijetransfuzijsko ispitivanje. To je navelo na razmišljanje o skraćivanju postupka križne probe za pojedine bolesnike. Takvi postupci se u rutini nazivaju „*type and screen*“ postupci. Prema njima ako se preglednim testovima ne utvrdi postojanje antieritrocitnih protutijela, križnom probom treba samo isključiti ABO nepodudarnost, tj. radi se samo prva faza križne probe „*immediate spin*“. (5)

Uvođenje informatičkog sustava u transfuzijsku medicinu omogućuje elektronsku križnu probu. Temeljne postavke te metode su primjena barkodova za uzorke krvi davatelja i bolesnika, kompjutorsko povezivanje i uspoređivanje podataka o prijetransfuzijskom ispitivanju davatelja i bolesnika, rezultatima prethodnih ispitivanja i ishodu transfuzije.

Dosadašnja iskustva pokazuju da to isključuje administrativne pogreške ali ne može spriječiti pogreške pri uzorkovanju i identifikaciji bolesnika. (5)

### **1.6.2. Ispitivanje antieritrocitnih protutijela kod trudnica**

Svakoj trudnici treba od 12. do 16. tjedna trudnoće odrediti: ABO krvnu grupu, RhD antigen i IAT. (5) IAT-om ispituje prisutnost antieritrocitna protutijela koja mogu uzrokovati hemolitičku bolest novorođenčeta (HBN).

Kod HBN skraćen je životni vijek fetalnih/neonatalnih eritrocita zbog djelovanja specifičnih protutijela majke usmjerenih na eritrocitne antigene koje je dijete naslijedilo od oca. HBN se događa kada su majka i dijete antigen nepodudarni i majka stvori antieritrocitna protutijela. HBN je najčešće uzrokovana anti-D protutijelima. U ovom slučaju majka je RhD neg, a dijete od oca naslijedi RhD antigen i tijekom trudnoće dio takvih RhD+ stanica dopiše u majčin krvotok. Majčin organizam antigene na tim stanicama prepoznaje kao strane i imunizira se. To znači da stvori protutijela protiv RhD antigena (anti-D). Stvorena imuna protutijela su IgG klase, a ona prelaze transplacentarnu barijeru. Kada prođu kroz placentu, protutijela dopiše u krvotok fetusa. Ondje razaraju njegove eritrocite te uzrokuju niz poremećaja koje ugrožavaju fetus: anemiju, žuticu, do težih oblika kao što je hidrops fetusa i intrauterinu smrt. (5)

### **1.6.3. IAT u drugim indikacijama**

Životni vijek eritrocita u krvotoku je otprilike 120 dana. Kod imunih hemolitičkih anemija životni vijek je skraćen jer dolazi do razaranja eritrocita zbog antieritrocitnih protutijela. (3)

Imune hemolitičke anemije dijelimo na:

1. aloimune,
2. autoimune
3. lijekovima inducirane hemolitičke anemije. (3)

U aloimunim anemijama pacijent stvara aloprotutijela na strani antigen koji se na tuđim eritrocitima našao u njegovom krvotoku. Najčešće se to događa kod transfuzija krvi i trudnoće. Autoimune anemije karakterizira stvaranje protutijela na vlastite antigene, a lijekovima inducirane hemolitičke anemije su rezultat stvaranja protutijela na određeni lijek koji za posljedicu ima razaranje pacijentovih eritrocita. (3)

Ovisno o vrsti anemije, različiti su i algoritmi laboratorijskog ispitivanja. Međutim, jedno imaju zajedničko, a to je ispitivanje prisutnosti protutijela ili komplementa vezanih za eritrocite primjenom DAT-a i ispitivanje prisutnosti antieritrocitnih protutijela u serumu ili plazmi primjenom IAT-a. Kada je rezultat DAT-a pozitivan, potrebna su daljnja ispitivanja kako bi se lakše odredio značaj protutijela i stupanj bolesnikove ugroženosti. Liječenje ovog poremećaja nije univerzalno i ovisi o uzroku njegovog nastanka. (1)

## 1.7. Izvori pogrešaka u indirektnom antiglobulinskom testu

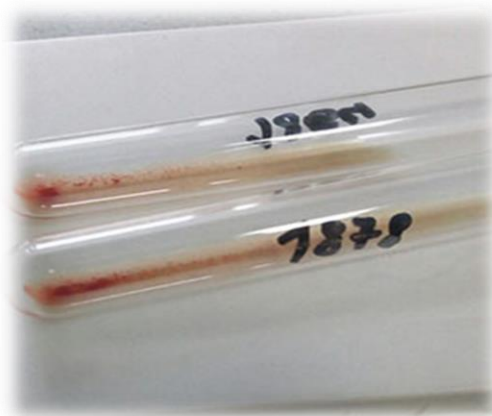
Tablica 1. Izvori pogrešaka u IAT-u

<p>LAŽNO POZITIVNI REZULTATI:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Neprikladan uzorak (ugrušak i sl.)</li><li>• Bakterijsko zagađenje otopina korištenih pri ispiranju stanica</li><li>• Stanice pozitivne u DAT-u korištene za izvođenje IAT-a</li><li>• Otopina zagađena teškim metalima ili silicijevim dioksidom</li><li>• Prljavo posuđe (epruvete, pipete i sl.)</li><li>• Poliaglutinirajuće stanice</li><li>• Kontaminirajuća protutijela u AHG reagensu (6)</li></ul>
<p>LAŽNO NEGATIVNI REZULTATI</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Nedovoljno ispiranje stanica</li><li>• Istek datuma valjanosti AHG reagensa</li><li>• AHG reagens nije dodan</li><li>• Pogrešan omjer seruma i testnih stanica</li><li>• Nedovoljno dugo inkubacija ili pogrešna temperatura inkubacije</li><li>• Pretjerano centrifugiranje ili nedovoljno centrifugiranje (6)</li></ul>

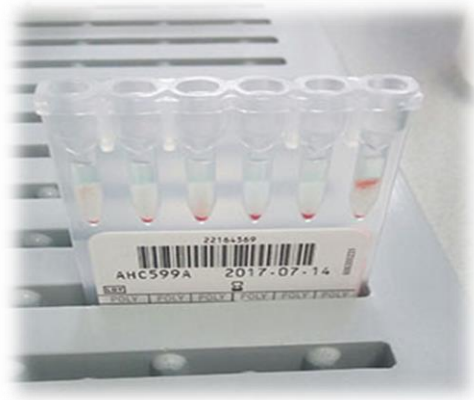


## 1.8. Metode za određivanje IAT-a

Mnoge metode su razvijene za izvođenje indirektnog antiglobulinskog testa. Danas se u rutinskom imunohematološkom ispitivanju najviše koriste klasični IAT u epruveti i IAT u mikrohemaglutinacijskoj metodi. Obje metode služe za pretraživanje seruma na antieritrocitna protutijela i koriste iste reagense no također se i razlikuju po nekim karakteristikama. Svaka metoda ima određene prednosti i nedostatke u odnosu na onu drugu. Klasična metoda u epruveti se odvija u tri faze i ima sposobnost otkrivanja i protutijela na temperaturama nižim od tjelesne (Slika 6.). Za razliku od nje, test u mikrohemaglutinacijskoj metodi otkriva protutijela samo na 37 °C. Temelji se na filtraciji aglutinata eritrocita prolaskom kroz sloj staklenih kuglica tijekom centrifugiranja. Ako eritrociti ne formiraju aglutinate, onda prolaze kroz kuglice i sedimentiraju se na dno. Ako formiraju aglutinate, zaustavljaju se na vrhu kuglica ili na različitim nivoima mikrokuglica (Slika 7.). (7) Postoje brojni članci koji se bave tematikom izvođenja i uspoređivanja ovih dviju metoda. Jedno od istraživanja objavljeno u Archives of Pathology and Laboratory Medicine kaže da je indirektni antiglobulinski test izvođen u mikrometodi prikladniji za rutinski rad od onog izvođenog klasičnom metodom. Razlog tomu navode lakše očitavanje rezultata, reproducibilnost i bolju pouzdanost metode. (8) Neka od istraživanja objavljena na Europe PMC dokazali su veću osjetljivost slabo reagirajućih protutijela u odnosu na klasičnu metodu u epruveti. (9) (10)



Slika 6. IAT Klasičnom metodom u epruveti. (14)



Slika 7. IAT u mikrometodi. (14)

## **2. CILJEVI RADA**

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Odrediti indirektni antiglobulinski test za 11 odabranih uzoraka krvi klasičnom metodom u epruveti.
2. Odrediti indirektni antiglobulinski test za tih istih 11 uzoraka krvi u Ortho BioVue mikrohemaglutinacijskoj metodi.
3. Usporediti reaktivnost antieritrocitnih protutijela u obje metode.
4. Analizirati prednosti i nedostatke navedenih metoda u otkrivanju antieritrocitnih protutijela.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Mjesto i vrijeme istraživanja**

Mjesto provođenja istraživanja je Centar za transfuzijsku medicinu KBC-a Split na lokaciji Križine. Istraživanje se odvijalo u dvije faze tijekom mjeseca travnja 2017.godine. Odabrano je 11 uzoraka krvi (seruma) koji su prethodno izvađeni prema protokolu laboratorija i čuvani u odgovarajućim uvjetima. Isti su uzorci korišteni za obje metode.

#### **3.2. Pribor i materijali**

a) Za ispitivanje indirektnog antiglobulinskog testa klasičnom metodom u epruveti potreban je sljedeći pribor:

- Stalci
- Staklene epruvete
- Staklene pipete
- Gumeni nastavci za staklene pipete

Oprema:

- Umjerene centrifuge za epruvete
- Termostat namješten na 37° C
- Hladnjak namješten na +2 C - +6 °C
- Aglutinoskop

Reagensi:

- 3-5 % suspenzija eritrocita : Testni eritrociti
- 0,9% NaCl
- LISS aditiv
- Polispecifičnianti-humani globulin

- Coombsova kontrola

b) Za ispitivanje indirektnog antiglobulinskog testa u mikrohemaglutinacijskoj metodi potreban je sljedeći pribor:

- Ortho BioVue polispecifične mikrokartice
- Mikropipete od 10, 40 i 50  $\mu$ l
- Plastični nastavci

Oprema:

- Termostat namješten na 37 °C (Ortho BioVue termostat)
- Ortho BioVue centrifuga za mikrokartice

Reagensi:

- 3-5% suspenzija eritrocita (Selectogen 1 i 2, panel, eritrociti doze krvi, autokontrola)
- LISS otopina

### **3.3. Opis aktivnosti**

a) Klasična metoda indirektnog antiglobulinskog testa u epruveti

1. Uzeti staklene epruvete i obilježiti ih imenom i prezimenom pacijenta i rednim brojem ispitivanih eritrocita. Označiti toliko epruveta koliko je test eritrocita, odnosno davatelja eritrocita. Ukoliko je potrebna identifikacija protutijela označiti još jednu kao kontrolu.
2. U svaku epruvetu ukapati po dvije kapi (100 $\mu$ l) seruma, plazme ili eluata. Između seruma ili plazme, serum je prvi izbor zbog očuvane aktivnosti komplementa.
3. U obilježene epruvete kapati jednu kap 3-5% suspenzije odgovarajućih eritrocita.
4. Ostaviti ukapane epruvete na sobnoj temperaturi 5 min.

5. Centrifugirati na 1000 okretaja/min. jednu minutu i očitati prisutnost aglutinacije te zabilježiti - **(1.faza)**.
6. Ukapati u svaku epruvetu po dvije kapi LISS otopine.
7. Ostaviti u termostatu na 37 °C 30 min.
8. Centrifugirati ih na 1000 okr/min jednu minutu i očitati prisutnost aglutinacije te zabilježiti – **(2.faza)**.
9. Oprati eritrocite u fiziološkoj otopini 3-4 puta. Nakon zadnjeg pranja dekantirati supernatant maksimalno i osušiti vrh epruvete na papirnatom ručniku.
10. Dodati dvije kapi AHG reagensa (prethodno ugrijanog na sobnu temperaturu).
11. Centrifugirati na 1000okr/min jednu minutu.
12. Rezultat odmah očitati i zabilježiti – **(3.faza)**.
13. U negativne epruvete dodati jednu kap Coombsove kontrole i ponoviti centrifugiranje i očitavanje.

*\*ako je Coombsova kontrola negativna, rezultate ne smijemo smatrati valjanima. Treba provjeriti ispravnost reagenasa i ponoviti test.*

#### b) Indirektni antiglobulinski test u Ortho BioVue mikrohemaglutinacijskoj metodi

1. Označiti stupce mikrokartica rednim brojem uzorka.
2. U svaki stupac pipetirati 50 µl LISS otopine, 10 µl suspenzije eritrocita i 40 µl ispitivanog seruma.
  - Pipetiranje se izvodi 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. Nakon pipetiranja čitava mikrokartica se lagano protrese povlačenjem prsta preko reaktivnih komora.
3. Inkubirati mikrokartice na 37 °C 20 minuta u Ortho BioVue termostatu.
4. Centrifugirati na 800 okr/min dvije minute, a zatim na 1500 okr/min tri minute.

- Prva faza centrifugiranja služi da se eritrociti spoje sa AHG reagensom. U drugoj fazi dolazi do filtracije slobodnih eritrocita, odnosno do zaustavljanja aglutinata na različitim nivoima. Centrifugiranje se treba odvititi najviše u roku 30 min od ukapavanja.

5. Očitavanje rezultata.

### 3.4. Tumačenje rezultata indirektnog antiglobulinskog testa

**Tablica 2. Tumačenje rezultata IAT-a u epruveti**

Stupanj aglutinacije	Opis
4+	Eritrociti aglutinirani u jedan aglutinat.
3+	Aglutinirani eritrociti formiraju 3-4 veća aglutinata.
2+	Aglutinirani eritrociti formiraju više manjih aglutinata uz po koji veći.
1+	Aglutinirani eritrociti formiraju više nježnih aglutinata bez slobodnih eritrocita.
w ili +/-	Uz nježne aglutinate vidljivi i slobodni eritrociti.
mf	Miješana aglutinacija, uz veće aglutinate vidljivi i slobodni eritrociti.

**Tablica 3. Tumačenje rezultata IAT-a u mikrohemaglutinacijskoj metodi**

Stupanj aglutinacije	Opis
4+	Aglutinirani eritrociti čine uniformni 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 duž cijelog mikrostupca, uz malo eritrocita na dnu.
1+	Većina aglutiniranih eritrocita nalazi se u donjoj polovici, uz eritrocite na dnu.
w	Mali broj aglutiniranih eritrocita vidljiv iznad sloja eritrocita koji su na dnu.
mf	Aglutinirani eritrociti se vide u gornjem dijelu mikrostupca, uz eritrocite na samom dnu.
0	Svi eritrociti nalaze se na dnu mikrostupca, s glatkom i ravnom gornjom površinom.



## 4. REZULTATI

### a) Indirektni antiglobulinski test u klasičnoj metodi u epruveti

U provedenom istraživanju od jedanaest uzoraka testiranih klasičnom metodom u epruveti dobiveni su sljedeći rezultati (Tablica 4.):

- U prvom mjerenju nakon pet minuta inkubacije na sobnoj temperaturi bila su četiri pozitivna uzorka, što znači da su ovi pacijenti imali antieritrocitna protutijela IgM klase koja su bila reaktivna na sobnoj temperaturi.
- U drugom mjerenju je bilo pet pozitivnih uzoraka, što znači da su bila prisutna kompletna protutijela koja su reaktivna na temperaturi od 37 °C,
- U trećem mjerenju je bilo devet pozitivnih uzoraka, što znači da su eritrociti bili obloženi IgG protutijelima i/ili aktiviranom komponentom komplemента C3d.

Svi pozitivni rezultati su imali raspon reaktivnosti od +/- do 2+.

Prilikom testiranja bilo je neočekivanih rezultata. Kod uzorka br.10 dobili smo lažno negativan rezultat, zbog lošeg omjera testnih eritrocita i seruma. Razlog tomu je što suspenzija testnih eritrocita nije bila dobro promiješana prije uporabe. Eritrocite smo pažljivo promiješali i ponovili testiranje držeći se protokola.

**Tablica 4. Dobiveni rezultati istraživanja (klasična metoda u epruveti)**

Br.uzorka	1.mjerenje (I.S.)		2.mjerenje (37C)		3.mjerenje (AHG)	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2
1	0	0	0	1+	0	1+
2	0	0	0	0	0	1+
3	0	0	+/-	+/-	2+	2+
4	0	0	0	0	0	0
5	1+	0	1+	0	+/-	0
6	+/-	0	0	0	1+	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	+/-	0	1+	+/-	1+
9	1+	0	1+	0	1+	0
10	0	0	0	0	0	+/-
11	0	0	0	0	0	+/-

a) Indirektni antiglobulinski test u Ortho BioVue mikrohemaglutinacijskoj metodi

Od jedanaest uzoraka testiranih Ortho BioVue mikrometodom njih deset je dalo pozitivan rezultat. Raspon pozitivnih rezultata se kretao od 1+ do 3/4 + (Tablica 5.).

Kod izvođenja IAT-a u navedenoj metodi naišli smo na neočekivane rezultate. Kod uzorka br. 5 rezultat je bio pozitivan u selektogenu 2, a ne bi trebao biti jer je u uzorku bilo anti-M protutijelo, a eritrociti u selektogenu 2 su bili M negativni. Razlog pozitivnosti su bile niti fibrina u serumu. Uzorak je ponovno centrifugiran nakon čega su rezultati bili u okviru očekivanih.

Kod uzoraka br.10 i 11 došlo je do lažno negativnih rezultata, jer su mikrokartice greškom bile centrifugirane dva puta umjesto jednog. Bilo je potrebno ponoviti testiranje po protokolu.

**Tablica 5. Dobiveni rezultati istraživanja (IAT u Ortho Bio Vue mikrohemaglutinacijskoj metodi)**

Br.uzorka	S1	S2
1	0	2+
2	0	2+
3	3/4+	3+
4	0	0
5	1+	0
6	1/2+	0
7	0	1+
8	2+	2+
9	2+	0
10	0	2+
11	0	2+

## 5. RASPRAVA

Razvoj imunohematoloških ispitivanja doprinio je sigurnijem transfuzijskom liječenju. Središnje mjesto u tim testiranjima zauzima indirektni antiglobulinski test. Danas postoje različite metode za njegovo izvođenje. U istraživanju su korištene klasična metoda u epruveti i Ortho BioVue mikrohemaglutinacijska metoda.

Klasična metoda u epruveti nije automatizirana nego se u laboratorijima izvodi ručno. To znači da je ljudski faktor jako važan pri izvođenju. Kada se tome doda da zahtjeva puno više koraka pri izvedbi u odnosu na mikrohemaglutinacijsku metodu možemo onda reći da je i mogućnost pogreške veća. Međutim, ova metoda ima mogućnost prepoznavanja kompletnih protutijela koja reagiraju na tjelesnoj i sobnoj temperaturi. U našem istraživanju od jedanaest uzoraka testiranih klasičnom metodom dva su bila potpuno negativna u svim fazama, dok je devet uzoraka bilo pozitivno. Pri prvom mjerenju (I.S) bila su pozitivna četiri uzorka. Dakle, ti uzorci imaju kompletna protutijela koja reagiraju na sobnoj temperaturi (IgM). U drugom mjerenju (37 °C) je bilo pozitivno pet uzoraka što znači da ti uzorci imaju kompletna protutijela koja reagiraju na tjelesnoj temperaturi (IgM).

Pri trećem mjerenju (AHG) devet je uzoraka dalo pozitivan rezultat. To su uzorci koji u sebi sadrže inkompletna protutijela koja se ne mogu vezati bez AHG reagensa (IgG).

Mikrohemaglutinacijska metoda je u rutinski rad uvedena znatno kasnije od klasične metode u epruveti. Pokazala se izuzetno korisnom u otkrivanju značajnih inkompletnih protutijela. Obzirom da je automatizirana i da je time isključen ljudski faktor, mogućnost pogreške svedena je na minimum. Jednostavnost i brzina izvođenja su također jedne od glavnih prednosti ove metode. Što se tiče našeg istraživanja, pozitivnih rezultata u mikrohemaglutinacijskoj metodi bilo je deset. Svi pozitivni uzorci u mikrometodi odgovarali su pozitivnim uzorcima u klasičnoj metodi u epruveti. Međutim, u mikrometodi su rezultati aglutinacije bili izraženiji, odnosno imali su barem jedan do dva + jaču aglutinaciju od onih mjerenih u epruveti što znači da su rezultati bili osjetljiviji. Mikrometodu i prvo mjerenje u klasičnoj metodi se ne može uspoređivati, jer mikrometoda nema sposobnost otkrivanja protutijela koja reagiraju na temperaturama različitim od tjelesne.

Uspoređujući dobivene rezultate sa rezultatima drugih studija možemo reći da naše istraživanje potvrđuje zaključke koje su oni iznijeli. Primjerice, jedno od istraživanja objavljenih na Europe PMC je testiralo 628 uzoraka s obje metode. Rezultati pokazuju da čak 31 % pozitivnih uzoraka nije detektirano klasičnom metodom u epruveti dok mikrometodom nije detektirano samo 0,3 % pozitivnih uzoraka. Također navode kako su pozitivni rezultati koji se preklapaju u obje metode bili bolje izraženi u mikrohemaglutinacijskoj metodi. To dokazuje koliko je mikrohemaglutinacijska metoda osjetljivija u otkrivanju značajnih antieritrocitnih protutijela, a time i bolja za rutinski rad. U navedenom istraživanju ona izvrsno korelira sa stvarnim kliničkim stanjem pacijenta, pouzdana je, reproducibilna i jednostavna za izvođenje. Slična istraživanja su objavljena na Journal of Laboratory Physicians i Archives of Pathology and Laboratory Medicine. Međutim, na temelju ovih istraživanja ne treba isključiti važnost klasične metode u epruveti. Ona ima sposobnost razlikovanja kompletnih od inkompletnih protutijela te nam ukazuje koja su kompletna protutijela reagirala na sobnoj, a koja na tjelesnoj temperaturi. To je nekad od velike važnosti kod identifikacije antieritrocitnih protutijela.

## 6. ZAKLJUČCI

Analizom 11 odabranih uzoraka krvi indirektnim antiglobulinskim testom s dvije metode (klasična u epruveti i Ortho BioVue mikrohemaglutinacijska metoda) slijedeći su zaključci:

1. Osjetljivost antieritrocitnih protutijela je veća u Ortho BioVue mikrohemaglutinacijskoj metodi nego u klasičnoj metodi u epruveti.
2. Prednost mikrometode u odnosu na metodu u epruveti je automatiziran način izvođenja koji je precizniji, zahtjeva manje vremena, manje ručnog rada, time i manju mogućnost pogreške.
3. Prednost klasične metode u epruveti je sposobnost otkrivanja i razlikovanja inkompletnih od kompletnih protutijela, odnosno, ova metoda može razlikovati protutijela koja mogu aglutinirati eritrocite bez dodatka antiglobulinskog reagensa i ona koja to ne mogu.
4. Klasična metoda u epruveti razlikuje i „hladna“ od „toplih“ protutijela, što je posebice važno kod određivanja značaja antieritrocitnih protutijela.

## 7. LITERATURA

1. Damir Grgičević i sur., Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi, Medicinska naklada, Zagreb; 2006.
2. Brecher M.E. Technical Manual, (14th Edition), Bethesda, MD; American Association of Blood Banks; 2003.
3. Andreis Igor i sur., Imunologija (7. izdanje), Medicinska naklada, Zagreb; 2010.
4. Harmening D.M., PhD, MT (ASCP), CLS (NCA), Modern Blood Banking and Transfusion Practices (4th Edition), F.A. Davis Company, Philadelphia.
5. Golubić-Čepulić B. i sur., Klinička transfuziologija: Prijetransfuzijsko ispitivanje, KBC Zagreb; 2001.
6. Rosenfield R.E., et al: Solid phase serology for the study of human erythrocytic antigen-antibody reactions, Proc 15th Congress of International Society of Blood Transfusion, Paris; 1976.
7. Sachin Garg, Nishant Saini, Ravnet K., Bedi, Sabita Basu, Journal of Laboratory Physicians: „Comparasion of microcolumn technology with conventional tube method for antibody detection“; 2017. 95-99.
8. J. C.Cate IV, N. Reilly. Archives of Pathology and Laboratory Medicine: „Evaluation and implementation of the gel test for indirect antiglobulin testing“; 1999. 119-123.
9. Novaretti M.C., Silveira E.J, Filho E.C., Dorlhiac P.E., Chamone D.A., Europe PMC: „Comparison of the tube and gel tehniques for antibody indetification“; Jan 2000. 138-141.

10. Derr D.A., Dickerson S.J., Steiner E.A. Europe PMC: „Implementation of gel column technology, including comparative testing of Ortho ID-MTS with standard PEG tube test“; January 1998. 72-74.
11. <http://www.ipopam.com/tag/aglutinacija>
12. <https://www.plugbr.net/laboratorio-pedi-u-nova-coleta-de-sangue-material-hemolisou-o-que-pode-ter-causado-e-como-proceder/>
13. [https://www.google.hr/search?biw=1517&bih=735&tbm=isch&sa=1&q=coombs+indirect+test&oq=coombs+indirect+test&gs\\_l=psy-#imgrc=ksAkhaEOpnuwMM:](https://www.google.hr/search?biw=1517&bih=735&tbm=isch&sa=1&q=coombs+indirect+test&oq=coombs+indirect+test&gs_l=psy-#imgrc=ksAkhaEOpnuwMM:)
14. Slikano u Centru za transfuzijsku medicinu Split.
15. [https://www.google.hr/search?q=smokva&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKewjXgrb8\\_LfUAhWKiRoKHfaxBHMQAUICigB&biw=1517&bih=735&dpr=0.9#imgrc=JVWpeCqLa17PKM:](https://www.google.hr/search?q=smokva&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKewjXgrb8_LfUAhWKiRoKHfaxBHMQAUICigB&biw=1517&bih=735&dpr=0.9#imgrc=JVWpeCqLa17PKM:)
16. [https://www.google.hr/search?q=papaja&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiV3faM\\_bfUAhVBVBQKHfCsBTMQAUICigB&biw=1517&bih=735&dpr=0.9#imgrc=DSnug4SMUY83qM:](https://www.google.hr/search?q=papaja&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiV3faM_bfUAhVBVBQKHfCsBTMQAUICigB&biw=1517&bih=735&dpr=0.9#imgrc=DSnug4SMUY83qM:)



## 8. SAŽETAK

**Cilj:** Cilj ovog rada bio je odrediti indirektni antiglobulinski test u mikrohemaglutinacijskoj metodi i klasičnoj metodi u epruveti, ispitati reaktivnost antieritrocitnih protutijela te prikazati prednosti i nedostatke obje metode.

**Materijali i metode:** Analizirano je jedanaest odabranih uzoraka seruma u Centru za transfuzijsku medicinu. Isti uzorci su korišteni u Ortho BioVue mikrohemaglutinacijskoj metodi i klasičnoj metodi u epruveti kako bi se rezultati mogli usporediti.

**Rezultati:** Od jedanaest testiranih uzoraka u klasičnoj metodi u epruveti bilo je pozitivno devet uzoraka od toga, u prvom mjerenju su bila četiri pozitivna rezultata, u drugom pet, a u trećem devet. U Ortho BioVue mikrohemaglutinacijskoj metodi deset je uzoraka dalo pozitivan rezultat. Svi uzorci koji su imali pozitivan rezultat u obje metode su imali jaču pozitivnost u mikrohemaglutinacijskoj metodi.

**Zaključak:** Klasična metoda u epruveti ima prednost nad mikrohemaglutinacijskom metodom zbog mogućnosti razlikovanja kompletnih od inkompletnih te „toplih“ od „hladnih“ protutijela. S druge strane, mikrohemaglutinacijska metoda je osjetljivija u otkrivanju značajnih IgG protutijela, automatizirana je pa je samim time i prikladnija za rutinski rad.

**Ključne riječi:** Aglutinacija, indirektni antiglobulinski test, antiglobulinski reagens.

## 9. SUMMARY

**Objective:** The aim of this work was to determine the indirect antiglobulin test in the microhemagglutination method and the classic tube method, to investigate the reactivity of the anti-erythrocyte antibodies and to show the advantages and disadvantages of both methods.

**Materials and Methods:** Eleven selected serum samples were analyzed at the Transfusion Medicine Center. The same samples were used in Ortho BioVue microhemagglutination method and classic tube method to compare results easier.

**Results:** Of the eleven tested samples in the classic tube method in the first measurement we had four positive results, in the second five and in the third nine. In the Ortho BioVue microhemagglutination method ten samples yielded a positive result. All samples that had a positive result in both methods were more pronounced in the microhemagglutination method.

**Conclusion:** The classic tube method has the advantage over the microhemagglutination method because of the ability to distinguish complete from incomplete and „cold“ from „hot“ antibodies. On the other hand, the microhemagglutination method is more sensitive to the detection of significant IgG antibodies and it is automated and thus more suitable for routine work.

**Keywords:** Agglutination, indirect antiglobulin test, antiglobulin reagent.

## 10. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI:

IME I PREZIME: Bruna Raljević

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 20. kolovoza 1995, Split

ADRESA STANOVANJA: Put Raljevića 5, Podašpilje, Omiš 21310

MOBITEL: 095 809 5630

Email: [raljevicbruna@gmail.com](mailto:raljevicbruna@gmail.com)

### OBRAZOVANJE

2002.-2010. Osnovna škola “ Josip Pupačić“, Omiš

2010.-2014. Jezična gimnazija “ Jure Kaštelan“, Omiš

2014-2017. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Split- Medicinsko laboratorijska dijagnostika

**JEZICI:** Engleski jezik: aktivno

**RAČUNALNE VJEŠTINE:** Poznavanje Microsoft Office paketa ( Word, Exel, Power Point), služenje internetom.