

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

---

Klarić, Marja

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:176:438326>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



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

**Marja Klarić**

**DIREKTNI 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

**Marja Klarić**

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

**DIRECT ANTIGLOBULIN TEST IN MICROMETHOD  
AND TUBE TEST 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

DDK – Dobrovoljni darivatelji krvi

EDTA – Etilendiaminotetraoctena kiselina

HBN – Hemolitička bolest novorođenčadi

HTR – Hemolitička transfuzijska reakcija

IAT – Indirektni antiglobulinski test

PEG – Polietilen-glikol

# SADRŽAJ:

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Transfuzijsko ispitivanje .....	1
1.2. Antiglobulinski test .....	2
1.3. Direktni antiglobulinski test .....	4
1.4. Antihumani globulin.....	5
1.4.1. Polispecifični antihumani globulin.....	7
1.4.2. Monospecifični antihumani globulin.....	8
1.5. Osjetljivost i specifičnost DAT-a .....	9
1.6. Klinička stanja s pozitivnim DAT-om .....	10
1.6.1. Hemolitička bolest novorođenčeta .....	10
1.6.2. Hemolitička transfuzijska reakcija .....	12
1.6.3. Autoimune hemolitičke anemije.....	13
1.7. Čimbenici koji utječu na DAT .....	16
1.8. DAT u različitim metodama .....	20
<b>2. CILJEVI RADA .....</b>	<b>21</b>
<b>3. METODE I MATERIJALI .....</b>	<b>22</b>
3.1. DAT u Ortho Biovue mikrohemaglutinacijskoj metodi.....	22
3.2. DAT klasičnom metodom u epruveti .....	24
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>26</b>
4.1. Rezultati DAT-a u mikrohemaglutinacijskoj metodi: .....	26
4.2. Rezultati DAT-a klasičnom metodom u epruveti.....	27
4.3. Usporedba rezultata DAT-a.....	28

<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>29</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>31</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>32</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>34</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>35</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>36</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Transfuzijsko ispitivanje

Transfuzijska medicina bavi se proizvodnjom krvnih pripravaka i liječenjem bolesnika krvnim pripravcima. Obuhvaća sve postupke od uzimanja krvi, proizvodnje, laboratorijskog testiranja i čuvanja krvnih pripravaka, kao i liječenja bolesnika krvnim pripravcima, odnosno sve postupke od davateljeve vene do bolesnikove vene. Tijekom proteklog stoljeća razvijala se pretežno kao laboratorijska i proizvodna struka. Posljednjih desetljeća se mijenja i sve više postaje klinička struka. Primarni cilj joj je sigurno i učinkovito transfuzijsko liječenje koje neće uzrokovati nuspojave, pobol ili smrt. (1)

Kako bi se maksimalno smanjio rizik transfuzijskog liječenja uvedena su određena prijetransfuzijska ispitivanja, koja uključuju niz radnji kojima je cilj povećati sigurnost transfuzijskog liječenja i spriječiti neželjene poslijetransfuzijske reakcije. Uključuju testove podudarnosti kao što su: provjera ABO i Rh krvne grupe primatelja i pripravka, ispitivanje prisutnosti iregularnih protutijela u bolesnikovu serumu indirektnim antiglobulinskim testom (IAT-om) i križnu probu koja se provodi ispitivanjem reakcije između primateljeva seruma i davateljevih eritrocita. (1)

U transfuzijskim laboratorijima osim prijetransfuzijskih ispitivanja provode se i ispitivanja transfuzijskih reakcija nakon svake prijavljene poslijetransfuzijske reakcije. Ovim postupcima treba ispitati postoji li transfuzijska reakcija i je li transfuzijsko liječenje bilo njen uzrok. Provodi se s prijetransfuzijskim i poslijetransfuzijskim uzorcima krvi. Uključuje ponovno određivanje krvne grupe i ispitivanje prisutnosti iregularnih protutijela, direktni antiglobulinski test (DAT) i na kraju identifikaciju protutijela. (1)

Učestalost transfuzijskih reakcija teško je utvrditi ako se one zanemaruju, ne bilježe i ne prepoznaju. No, danas je njihov broj značajno manji nego što je bio u začecima transfuzijskog liječenja ponajprije zahvaljujući uvođenju prijetransfuzijskog ispitivanja i veće kvalitete krvnih pripravaka. (2)

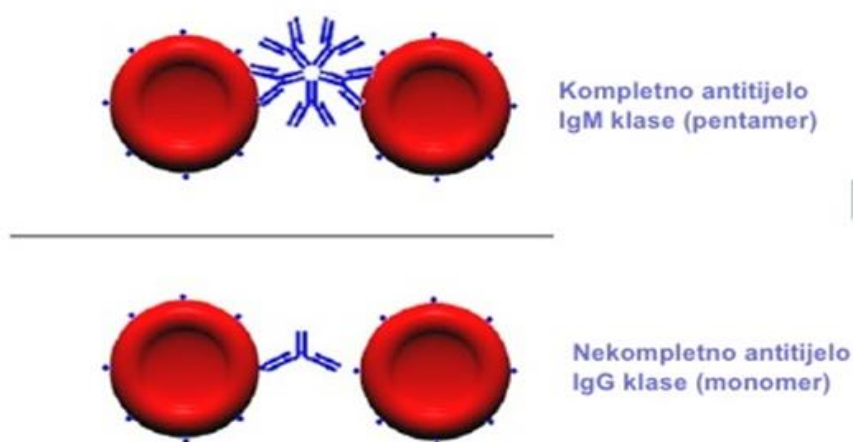
## **1.2. Antiglobulinski test**

Antiglobulinski test ili Coombsov test temelji se na principu da se antihumani globulin (AHG) veže za humane globuline kao što su IgG ili komplement koji se nalaze slobodni u serumu ili vezani za antigene na površini crvenih krvnih stanica tj. eritrocita. (2,3,4) Ovaj test od svog otkrića 1945. godine pa do danas predstavlja temelj imunohematoloških ispitivanja. (2)

Za otkriće antiglobulinskog testa zaslužan je Robin Coombs. On je zajedno sa svojim kolegama Arthurom Mourantom i Robom Raceom opisao test za detekciju inkompletnih protutijela koji danas poznajemo kao antiglobulinski test. (3,4) Ideju za antiglobulinski test Robin Coombs navodno je dobio u vlaku na povratku iz Londona u Cambridge gdje je shvatio da bi dodatkom drugog antitijela mogao povezati tj. premostiti eritrocite što bi dovelo do aglutinacije. To drugo antitijelo je zapravo antihumani globulin. (6) Coombs i suradnici su prvotno opisali primjenu testa u dokazivanju slabih neaglutinirajućih Rh antitijela u serumu. Nakon toga opisali su i njegovu primjenu u detekciji in vivo senzibiliziranih eritrocita novorođenčadi oboljele od hemolitičke bolesti novorođenčadi (HBN). (3) Rezultati njihovih istraživanja objavljeni su u Lancetu 1945. godine i u British Journal of Experimental Pathology 1946. godine. (6) Iako su Robin Coombs i suradnici bili ključni za razvoj i primjenu antiglobulinskog testa u kliničkoj praksi, princip samog testa je opisan nešto ranije, već 1908. godine, a opisao ga je Carlo Moreschi. Danas se primjenjuju dvije osnovne vrste antiglobulinskog testa: direktni i indirektni. Primjenjuju se u dijagnostici različitih bolesti i stanja, a njihova primjena ovisi o tome da li su humani globulini vezani za eritrocite ili se nalaze slobodni u serumu. (3,6)



Prije otkrića antiglobulinskog testa samo su se mogla detektirati kompletna protutijela odnosno IgM protutijela, no njegovim otkrićem to je promijenjeno jer je omogućena i detekcija inkompletnih protutijela. Inkompletna protutijela su IgG protutijela koja za razliku od kompletnih protutijela ne mogu direktno dovesti do aglutinacije eritrocita, jer sama ne mogu premostiti udaljenost između eritrocita. Da bi premostili tu udaljenost trebaju druga protutijela. Dodatkom antihumanog globulina, omogućeno je povezivanje eritrocita i nastanak vidljivih aglutinata i to je upravo ono na čemu se ovaj test temelji. Također uvođenjem antiglobulinskog testa omogućena je i detekcija komplementa odnosno komponenti komplementa. (3,4) Komplement se sastoji od tridesetak serumskih i membranskih bjelančevina koje djeluju kao posrednici humoralne imunosti. Najvažnija uloga mu je izravno ubijanje stranih stanica ali komplement pridonosi i aktivaciji drugih obrambenih mehanizama. (5)



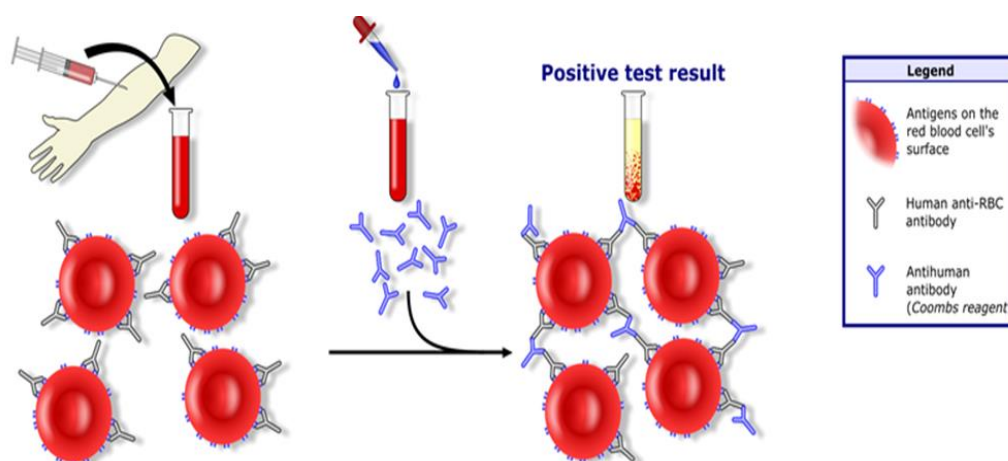
**Slika 1.** Razlika između kompletnih i inkompletnih protutijela

**Izvor:** WEB (12)

### 1.3. Direktni antiglobulinski test

Test koji otkriva prisutnost protutijela i/ili komponenti komplekta vezanih za eritrocite in vivo naziva se direktnim antiglobulinskim testom ili direktnim Coombsovim testom. (2,3,4) Dodatkom AHG eritrocitima na koje su se vezala protutijela i/ili komplement dolazi do stvaranja aglutinata što se očituje kao pozitivan rezultat. Dio je dijagnostičkih ispitivanja u hemolitičkoj transfuzijskoj reakciji (HTR), hemolitičkoj bolesti novorođenčadi (HBN) i u autoimunim te lijekovima induciranim hemolitičkim anemijama (AIHA). (3,4)

Propisi ne zahtijevaju izvođenje DAT-a u rutinskom prijetransfuzijskom testiranju jer je dvjema zasebno provedenim studijama u SAD-u dokazana njegoa nespecifičnost kao dijela rutinskog prijetransfuzijskog ispitivanja. Primjenjuje se također, kao sastavni dio identifikacije iregularnih protutijela. (2)



**Slika 2.** Postupak izvođenja DAT-a

**Izvor:** WEB (13)

## 1.4. Antihumani globulin

Antihumani globulin omogućuje detekciju eritrocita obloženih in vivo ili in vitro s komponentama komplementa i/ili protutijelima. Postoje dvije osnovne metode proizvodnje antihumanog globulina: klasična metoda i hibridomska metoda. Klasičnom metodom proizvodnje dobiju se poliklonska ili animalna protutijela, a hibridomskom metodom monoklonska protutijela. Poliklonska i monoklonska protutijela služe za pripremu polispecifičnih i monospecifičnih reagensa koji imaju široku primjenu u kliničkoj praksi. (3,4)

**Klasična metoda** proizvodnje podrazumijeva imunizaciju različitih životinja kako bi one proizvele protutijela određene specifičnosti. Uglavnom se provodi imuniziranjem zečeva ali kada su potrebni veliki volumeni protutijela mogu se koristiti i ovce ili koze u proizvodnji. Za razliku od starijih načina proizvodnje, u kojima su se kao imunogeni koristili nepročišćeni fragmenti humanih globulina, danas moderniji pristup obuhvaća primjenu pročišćenih fragmenata. Humani globulini inicirani u organizam određene životinjske vrste ponašaju se kao strani antigeni, potiču imunološki sustav životinje i posljedično dolazi do proizvodnje protutijela na humane globuline. Na primjer, iniciranje humanog IgG zecu rezultira proizvodnjom anti-IgG, a iniciranje humanog komplementa proizvodnjom anti-komplement protutijela. Protutijela nastala ovakim načinom proizvodnje su poliklonska protutijela, a predstavljaju heterogenu smjesu protutijela koju proizvode različiti klonovi plazma stanica životinje nakon imunizacije. (3) Poliklonska protutijela prepoznaju različite antigenske determinate odnosno epitope ili prepoznaju iste epitope ali s različitim afinitetom. Najčešće se koriste u imunokemijskim metodama, kao vezna (primarna) protutijela ili kao detekcijska (sekundarna) protutijela. Pogodna su za precipitacijske reakcije. Proizvodnja je jednostavna i jeftina jer se imunizacijom velikih životinja dobiju velike količine reagensa. (5)

**Hibridomskom metodom** proizvode se monoklonska protutijela koja prepoznaju samo jedan epitop na antigenu. Tehnika proizvodnje monoklonskih

protutijela pokazala se korisnom u proizvodnji antitijela visokog titra i visoke specifičnosti za IgG i komplement. Proces proizvodnje započinje imunizacijom laboratorijskih životinja, uglavnom miševa, s pročišćenim humanim globulinom. (3) Nakon prikladnog imunog odgovora, provede se in vitro fuzija stanica mišje slezene sa zloćudnim stanicama neke mijelomske linije. Stanice mišje slezene sadržavaju limfocite koji luče antitijela. Za razliku od njih zloćudno promijenjene mijelomske stanice ne luče protutijela i besmrtni su. Spontano spajanje stanica je rijetkost pa se uglavnom ubrzo primjenom različitih tvari kao polietilen-glikola (PEG). Spajanje rezultira nastankom hibridomske stanice tj. hibridoma. Hibridomi se uzgajaju u posebnom mediju koji onemogućuje rast drugih tipova stanica. Potom se testiraju i odabiru se one stanice koje luče protutijela određene specifičnosti i afiniteta te se takvim stanicama osiguravaju optimalni uvjeti za proizvodnju velikih količina monoklonskih protutijela. Dio se stanica čuva u tekućem dušiku, a dio se nasadi u velikim posudama za kulturu stanica ili se injicira u trbušnu šupljinu organizma iste životinjske vrste koja je bila upotrijebljena za imunizaciju u samom početku postupka. Tako se iz supernatanta kulture, odnosno iz seruma i ascitesa domaćina, dobivaju industrijske količine potpuno homogenih protutijela samo jednog, unaprijed željenog idiotipa. (5) Ovakav način proizvodnje ima svoje prednosti i mane. Prednosti su to što se takvo protutijelo može proizvesti u ogromnim količinama i što je takav AHG visoke čistoće i nekontaminiran. Međutim mane su to što sva protutijela prepoznaju samo jedan epitop na antigenu. Za antigene koji se sastoje od mnoštva epitopa kao što je na primjer IgG potrebna je mješavina različitih monoklonskih protutijela za detekciju i mješavina istih monoklonskih protutijela s različitim afinitetom za epitop kako bi se detektirali i antigeni s različitim stupnjem ekspresije nekog epitopa. (3) Budući da monoklonska protutijela ulaze u reakciju samo s jednim epitopom antigena, nisu pogodna za precipitacijske i aglutinacijske tehnike, zbog nemogućnosti križnog povezivanja antigena i protutijela. No, vrlo su pogodna u tzv. obilježenim tehnikama kao što su radioimunokemijska tehnika, heterogena enzimimunokemijska tehnika i imunofluorometrija. Njihova proizvodnja je puno skuplja i zahtjevnija u odnosu na proizvodnju poliklonskih protutijela. Primjena monoklonskih protutijela doista je široka i ne ograničava se samo

na imunologiju, nego zadire u sva područja prirodnih znanosti, ali i u medicinsku praksu. (5) Reagensi koji sadržavaju monoklonska protutijela su specifičniji i osjetljiviji od onih koji sadržavaju poliklonska.

Razlog tome je što poliklonski reagensi za razliku od monoklonskih mogu sadržavati heterofilna antitijela, koja su multispecifična i sintetizirana prema slabo definiranim antigenima, a mogu uzrokovati lažno pozitivne rezultate testiranja. (2,5)

#### **1.4.1. Polispecifični antihumani globulin**

Polispecifični reagensi sadržavaju dva tipa protutijela usmjerna na humane globuline. To su protutijela na IgG i na C3d komponentu komplementa. Osim njih i druga protutijela usmjerena na komplement kao anti-C3b, anti-C4b ili anti-C4d mogu biti prisutna u reagensu. Najvažnija funkcija polispecifičnog AHG je detekcija vezanih IgG s obzirom da je IgG klinički najznačajnije protutijelo. Komercijalno pripremljeni polispecifični reagensi sadržavaju jako malo, ako uopće, protutijela usmjerenih na teške lance IgA ili IgM pa uglavnom neće reagirati s tim razredima protutijela. Međutim neki reagensi će reagirati s IgA i IgM protutijelima, zato što će se vezati za lake lance koji su identični za sve razrede protutijela. (3,4) Polispecifični reagensi mogu sadržavati poliklonska protutijela, mogu biti spoj više monoklonskih protutijela ili njihova kombinacija. Najčešće se ipak polispecifični AHG reagensi proizvode klasičnom metodom, imuniziranjem zeca humanim IgG antigenom, a druge životinje humanim C3 antigenom. Zbog velike heterogenosti IgG molekula za imunizaciju je potrebno koristiti mješavinu seruma velikog broja darivatelja koji sadržavaju različite antigene, ali isto tako da bi proizvedeni reagensi mogli imati široku upotrebu u rutini kod pripreme reagensa važno je koristiti mješavinu anti-IgG molekula dobivenu iz različitih zečeva za detekciju različitih podrazreda IgG. Također polispecifični reagensi se mogu pripremiti spajanjem monoklonskih anti-C3b i anti-C3d s anti-IgG. (3)

### 1.4.2. Monospecifični antihumani globulin

Monospecifični reagensi sadržavaju samo jedan tip antitijela, antitijela usmjerena na IgG ili antitijela usmjerena na specifične komponentne komplemента kao što su anti-C3b-C3d. Postoje i monospecifični reagensi koji sadržavaju antitijela na druge komponente komplemента kao anti-C4b i anti-C4d, ali još uvijek nisu u široj primjeni. Ako se primjenom polispecifičnog DAT-a detektira prisutnost globulina na eritrocitnoj membrani, tada se monospecifičnim DAT-om može identificirati o kojem tipu globulina se radi. Može se proizvesti primjenom klasične i hibridomske metode. Proces pripreme monospecifičnog AHG-a vrlo je sličan onome polispecifičnog, samo što monospecifični na kraju sadrži samo jedan tip antitijela. (3) Češće je ipak poliklonskog nego monoklonskog podrijetla. Priprema se tako da se određenoj životinji inicira pročišćeni IgA, IgM, IgG, C3 ili C4. Monospecifični anti-komplement reagensi su uglavnom smjesa monoklonskog anti-C3b i monoklonskog anti-C3d. (4)



**Slika 3.** Primjeri polispecifičnih i monospecifičnih reagensa

**Izvor:** WEB (14)

## 1.5. Osjetljivost i specifičnost DAT-a

Pozitivan DAT posljedica je oblaganja eritrocita protutijelima i/ili komponentama komplemента. No, količina vezanih globulina koja se može dokazati DAT-om varira. Ovisi o antieritrocitnim protutijelima, antiglobulinskom serumu koji se primjenjuje, ali ovisi i o metodi kojom se DAT izvodi. Niske razine protutijela i komplemента vezane na eritrocite najčešće su normalan nalaz, a nastaju kao posljedica otklanjanja starih eritrocita. Uobičajni testovi neće ni detektirati te jako male količine vezanih globulina. Tek količina IgG molekula veća od 100 IgG<sub>3</sub> i od 900 do 1000 IgG<sub>1</sub> uzrokuje klinički značajnu destrukciju eritrocita. Međutim, primjenom novijih osjetljivijih metoda izvođenja DAT-a moguće je detektirati i puno nižu količinu globulina, od one klinički značajne, što znači da osobe koje su potpuno zdrave mogu imati i do 500 molekula IgG<sub>1</sub> vezanih za svoje eritrocite time i pozitivan DAT, ali bez ikakvih kliničkih ili laboratorijskih pokazatelja hemolize. Velika osjetljivost DAT-a stvara probleme i kod testiranja dobrovoljnih darivatelja krvi (DDK) gdje je pozitivan rezultat DAT-a pronađen u prosjeku u jednog na 1000 darivatelja prema studiji provedenoj u SAD-u i u jednog na 1400 dobrovoljnih darivatelja krvi prema studijama provedenim u Velikoj Britaniji i Francuskoj. Također prema jednoj studiji provedenoj u SAD-u, u više od 80% DDK kod kojih je DAT bio pozitivan jačina je bila +1 ili slabija, u 18% slučajeva je bila +2, a u samo 3% +3 i +4. U većini slučajeva radilo se o eritrocitima obloženim s IgG protutijelima. Stavovi i razmišljanja stručnjaka su vrlo različiti i kreću se od onih koji smatraju da u potpunosti treba ignorirati DAT pozitivan nalaz kod DDK do onih koji tvrde da će u više od 70% slučajeva eritrociti takvih darivatelja imati skraćeno vrijeme života te da 10% njih ima i jasne znakove anemije. Osim kod DDK pozitivan nalaz DAT-a moguće je pronaći i u 1-15% slučajno testiranih bolničkih bolesnika bez znakova hemolize. Zbog svega navedenog jako je važno da se pozitivan rezultat DAT-a interpretira u skladu s kliničkom slikom bolesnika. (2)

## **1.6. Klinička stanja s pozitivnim DAT-om**

DAT može biti pozitivan u mnogim bolestima i kliničkim stanjima. Brojni su slučajevi pozitivnog DAT-a među bolesnicima s malignim bolestima, s autoimunim bolestima kao što je sistemski eritemski lupus i u stečenim imunodeficijentnim bolestima, AIDS-u. DAT može biti pozitivan i u brojnim drugim stanjima kao što je hipergamaglobulinemija, talasemija, srpasta anemija te kod terapije intravenskim imunoglobulinima. U ovim stanjima najčešće je riječ o nereaktivnim eluatima jer su citofilna protutijela iz bolesnikove plazme vezana na eritrocite nespecifična. Pozitivan DAT možemo pronaći i kod pacijenata nakon operacije srca ili u malaričnih bolesnika. Ipak, važnost DAT-a najveća je u dijagnostici autoimunih hemolitičkih anemija, lijekovima izazvanim hemolitičkim anemijama, hemolitičkoj bolesti novorođenčadi i hemolitičkim transfuzijskim reakcijama. (2)

### **1.6.1. Hemolitička bolest novorođenčeta**

Hemolitička bolest novorođenčeta stanje je u kojem je životni vijek djetetovih eritrocita skraćen zbog djelovanja specifičnih protutijela koja iz cirkulacije majke prelaze kroz placentu tj. posteljicu. Prijelaz protutijela je unilateralan, ide samo od majke prema fetusu. (2) Od svih razreda protutijela sposobnost prolaska kroz posteljicu posjeduju samo IgG protutijela i to uglavnom podrazredi IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>3</sub>. Većina IgG protutijela djeluje direktno protiv bakterija, gljivica i virusnih antigena te je njegova primarna uloga u zaštiti djeteta. Međutim u HBN protutijela su usmjerena na eritrocite djeteta jer dijete posjeduje one antigene koje majka nema, a dijete ih je naslijedilo od oca. Aktivni transport protutijela s majke na dijete započinje u drugom tromjesečju i nastavlja se i nakon rođenja djeteta. (3)

HBN se dijeli u 3 skupine ovisno o specifičnosti IgG protutijela koje ju je izazvalo. (2)



Prvoj skupini pripada HBN uzrokovana RhD protutijelima, samim ili rjeđe u kombinaciji s anti-C ili anti-E. (2)

Drugoj skupini pripadaju ABO hemolitičke bolesti koje nastanu zbog IgG anti-A i anti-B u žena krvne grupe O koje nose dijete krvne grupe A, B i AB. (2)

Treća skupina su „ostale“ HBN koje uzrokuju protutijela kao anti-C, anti-K, rjeđe anti-E i anti Fy<sup>a</sup>, a vrlo rijetko anti-Jk<sup>a</sup> i anti-Jk<sup>b</sup> te neka druga protutijela. (2)

Za ABO hemolitičke bolesti nema specifičnih testova s kojima bi se mogle predvidjeti tijekom trudnoće. Dijagnoza se uglavnom postavlja nakon poroda. Nasuprot tome anti-D i „ostale“ HBN se mogu predvidjeti i ranije tokom trudnoće. Kakve će posljedice bolest imati za dijete ovisi o titru antitijela, njihovoj specifičnosti kao i o broju antigenskih mjesta na eritrocitnoj membrani. (2)

Najvažniji test za potvrdu dijagnoze HBN je DAT s anti-IgG reagensom. Pozitivan rezultat testa pokazatelj je da su protutijela prisutna na membrani eritrocita djeteta, međutim stupanj jačine same reakcije ne mora korelirati s težinom bolesti. (3) Ako su testovi pretraživanja iregularnih protutijela u majke tijekom trudnoće i na porodu bili negativni, a dijete ima pozitivni DAT uvijek se prvo treba posumnjati na ABO HBN. Na ABO HBN se može posumnjati i samo na osnovu kliničke slike u slučajevima kad je DAT negativan. Ukoliko dijete ima žuticu, a DAT je negativan važno je da se otkriju drugi potencijalni uzroci žutice. (2)

### 1.6.2. Hemolitička transfuzijska reakcija

Hemolitička transfuzijska reakcija predstavlja najčešći uzrok smrti među komplikacijama transfuzijskog liječenja. Uzrokovana je ubrzanom razgradnjom eritrocita nakon transfuzije krvnog pripravka. Uzroci mogu biti imunološkog i neimunološkog podrijetla. Najčešće je uzrok imunološka nepodudarnost između transfudiranih eritrocita i antieritrocitnih protutijela prisutnih u primateljevu serumu. HTR može uzrokovati protutijelo nastalo imunizacijom na bilo koji od eritrocitnih antigena, a koje reagira na 37°C, kao i protutijelo koje reakcijom aktivira komponente komplemента. Prema mjestu razgradnje eritrocita, iako su oba mehanizma razgradnje zastupljena u svakoj reakciji, HTR se dijele i na intravaskularne i ekstravaskularne. Dodatno se dijele na akutne ili rane i odgođene ili kasne. (2)

**Rane ili akutne HTR** nastaju odmah, tijekom transfuzije ili do 24 sata od početka transfuzije. U većini slučajeva akutne HTR su uzrokovane pogrešnom krvnom grupom, odnosno greškom osoblja u postupku prijetransfuzijskog ispitivanja i to najčešće pogreškom u identifikaciji bolesnika. (2)

**Kasne ili odgođene HTR** javljaju se nakon 24 sata, najčešće 2-21 dan nakon transfuzije. U osnovi zbivanja odgođene HTR radi se o transfuziji eritrocita koji posjeduju antigen s kojim je primatelj već ranije bio u kontaktu. Ponovni dodir s tim antigenom izaziva sekundarni imunološki odgovor i ubrzano stvaranje potentnih specifičnih protutijela IgG razreda. Stvaranje protutijela ovisit će o količini i imunogeničnosti transfudiranih antigena. Kako se količina cirkulirajućih protutijela povećava, ubrzava se i razgradnja eritrocita. (2)

Za dijagnozu HTR najvažniji su serološko ispitivanje, laboratorijski nalazi i klinička slika. (2) Transfuzijska procedura u slučaju HTR uključuje administrativne provjere, vizualnu inspekciju seruma te DAT. U slučajevima kada postoji sumnja na trenutnu ili odgođenu HTR treba uzeti uzrok krvi, nakon transfuzije krvnog pripravka i napraviti DAT. Nakon HTR na eritrocite su uglavnom vezani IgG i/ili IgG + C3d, rijetko je vezan C3b. Ispitivanja su pokazala da je DAT pozitivan u 89% slučajeva

HTR. DAT može biti negativan iako se radi o HTR, ukoliko se nepodudarne transfundirane stanice odmah unište. Negativan DAT često je i vezan za akutnu intravaskularnu hemolizu. U oba slučaja, i kod trenutnih i odgođenih HTR, DAT može biti pozitivan ali pokazivati miješanu aglutinaciju. Miješana aglutinacija znači da se radi o kombinaciji aglutiniranih stanica donora zajedno s neaglutiniranim stanicama pacijenta. (3)

### 1.6.3. Autoimune hemolitičke anemije

Autoimune hemolitičke anemije bolesti su koje karakterizira pojava autoprotutijela koja reagiraju na vlastite eritrocite i skraćuju njihov životni vijek. Iako prisutnost autoprotutijela i obloženih pacijentovih eritrocita upućuje na AIHA-u potrebne su i dodatne informacije da bi se mogla potvrditi dijagnoza. Prije svega važno je utvrditi da se eritrociti uništavaju imunološki posredovanim procesom. (2) Dijagnostički testovi za AIHA-u uključuju DAT i to prvo primjenu polispecifičnog AHG, a poslije monospecifičnog. (3)

AIHA se dijele na: tople, hladne i uzrokovane lijekovima. (3)

**Tople AIHA** uzrokovane su protutijelima koja se maksimalno vežu na temperaturi od 37°C i one čine oko 70% svih AIHA. U 80% slučajeva toplih AIHA kod pacijenata je prisutno IgG protutijelo i to uglavnom podrazredi IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>3</sub>. Eritrociti su u 20% slučajeva obloženi samo s IgG, s IgG i komplementom u 67% slučajeva i samim komplementom u 13% slučajeva. Sva topla protutijela neće uzrokovati hemolizu međutim nije ih moguće razlikovati od onih koja će ju uzrokovati. (3) Kod toplih AIHA monospecifični DAT je reaktivan samo ili pretežno s anti-IgG. (1) U rijetkim slučajevima toplih AIHA DAT može biti i negativan zbog vezanja IgA ili IgM. Topla protutijela često interferiraju u izvođenju rutinskih testova. Kod transfuzije pacijenta s toplom AIHA postoji zabrinutost zbog mogućeg maskiranja aloprotutijela toplim autoprotutijelima. (3)

**Hladne AIHA** su zastupljene u otprilike 18% slučajeva, a uzrokuju ih autoprotutijela koja najbolje reagiraju pri temperaturi od 4°C pa se nazivaju hladnim autoprotutijelima. Takva protutijela su IgM klase. Najzastupljenije hladno autoprotutijelo je anti-I. Ova protutijela se reverzibilno vežu za eritrocite kada se snizi temperatura okoliša i potom aktiviraju komponente komplekta (C3,C4). Ako se temperatura povisi protutijela eluiraju, a na membrani eritrocita ostaju komponente komplekta. Većina autoprotutijela su upravo hladna benigna protutijela koja se mogu pronaći u serumu većine zdravih ispitanika. Uglavnom ne uzrokuju interferencije s obzirom da se većina rutinskih pretraga ni ne izvodi pri toj temperaturi. Međutim kada je velika količina takvih protutijela prisutna mogu pridonjeti spontanoj aglutinaciji eritrocita. Posljedica toga su lažno pozitivni rezultati DAT-a. Da bi se ovo spriječilo preporučuje se ispiranje stanica 1 do 2 puta s fiziološkom otopinom zagrijanom na 37°C što će dovesti do elucije protutijela. Kada je uzorak pacijenta pravilno prikupljen u epruvetu s EDTA antikoagulansom DAT pacijenta s hladnim autoprotutijelima će biti negativan. Razlog tome je to što je monospecifični DAT koji se koristi reaktivan samo s anti-C3. No, ako se koristi epruveta bez antikoagulansa zbog koagulacije će doći do spontane aktivacije komplekta što će dati pozitivan rezultat DAT-a. Osim benignih postoje i patološka hladna autoprotutijela. Većina ih ipak ne uzrokuje destrukciju eritrocita ali kod nekih pacijenata može doći do razvoja hemolitičke anemije. Ova protutijela osim što reagiraju pri 4°C mogu reagirati i pri temperaturi od 25°C do 31°C. Rezultati DAT-a kod ovih pacijenata su pozitivni zbog aktivacije komplekta. (3)

Oko 12% AIHA su one lijekovima inducirane. (3) Kod njih je DAT pozitivan s anti-IgG, IgG + C3d ili samo C3d, ovisno o mehanizmu nastanka. (1) Na lijekovima induciranu hemolitičku anemiju, s obzirom da je rijetka, treba pomisliti onda kada nema drugih mogućih objašnjenja i kada pacijent ima povijest uzimanja određenog lijeka. Za sada su objašnjena četiri mehanizma kojima lijekovi induciraju anemiju, a to su: nastajanje imunog kompleksa, adsorpcija lijeka, modifikacija membrane i proizvodnja autoantitijela. Nastajanje imunog kompleksa zasniva se na tome da određena antitijela normalno prisutna u serumu prepoznaju određene determinante na lijeku. Kod sljedećeg uzimanja lijeka, zbog imunizacije, dolazi do nastanka kompleksa lijek-antitijelo i

posljedično aktivacije komplementa. Nastali topljivi kompleks se adsorbira na membranu eritrocita koji onda zbog aktivacije komplementa bude liziran. Rezultati DAT-a kada se koristi polispecifični AHG će biti pozitivni. Kod primjene monospecifičnog AHG aglutinacija se događa s anti-komplement ali ne i s anti-IgG reagensom zato što nastali kompleks eluira s membrane eritrocita tijekom ispiranja. Mehanizam adsorpcije lijeka podrazumijeva vezanje lijeka na proteine pa tako i na one koji se nalaze na membrani eritrocita. Najčešći primjer ovog mehanizma je stvaranje protutijela na penicilin, koja se mogu pronaći u otprilike 3% hospitaliziranih pacijenata koji primaju visoke doze penicilina. Međutim unutar njih samo će ih 5% razviti hemolitičku anemiju što znači da je jako mali postotak pozitivnih DAT testova. Taj mali postotak posljedica je i činjenice da pacijenti moraju primiti ogromne doze penicilina da bi došlo do aglutinacije stanica. Osim toga većina protutijela na penicilin su IgM klase pa ih se ni nemože detektirati standardnim AHG reagensima. Protutijelo koje je odgovorno za pozitivan DAT je IgG. Treći mehanizam djelovanja je putem modifikacije membrane eritrocita. Temelji se na tome da neki cefalosporini mogu modificirati eritrocite tako da se plazmatski proteini mogu vezati na njihovu membranu. Posljedično eritrociti od otprilike 3% pacijenata će dati pozitivan rezultat DAT testiranja. Četvrti mehanizam djelovanja je putem formacije autoantitijela. Za razliku od ranije spomenutih lijekova gdje se stvaralo autoantitijelo na determinante lijeka ili kombinaciju lijeka i antigena na eritrocitu, alfametildopa (Aldomet) inducira proizvodnju autoprotutijela koje specifično prepoznaje eritrocite. Pozitivan DAT je prisutan u 10% do 20% pacijenata koji primaju Aldomet kao antihipertenziv. Međutim samo mali dio njih, od 0.5% do 1%, će razviti hemolitičku anemiju. U tom slučaju treba prestati s uzimanjem lijeka što će postepeno dovesti do prestanka produkcije autoantitijela, no može proći i do par mjeseci prije nego što rezultati DAT-a budu negativni. (3)

Najveći problem kod testiranja AIHA je velika osjetljivost testova. U nekim testovima čak od 5 do 15% hospitaliziranih bolesnika ima pozitivan DAT, no nemaju ni laboratorijske ni kliničke znakove hemolize. DAT u ispitivanju AIHA može biti i lažno negativan. Negativan je u oko 2 do 5% imunskih hemolitičkih anemija. U tim lažno negativnim AIHA autoprotutijela mogu biti ispod praga osjetljivosti. Takvi pacijenti

najčešće imaju više IgG-a na svojim stanicama nego što je normalno, ali manje nego što je moguće detektirati rutinskim testovima ili AIHA može biti uzrokovana drugim imunskim mehanizmom koji nije obuhvaćen ovim testom. Također pacijentovi eritrociti mogu biti senzibilizirani s IgA ili IgM, a kako AHG reagensi uglavnom ne sadržavaju antitijela na IgA i IgM ne mogu se ni detektirati. Katkad je uzrok negativnom testu izuzetno jaka intravaskularna hemoliza. (1) U ispitivanju AIHA koristi se i semikvantitativan titar DAT-a, koji služi za semikvantitativno određivanje količine autoprotutijela ili aloprotutijela i komplementa vezanih na bolesnikove eritrocite. Izvodi se s bolesnikovim eritrocitima i dvostrukim razrjeđenjem AHG reagensa s kojim je bio pozitivan. Stupnjevanjem jačina aglutinacija procjenjuje se težina i stupanj hemolize. Služi i za praćenje učinka liječenja. Kada i ako dođe do poboljšanja AIHA, titar i score DAT-a se obično značajno smanje. (2)

## 1.7. Čimbenici koji utječu na DAT

Kao rezultat loše laboratorijske tehnike ili nespecifične reakcije mogu nastati lažno negativni ili lažno pozitivni rezultati direktnog antiglobulinskog testa. Zato je vrlo važno poznavati sve čimbenike koji mogu utjecati na rezultate testiranja. Također kako bi rezultati bili vjerodostojni neophodne su kontrole kvalitete reagensa i dodavanje Coombsove kontrole u sve negativne testove. Coombsova kontrola podrazumijeva dodavanje senzibiliziranih eritrocita, najčešće IgG senzibiliziranih. Dodavanje takvih stanica u negativne testove trebalo bi izazvati aglutinaciju. Međutim ako ni tada ne dođe do nastanka aglutinata znači da rezultati testiranja nisu ispravni te test treba ponoviti. (2,3)

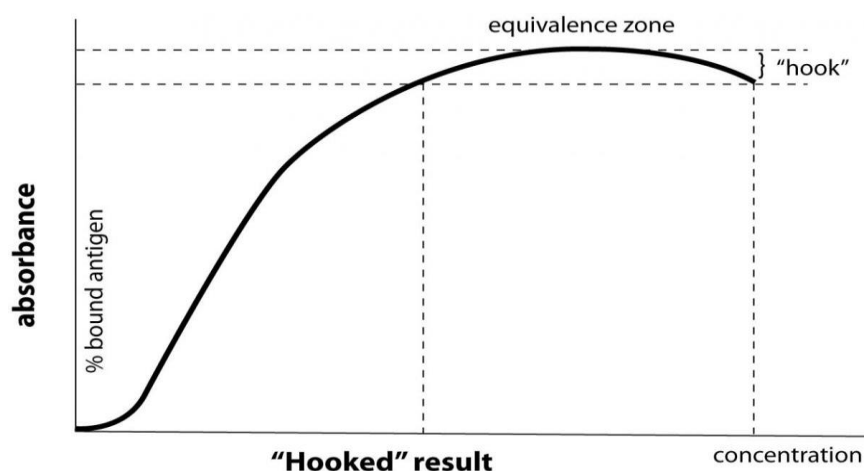
- Prvi od čimbenika na koji je važno pripaziti je da se uzorak krvi za izvođenje DAT-a uvijek uzima u epruvetu s antikoagulansom, najčešće EDTA, da bi se spriječila in vitro aktivacija komplementa i posljedično lažno pozitivni rezultati testiranja. (2,3)

- Nadalje jako važan korak na koji treba pripaziti tijekom izvođenja testa je ispiranje stanica. Ono je neophodno i kod izvođenja DAT-a i IAT-a klasičnom metodom u epruveti. Stanice je potrebno minimalno 3 puta isprati prije dodavanja AHG reagensa. Ispiranjem se uklanjaju slobodni nevezani globulini. Neadekvatno ispiranje može dovesti do lažno negativnih rezultata zbog neutralizacije AHG reagensa. Ispiranje treba obaviti u što kraćem mogućem vremenu da bi se spriječila elucija antitijela niskog afiniteta. Važno je da stanični talog bude u potpunosti resuspendiran prije sljedećeg ispiranja. Također važno je da se nakon zadnjeg ispiranja u potpunosti ukloni tekućina s kojom se ispiralo jer ostatna tekućina može dovesti do dilucije AHG reagensa i smanjiti osjetljivost testa. (3)
- Centrifugiranje u svakom ispiranju treba biti dostatno za nastanak kompaktnog staničnog taloga koji onda minimizira mogućnost gubitka stanica. (3)
- Inkubacija nije potrebna za DAT s obzirom da se vezanje protutijela i/ili komplementa događa in vivo za razliku od IAT-a kod kojeg se vezanje događa in vitro. (3)
- Otopina za ispiranje treba biti svježija i optimalnog pH između 7.2 - 7.4. Otopine koje se pohrane na duže vrijeme u plastične posude pokazuju pad u pH, što može dovesti do povećane elucije protutijela tijekom ispiranja. Promjene u pH su jako važne kod primjene monoklonskih reagensa, zato što se pokazalo da monoklonska antitijela imaju jako uski pH raspon djelovanja. Treba imati na umu da otopine mogu biti i kontaminirane s bakterijama što isto može dovesti do lažno pozitivnih rezultata. (3)
- AHG treba dodati stanicama odmah nakon ispiranja da bi se smanjila šansa elucije protutijela sa stanica i neutralizacije AHG. Važno je reagens pravilno pohraniti jer u suprotnom i kod njih može doći do bakterijske kontaminacije. Također ukoliko se AHG čuva na preniskim temperaturama ili se pretjerano zagrije može izgubiti reaktivnost. Količina dodanog AHG treba biti u skladu s količinom koju je odredio proizvođač. Međutim određena istraživanja su pokazala da se dodavanjem dvostrukog volumena AHG mogu nadvladati

problemi nastali tijekom ispiranja kao što su ostatna protutijela. Autori tih istraživanja su pokazali da će do neutralizacije AHG doći samo kod ostatnih slobodnih IgG antitijela ali ne i kod ostatnih komponenti komplementa. Komponente komplementa koje zaostanu nisu iste kao i one koje se vežu na eritrocite, što znači da ostatni serum ne sadržava C3b i C3d koji bi mogli neutralizirati anti-C3b i anti-C3d u AHG reagensu. (3)

- Jako je važno i da omjer količine antihumanog globulina i suspenzije eritrocita koja se koristi bude idealan. U slučaju kada postoji prevelika koncentracija analita može doći do nastanka prozonskog učinka ili Hookova efekta. Razlog ovome je to što se sva vezna mjesta na protutijelu iz reagensa zasite te ostaje suvišak analita. Reakcija se ne odvija u zoni ekvivalencije nego na silaznoj strani krivulje gdje vrijednost signala odgovara onome na uzlaznoj strani krivulje (prozona). U tom slučaju reakcijska krivulja ima zvonolik oblik odnosno savijena je poput udice (engl. hook). Rezultat su lažno snižene vrijednosti što vodi prema krivoj interpretaciji nalaza. Prozonski učinak česta je pojava u svakodnevnom radu u kliničkim laboratorijima i nikako se ne smije zanemariti. U slučaju sumnje na prozonski učinak uzorak je potrebno razrijediti. Ako se u razrijeđenim uzorcima dobije veći rezultat nego u nerazrijeđenom uzorku, radi se o prozonskom učinku. Uzorak se mora razrjeđivati sve dok se rezultati dvaju različitih razrjeđenja podudaraju (uzimajući u obzir faktor razrjeđenja). (7)





**Slika 4.** Prozonski učinak ili Hookov efekt

**Izvor:** WEB (15)

- Centrifugiranje staničnog taloga za očitavanje aglutinacije zajedno s metodom korištenom za resuspenziju stanica predstavlja ključan korak cijele tehnike. Preporučena metoda za procjenu AHG-a koristi relativnu centrifugalnu silu od 1000 okretaja u minuti. Korištenje jače centrifugalne sile daje veću osjetljivost ali to opet ovisi o metodi koja je korištena za resuspenziju. Ovo može dovesti do slabo lažno pozitivnih rezultata zbog neadekvatne resuspenzije ili ipak lažno negativnih rezultata ako je resuspenzija bila prejak. Preporuča se da se optimalni uvjeti centrifugiranja odrede pojedinačno za svaku centrifugu ovisno o promjeru rotora. (3)
- U radu važno je i pripaziti da je svo posuđe koje se koristi pravilno oprano. Različita nečistoća i prašina prisutna u posuđu može pridonjeti zgrušavanju crvenih krvnih stanica što nalikuje na stvaranje aglutinata te dovesti do lažnih rezultata testiranja. (3)

## 1.8. DAT u različitim metodama

Direktni antiglobulinski test može se izvoditi primjenom različitih metoda. U rutinskom radu uglavnom se primjenjuju klasična metoda u epruveti i metoda u mikrokartici ili mikrohemaglutinacijska metoda. (2) Obe metode imaju svoje prednosti i nedostatke. Klasična metoda u epruveti je starija metoda i izvodi se ručno za razliku od mikrohemaglutinacijske metode koja je automatizirana što smanjuje mogućnost pogreške tijekom izvođenja testa. I jedna i druga metoda koriste iste AHG reagensne samo što klasična metoda u epruveti zahtijeva ručno dodavanje AHG dok je u mikrohemaglutinacijskoj metodi on već dodan u mikrokarticu što olakšava i ubrzava cijeli postupak. (8) Također ona ne zahtijeva ni postupak ispiranja za razliku od klasične metode u epruveti pa je pogodnija za dokazivanje protutijela slabog afiniteta koja mogu eluirati s membrane eritrocita tijekom ispiranja. (3,8) Ove dvije metode razlikuju se i stupnju osjetljivosti: DAT koji se izvodi tehnikom u epruveti može detektirati od 100 do 500 molekula IgG i otprilike od 400 do 1100 molekula C3 po eritrocitu, a tehnikom u mikrokartici prag osjetljivosti moguće je spustiti na 70-150 molekula globulina po eritrocitu što znači da je mikrohemaglutinacijska metoda bolja u dokazivanju malog broja vezanih globulina. Međutim uvođenjem metode u mikrokartici povećala se učestalost pozitivnih DAT-a. Veći je broj pozitivnih nalaza bez kliničkog značaja ali je i manji broj klinički očitih hemoliza s negativnim DAT-om. (2) U prilog ovome govore i određene studije koju su ispitivale razlike u izvođenju DAT-a primjenjujući klasičnu metodu u epruveti i mikrohemaglutinacijsku metodu kao što je na primjer studija „The sensitivity, specificity, and clinical relevance of gel versus tube DATs in the clinical immunology laboratory“ koju su proveli Paz N. i suradnici 2004. godine (9), potom studija „Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test“ koju su proveli Novaretti MC i suradnici 2004. godine (10) i studija „A comparison of conventional tube test and gel technique in evaluation of direct antiglobulin test“ koju su proveli Sudipta S. Das, Rajendra Chaudhary i Dheeraj Khetan 2007. godine. (11)

## **2. CILJEVI RADA**

Ciljevi ovog rada su:

1. Odrediti DAT za 10 uzoraka u mikrohemaglutinacijskoj metodi.
2. Odrediti DAT za 10 uzoraka klasičnom metodom u epruveti.
3. Analizirati prednosti i nedostatke mikrohemaglutinacijske metode i klasične metode u epruveti, na uzorcima istih bolesnika, za određivanje DAT-a.

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

Istraživanje je provedeno u Centru za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Split. Provedeno je u 2 navrata, prvi put 19.4.2017. i potom 26.4.2017. godine. Oba puta odabrano je po 5 uzoraka krvi od bolničkih pacijenata te je za svaki od njih određen DAT klasičnom metodom u epruveti i mikrohemaglutinacijskom metodom. Od 10 pacijenata od kojih su uzeti uzorci samo je jedan imao klinički očite znakove hemolize.

#### **3.1. DAT u Ortho Biovue mikrohemaglutinacijskoj metodi**

Pribor i materijali potrebni za izvođenje testa uključuju:

1. Ortho Bio Vue polispecifične kartice
2. Epruvete
3. Fiziološku otopinu
4. Mikropipetu od 10 i 240 mikroL
5. Ortho BioVue centrifugu
6. Uzorake krvi uzete na antikoagulans K3 EDTA

Opis aktivnosti:

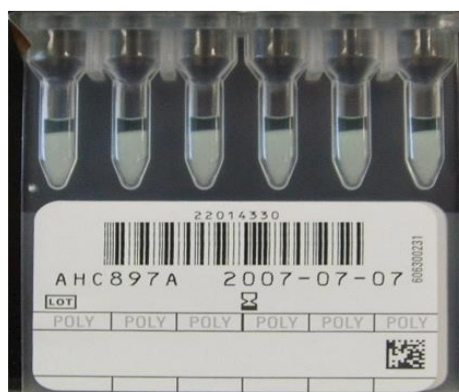
Za izvođenje DAT-a u mikrokarticama sa polispecifičnim AHG prvo je potrebno pripremiti 3-5% suspenziju eritrocita u fiziološkoj otopini. Ona se pripremi tako da se u 240 µL fiziološke otopine doda 10µL gustih eritrocita. Ova metoda ne zahtijeva ispiranje eritrocita osim ako se ne koriste eritrociti iz pupkovine. Ortho polispecifičnu mikrokarticu u kojoj se test izvodi treba uvijek pregledati prije upotrebe. Kako one već sadržavaju AHG treba provjeriti da li se on nalazi iznad nivoa staklenih kuglica te treba i provjeriti da nema kakvih oštećenja ili mjehurića. Kada se utvrdi da je mikrokartica

ispravna treba pravilno označiti odgovarajuće mjesto na mikrokartici i na to mjesto dodati 10 $\mu$ L prethodno pripremljene suspenzije eritrocita. Potom se mikrokartice centrifugiraju 5 minuta u Ortho BioVue centrifugi. I na kraju se očitaju rezultati.



**Slika 5.** Ortho BioVue centrifuga

**Izvor:** WEB (16)



**Slika 6.** Mikrokartice s AHG

**Izvor:** WEB (17)

#### Tumačenje rezultata:

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

Rezultat je pozitivan ako eritrociti nisu na dnu stupca. Označavamo ga sa:

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

+3 – Aglutinirani eritrociti su zadržani u gornjoj polovici stupca.

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

+1 – Većina aglutiniranih eritrocita se nalazi u donjoj polovici stupca.

+/- – Slabo pozitivan. Većina eritrocita je na dnu stupca, ali ne formiraju ravan rub.

m.f – *Mix field* ili miješana aglutinacija, jedan dio eritrocita je na dnu stupca, a dio se zadržava na vrhu.

### 3.2. DAT klasičnom metodom u epruveti

Pribor i materijali potrebni za izvođenje testa uključuju:

1. Centrifugu za epruvete
2. Aglutinoskop
3. Fiziološku otopinu
4. Polispetsifični antihumani globulin
5. Uzorake krvi uzete u epruvetu s antikoagulansom K3 EDTA
6. Epruvete
7. Pipete

Opis aktivnosti:

Za izvođenje testa odabrano je istih 10 uzroka krvi koji su se koristili i za izvođenje DAT-a u mikrokarticama. Za test se koriste samo gusti eritrociti koje je potrebno je minimalno 3 puta isprati. Ispiranje eritrocita provodi se u velikom volumenu fiziološke otopine te centrifugiranjem na 2500 okretaja 3 minute. Nakon svakog centrifugiranja ukloni se supernatant i doda nova otopina, taj proces se ponovi 3 puta. Nakon zadnjeg centrifugiranja treba jako pripaziti da u epruveti ne zaostane ništa otopine već da ostane samo čisti talog eritrocita. Sljedeći korak je pripremanje 3-5% suspenzije eritrocita. Suspenzija se priprema tako da se u 240  $\mu\text{L}$  fiziološke otopine doda 10  $\mu\text{L}$  gustih eritrocita koje smo prethodno oprali. U obilježenu epruvetu se potom doda 1 kap 3-5% suspenzije eritrocita te 2 kapi antihumanog globulina. Važno je da antihumani globulin koji se koristi bude zagrijan na sobnu temperaturu. Nakon toga opet slijedi centrifugiranje samo sada na 1000 okretaja 1 minutu. Epruvetu potom treba nježno protresti dok se sediment ne odvoji od dna epruvete i odmah očitati aglutinaciju. Sve negativne rezultate testa treba provjeriti dodavanjem 1 kapi Coombsove kontrole i ponavljanjem postupka centrifugiranja (1000 okretaja, 1 minuta) . Svi negativni testovi nakon dodataka Coombsove kontrole bi trebali biti pozitivni. U slučaju da i nakon

dotatka Coombsove kontrole rezultati testiranja ostanu negativni test treba ponoviti jer takvi rezultati nisu vjerodostojni.

Tumačenje rezultata:

Rezultat testa je negativan ako aglutinacija nije vidljiva golim okom ni pod aglutinoskopom, a Coombsova kontrola je pozitivna.

Rezultat testa je pozitivan ako je prisutna aglutinacija različitog stupnja izraženosti. Označavamo ga kao:

+4 – Eritrociti formiraju jedan veliki aglutinat.

+3 – Aglutinirani eritrociti formiraju 2-3 veća aglutinata.

+2 – Aglutinirani eritrociti formiraju više manjih aglutinata uz po koji veći aglutinat.

+1 – Aglutinirani eritrociti formiraju više nježnijih aglutinata bez slobodnih eritrocita.

+/- – Uz nježne aglutinate vidljive bez i/ili sa aglutinoskopom vidljivi i slobodni eritrociti.

m.f – *Mix field* ili miješana aglutinacija, uz veće aglutinate vidljivi slobodni eritrociti.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati DAT-a u mikrohemaglutinacijskoj metodi:

Tablica 1. Rezultati DAT-a u mikrohemaglutinacijskoj metodi

UZORAK	REZULTAT	KLINIČKA SLIKA PACIJENTA
1.	+0.5	nema hemolize
2.	+0.5	nema hemolize
3.	+1	nema hemolize
4.	+2	nema hemolize
5.	+2	nema hemolize
6.	+1	nema hemolize
7.	negativan	nema hemolize
8.	negativan	nema hemolize
9.	+2	nema hemolize
10.	+4	prisutna hemoliza

Rezultati testiranja mikrohemaglutinacijskom metodom pokazuju da 8 od 10 pacijenata ima pozitivan rezultat DAT-a, a hemoliza je prisutna u samo jednog od 10 pacijenata. Dva pacijenta (1 i 2) pokazuju stupanj aglutinacije od +0.5, dva pacijenta (3 i 6) stupanj aglutinacije od +1 i tri pacijenta (4, 5 i 9) stupanj aglutinacije od +2 iako nemaju prisutne znakove hemolize. Samo pacijent (10) s najvećim stupnjem aglutinacije od +4 pokazuje i kliničke znakove hemolize. Samo dva pacijenta (7 i 8) imaju negativan rezultat testiranja.



## 4.2. Rezultati DAT-a klasičnom metodom u epruveti

Tablica 2. Rezultati DAT-a dobiveni klasičnom metodom u epruveti

UZORAK	REZULTAT	COOMBSOVA KONTROLA	KLINIČKA SLIKA PACIJENTA
1.	negativan	pozitivna	nema hemolize
2.	negativan	pozitivna	nema hemolize
3.	negativan	pozitivna	nema hemolize
4.	negativan	pozitivna	nema hemolize
5.	negativan	pozitivna	nema hemolize
6.	negativan	pozitivna	nema hemolize
7.	negativan	pozitivna	nema hemolize
8.	negativan	pozitivna	nema hemolize
9.	negativan	pozitivna	nema hemolize
10.	+2	/	prisutna hemoliza

Rezultati testiranja klasičnom metodom u epruveti pokazuju da 9 od 10 pacijenta ima negativan rezultat testiranja i također tih istih 9 pacijenata nema kliničke znakove hemolize. Samo jedan pacijent (10) ima pozitivan rezultat DAT-a, a to je i jedni pacijent kod kojeg je prisutna hemoliza. Za 9 negativnih uzoraka napravljena je i Coombsova kontrola. Rezultati Coombsove kontrole za sve negativne uzorke bili su pozitivni što potvrđuje da su rezultati testiranja ispravni.

### 4.3 Usporedba rezultata DAT-a

Tablica 3. Usporedba rezultata DAT-a

UZORAK	REZULTATI		KLINIČKA SLIKA PACIJENTA
	MIKROHEM- AGLUTINACIJSKA METODA	KLASIČNA METODA	
1.	+0.5	negativan	nema hemolize
2.	+0.5	negativan	nema hemolize
3.	+1	negativan	nema hemolize
4.	+2	negativan	nema hemolize
5.	+2	negativan	nema hemolize
6.	+1	negativan	nema hemolize
7.	negativan	negativan	nema hemolize
8.	negativan	negativan	nema hemolize
9.	+2	negativan	nema hemolize
10.	+4	+2	prisutna hemoliza

Rezultati pokazuju da je u mikrohemaglutinacijskoj metodi bio značajno veći broj pozitivnih rezultata (8 od 10) u odnosu na klasičnu metodu u epruveti (1 od 10). Jedini pacijent (10) koji je klasičnom metodom u epruveti imao pozitivan rezultat testa je i jedini kod kojeg je prisutna hemoliza. Međutim jačina aglutinacije kod tog pacijenta u mikrohemaglutinacijskoj metodi je bila +4, a klasičnom metodom u epruveti jačina je iznosila +2 što znači da je prisutna razlika u jačini aglutinacije ovisno o korištenoj metodi. Taj pad je u prosjeku bio za +2 što se vidi i na uzorcima pod rednim brojem 4, 5 i 9 gdje je jačina aglutinacije u mikrohemaglutinacijskoj metodi iznosila +2, a poslije u klasičnoj metodi rezultat je bio negativan.

## 5. RASPRAVA

Za izvođenje direktnog antiglobulinskog testa danas se primjenjuju dvije različite metode: mikrohemaglutinacijska metoda i klasična metoda u epruveti. Kako bi se ispitale različite prednosti i nedostaci ovih dviju metoda sakupljeni su uzorci od 10 bolničkih pacijenata od kojih samo jedan pacijent ima prisutne znakove hemolize.

Mikrohemaglutinacijska metoda vrlo je jednostavna za izvođenje što je omogućilo njenu široku primjenu u laboratorijima. U rutinski rad uvedena je nešto kasnije od klasične metode u epruveti. Automatizirana je što ubrzava i olakšava izvođenje DAT-a. Ne zahtijeva ručno dodavanje AHG ni ispiranje eritrocita što smanjuje i mogućnost pogreške tijekom rada. Iz tablica 1 i 3 prikazanih u poglavlju Rezultati može se vidjeti da je primjenom ove metode 8 od 10 testiranih pacijenata imalo pozitivan rezultat DAT-a iako samo jedan od njih ima kliničke znakove hemolize. Ovakvi rezultati pokazuju da u ovom slučaju mikrohemaglutinacijska metoda ne korelira najbolje sa stanjem pacijenta jer je velik udio pozitivnih rezultata bez kliničkog značaja.

Klasična metoda u epruveti duže je u primjeni, izvodi se ručno i zahtijeva puno više vremena za izvođenje u usporedbi s mikrohemaglutinacijskom metodom. Zahtijeva i puno više koraka tijekom izvedbe što povećava i mogućnost pogreške tijekom rada. Iz tablica 2 i 3 prikazanih u poglavlju Rezultati može se vidjeti da je primjenom ove metode samo jedan pacijent imao pozitivan rezultat testiranja i to jedini pacijent koji ima i kliničke znakove hemolize. Svi ostali pacijenti su imali negativan rezultat testa što je i bilo u skladu s njihovom kliničkom slikom. Ovakav rezultat pokazuje da metoda u epruveti jako dobro korelira sa stvarnim stanjem pacijenta.

Usporedbom klasične metode i mikrohemaglutinacijske metode u tablici 3, vidljivo je da su rezultati testiranja za sve pacijente bili manji kada je korištena klasična metoda u epruveti u odnosu na mikrohemaglutinacijsku metodu. U prosjeku je stupanj aglutinacije kod DAT-a određenog klasičnom metodom manji za +2 što pokazuje da je mikrohemaglutinacijska metoda osjetljivija od klasične metode. Ovakvi rezultati

testiranja podudaraju se s onim što se već zna o ovim metodama. Neka od ranijih istraživanja već su potvrdila mikrohemaglutinacijsku metodu kao osjetljiviju jer je pokazano da može detektirati značajno manji broj molekula globulina na eritrocitnoj membrani. U studiji „The sensitivity, specificity, and clinical relevance of gel versus tube DATs in the clinical immunology laboratory“ koju su proveli Paz N. i suradnici 2004. godine dokazano je da je mikrohemaglutinacijska metoda osjetljivija od klasične metode ali su i naglasili da je pozitivan rezultat DAT-a dobiven isključivo mikrohemaglutinacijkom metodom upitnog značaja zbog velikog broja pozitivnih rezultata, što je bio slučaj i u ovom istraživanju. Također i studija „Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test“ koju su proveli Novaretti MC i suradnici 2004. godine dokazala je veću osjetljivost metode u gelu odnosno mikrohemaglutinacijske metode u detekciji klinički značajnih protutijela u odnosu na klasičnu metodu. Međutim u studiji „A comparison of conventional tube test and gel technique in evaluation of direct antiglobulin test“ koju su proveli Sudipta S. Das i suradnici 2007. godine dokazano je da mikrohemaglutinacijska metoda bolje korelira sa stanjem pacijenta jer su neki pacijenti unatoč očitim znakovima hemolize primjenom klasične metode u epruveti imali negativan rezultat testiranja. Ovakav rezultat testiranja nije u skladu s rezultatima ovog istraživanja koje je pokazalo da klasična metoda bolje korelira sa stanjem pacijenta. No, upravo zbog toga što mikrohemaglutinacijska metoda često rezultira velikim brojem pozitivnih nalaza bez kliničkog značaja, a klasična metoda će katkad unatoč očitim znakovima hemolize dati negativan rezultat testa autori ove studije su naglasili da se laboratoriji ne bi trebali oslanjati samo na rezultate jedne od ovih metoda već da bi trebali koristiti i jednu i drugu metodu u procjeni rezultata direktnog antiglobulinskog testa.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Mikrohemaglutinacijska metoda je osjetljivija metoda od klasične metode u epruveti jer može detektirati značajno manji broj molekula globulina vezanih na eritrocitnoj membrani.
2. Mikrohemaglutinacijska metoda je praktičnija za primjenu u rutinskom radu jer je brža i jednostavnija.
3. Klasična metoda u epruveti zahtijeva više vremena za izvođenje, uključuje veći broj koraka i time nosi veći rizik od pogreške.
4. Mikrohemaglutinacijska metoda je preosjetljiva jer njena primjena rezultira većim brojem pozitivnih rezultata direktnog antiglobulinskog testa bez kliničkog značenja.
5. Klasična metoda u epruveti, iako manje osjetljiva, bolje korelira sa stvarnim stanjem pacijenta odnosno sa situacijom koja se odvija in vivo.

## 7. LITERATURA

1. Grgičević D. i sur. Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2006.
2. Golubić Ćepulić B. i sur. Klinička transfuziologija: Prijetransfuzijsko ispitivanje. Zagreb: Zavod za kliničku transfuziologiju, KBC Zagreb; 2001.
3. Harmening DM, PhD, MT (ASCP), CLS (NCA). Modern Blood Banking and Transfusion Practices. 4th ed. Philadelphia: F.A Davis Company. 1999.
4. Brecher ME. Technical Manual. 14th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks. 2003.
5. Andreis Igor i sur. Imunologija. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
6. Caroline Richmond. Professor Robin Coombs: Inventor of the Coombs test. Independent. 2006.
7. Dodig S. Interferencije svojstvene kvantitativnim imunokemijskim metodama. Biochemia Medica. 2009; 19 (1): 50-62.
8. Victoria Parker and Christopher A. Tormey. The Direct Antiglobulin Test: Indications, Interpretation, and Pitfalls. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2017; 141 (2): 305-310.
9. Paz N, Itzhaky D, Ellis MH. The sensitivity, specificity and clinical relevance of gel versus tube DATs in the clinical immunology laboratory. Immunohematology. 2004; 20 (2): 118-121.
10. Novaretti MC, Jens E, Pagliarini T, Bonifacio SL, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DA. Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test: a large study. J Clin Lab Anal. 2004; 18(5): 255-8.

11. Sudipta S. Das, Rajendra Chaudhary, Dheeraj Khetan. A comparison of conventional tube test and gel technique in evaluation of direct antiglobulin test. *Hematology*. 2007. 12(2): 175-8.
12. <https://www.slideshare.net/radenovic/transfuzijska-medicina-online-teaj>
13. [https://en.wikipedia.org/wiki/Coombs\\_test#/media/File:Coombs\\_test\\_schematic.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Coombs_test#/media/File:Coombs_test_schematic.png)
14. <http://www.biognost.hr/flippingbook/Imunohematologija/EN/files/assets/common/downloads/Immunohematology.pdf>
15. <http://www.biochemia-medica.com/content/interferencije-svojstvene-kvantitativnim-imunokemijskim-metodama>
16. <https://www.google.hr/search?q=Ortho+BioVue+centrifugu&source>
17. <https://www.google.hr/search?tbm=isch&q=direct+antiglobulin+test>

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Direktni antiglobulinski test koristi se za detekciju in vivo senzibiliziranih eritrocita. Dio je dijagnostičkih ispitivanja u hemolitičkoj transfuzijskoj reakciji, hemolitičkoj bolesti novorođenčadi i u autoimunim te lijekovima induciranim hemolitičkim anemijama. Za izvođenje DAT-a prvo se samo primjenjivala klasična metoda u epruveti, a potom je u rutinski rad uvedena i mikrohemaglutinacijska metoda.

**Cilj:** Glavni cilj ovog rada bio je utvrditi razliku u osjetljivosti između klasične metode i mikrohemaglutinacijske metode.

**Metode i materijali:** Prikupljeni su uzroci od 10 bolničkih pacijenata te je svakom pacijentu određen direktni antiglobulinski test koristeći i jednu i drugu metodu. Istraživanje je provedeno u dva navrata u KBC-u Split u Centru za Transfuzijsku medicinu.

**Rezultati:** Rezultati testiranja mikrometodom pokazali su da 8 od 10 pacijenata ima pozitivan DAT za razliku od rezultata klasične metode u epruveti gdje je samo jedan pacijent imao pozitivan DAT.

**Zaključak:** S obzirom da je samo jedan od 10 pacijenata imao klinički očite znakove hemolize pokazalo se da klasična metoda bolje korelira sa stanjem pacijenta od mikrohemaglutinacijske metode. Jedini pacijent s pozitivnim rezultatom u klasičnoj metodi imao je jači stupanj aglutinacije u mikrohemaglutinacijskoj metodi što pokazuje da je ona osjetljivija. Međutim iako osjetljivija mikrohemaglutinacijska metoda se pokazala i preosjetljivom jer je 7 pacijenata imalo pozitivan rezultat testa iako nisu imali kliničke znakove hemolize što znači da ova metoda i ne korelira najbolje sa stanjem pacijenta. Tijekom izvođenja DAT-a mikrohemaglutinacijska metoda se pokazala puno jednostavnijom od klasične metode za izvođenje.

**Ključne riječi:** direktni antiglobulinski test, antihumani globulin, klasična metoda, mikrohemaglutinacijska metoda



## 9. SUMMARY

**Introduction:** Direct antiglobulin test is used to demonstrate in vivo coating of red blood cells. It is an important diagnostic test for hemolytic transfusion reaction, hemolytic disease of newborns and for autoimmune and drug induced hemolytic anemia. For the performance of DAT first only tube test method was used but later micromethod was also introduced into routine work.

**Objective:** The main aim of this research was to determine the difference in sensitivity between tube test method and micromethod.

**Materials and Methods:** To determine the difference in sensitivity, samples from 10 hospital patients were collected and each patient was assigned a direct antiglobulin test using both methods. The research was conducted in KBC Split at the Transfusion Medicine Center.

**Results:** Micromethod test results showed that 8 out of 10 patients had a positive DAT compared to tube method test results where only one patient had a positive DAT.

**Conclusion:** Since only one out of 10 patients had clinically obvious signs of haemolysis, it was found that the classical method correlates better with the patient's condition. The only positive patient sample in the tube method, had a higher degree of agglutination in micromethod indicating that micromethod is more sensitive. However, although more sensitive micromethod has shown to be hypersensitive because 7 patients had a positive test result even though they had no clinical signs of hemolysis, which means that this method does not correlate best with the patient condition. During DAT performance micromethod proved to be much simpler than the classical method.

**Keywords:** direct antiglobulin test, antihuman globulin, micromethod, tube test method

## 10. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI:

IME I PREZIME: Marja Klarić

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 09.02.1996., Split

ADRESA STANOVANJA: Poljička cesta 4 Sumpetar Jesenice

MOBITEL: 091 98 36 499

EMAIL: [marja.klaric92@gmail.com](mailto:marja.klaric92@gmail.com)

### OBRAZOVANJE:

2002. – 2010. Osnovna škola „Jesenice - Dugi Rat“, Oriž Jesenice

2010. – 2014. Opća gimnazija „Marko Marulić“, Split

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

21.4.2017. Priznanje Sveučilišta u Splitu za izvrsno zalaganje na stručnoj praksi u KBC-u Split

### JEZICI:

Engleski jezik: aktivno

Talijanski jezik: aktivno