Titar izohemaglutinina kod djece u dobi od 6 mjeseci do 3 godine

Bašić, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:030181

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ivan Bašić

Titar izohemaglutinina kod djece u dobi od 6 mjeseci do 3 godine

Završni rad

Split, 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ivan Bašić

Titar izohemaglutinina kod djece u dobi od 6 mjeseci do 3 godine/Izohemagglutinin titer at children from 6 months to 3 years old

Završni rad/Bachelors Thesis

Mentor:
Doc.dr.sc. Slavica Dajak

Split,2018.

Sadržaj

1. Uvod 1
1.1. Transfuzijska medicina 1
1.3. Krvne grupe 3
1.3.1. ABO sustav 4
1.3.2. Rh sustav krvnih grupa 5
1.4. Određivanje krvnih grupa metodom aglutinacije 6
1.5. Titar protutijela 7
1.5.1. Izrada serijskih razrjeđenja 8
1.6. Izohemaglutinini 9
1.6.1. Nastanak ABO-izohemaglutinina 10
1.6.2. Građa ABO-izohemaglutinina 12
1.6.3. Djelovanje ABO-izohemaglutinina 13
1.6.4. Važnost izohemaglutinina u kliničko-laboratorijskoj praksi 14
1.6.4.1. ABO izohemaglutinini u transplantacijskoj medicini 14
1.6.4.2. ABO-izohemaglutinini u transfuzijskoj medicini 15
1.6.4.3. Imunodeficijencije 16
1.7. Laboratorijska dijagnostika imunodeficijencija 16
1.7.1. Krvna slika 17
1.7.2. Mjerenje razine imunoglobulinskih razreda 17
1.7.3. Mjerenje titra izohemaglutinina 18
2. Cilj istraživanja 19
3. Metode i ispitanici 20
4. Rezultati 22
5. Rasprava 25
6. Zaključak 27
7. Literatura 28
8. Sažetak 31
9. Summary 33
10. Životopis 35

1. Uvod

1.1. Transfuzijska medicina

Transfuzijska medicina se bavi proizvodnjom krvnih pripravaka dobivenih od darivatelja krvi i liječenjem pacijenata krvnim pripravcima. Sastavni je dio kliničke i laboratorijske medicine. Nastajanje transfuzijske medicine kakvu u danas susrećemou svakodnevnoj praksi započeo je James Blundell. On je bio ginekolog i fiziolog te je često liječio posljedice krvarenja u sklopu vlastitog zanimanja. Želeći spriječiti u budućnosti povećanje mortaliteta u takvim situacijama, 1818. godine je izveo prvu uspješnu transfuziju krvi koristeći krv muža kako bi smanjio posljedice krvarenja supruge nakon poroda. Ipak, unatoč tom uspješnom pokušaju, trebalo je čekati do početka dvadestog stoljeća za sljedeći važan korak u razvoju transfuzijske medicine, otkrića Karla Landsteinera 1901.godine. Do tog trenutka je postojao jako velik broj neuspješnih transfuzija koje su često završavale smrtnim ishodom zbog neotkrivenih svojstava krvi i njenih komponenata (1).

Uspješnost se temeljila isključivo na slučajnoj kompatibilnosti između donora i pacijenta. Landsteiner je miješao eritrocite i serum iz uzoraka svog osoblja te je primjetio kako je došlo do aglutinacije eritrocita između seruma jednih osoba s eritrocitima drugih. Iz rezultata daljnjih pokusa aglutinacije, otkrio je krvne grupe. Objasnio je postojanje prirodnih antitijela koja reagiraju s antigenima na površini crvenih krvnih stanica čovjeka nekompatibilne krvne grupe. Na primjer, ako osoba krvne grupe A primi krv osobe krvne grupe B, antitijela primatelja će reagirati s eritrocitima donora te će doći do hemolize(raspadanja) eritrocita uz oslobađanje hemoglobina koji u većim količinama može dovesti do opasnih posljedica, a u najgorem slučaju i do smrtnog ishoda. Ovim otkrićem austrijski biolog i liječnik je transfuziji dao znanstveni temelj te smanjio rizik pogreške u praksi. Primio je Nobelovu nagradu za svoj cjeloživotni rad 1930.godine (1).

Imunohematolog Philip Levine 1939. ukazuje da unatoč poznavanju krvnih antigena i dalje postoje slučajevi nepodudaranja pri krvnoj transfuziji na primjeru slučaja žene čiji je serum aglutinirao 80% ljudi sa kojima se podudarao u dotad poznatim ABO antigenima. Daljnjim istraživanjima se uočava važnost Rh(D) antigena pri transfuziji

krvi te dolazi do razvoja točnijih i preciznijih testova. RhD antigen je jako važan u ginekološkoj medicini pri sprječavanju hemolitičke bolesti novorođenčeta koja se javlja u kombinaciji kada je majka RhD negativna, a dijete RhD pozitivno (1).

Nakon nekog vremena, pojavila se potreba za skladištenjem krvnih pripravaka da bi se mogli primijeniti u trenutku kada bude potrebna transfuzija. Belgijski liječnik Albert Hustin je zajedno sa svojim suradnicima otkrio kako je natrijev citrat idealan antikoagulans. Krvi je dodao natrijev citrat i glukozu te tako spriječio zgrušavanje eritrocita i omogućio njihovo čuvanje. Time je postao prvi čovjek koji je izveo neizravnu transfuziju. Nakon toga, počinju se stvarati banke krvi po svijetu te je 1930.godine u SSSR-u uspostavljen prvi nacionalni sustav za banke krvi (1).

Prva transfuzija krvi uz određivanje ABO krvne grupe u Hrvatskoj je izvedena 1924.godine u Ginekološkoj klinici u Petrovoj ulici (2).

1.2. Antigeni i protutijela

Antigen je svaka tvar ili molekula koja stimulira imunološki odgovor, složene molekule koje imunološki sustav prepoznaje kao tuđe. Antigeni po kemijskoj strukturi mogu biti glikoproteini, glikolipidi, ugljikohidrati ili proteini. Nalaze se na membrani eritrocita. Organizam može potaknuti imunosni odgovor na svaku crvenu krvnu stanicu koja nije komplementarna sa antigenima na vlastitim eritrocitima (3).

Protutijelo je sastavni dio obrambenog mehanizma imunološkog sustava. Antitijela su proteini iz grupe globulina koji se javljaju kao reakcija na strane tvari u organizmu. Nalaze se u serumu i ekstracelularnim tekućinama. Imunost izazvana protutijelima se naziva *humoralna imunost*. Nastaju kao produkt B-limfocita koji pripadaju skupini imunoglobulina i služe za zaštitu organizma od nepoznatog antigena. Prepoznaju karakteristični dio antigena *epitop* te se vežu za njega u kompleks Ag-At. Svako protutijelo se sastoji od dva teška i dva laka lanca koji su kovalentnim disulfidnim mostovima povezani u strukturu u obliku slova Y. Laki lanci su vezani za teške lanace, dok su teški lanci međusobno povezani.Prema građi, protutijela su podijeljena u pet grupa: antitijela klase IgM, IgD, IgA, IgG i IgE.

Imunosni odgovor započinje prepoznavanjem nepoznatog antigena, zatim slijedi preradba tog antigena te naposljetku uništavanje antigena. Način na koji imunosni

sustav prepoznaje nepoznati antigen se naziva imunizacija i smatra se najvažnijim dijelom svakog imunološkog procesa. Kada organizam dođe u prvi doticaj sa stranim antigenom, započinje stvaranje IgM protutijela, a nedugo potom se stvaraju IgG protutijela. Taj se proces naziva *primarna imunizacija*. Kada dođe do ponovnog susreta sa istim antigenom, organizam reagira *sekundarnim* imunološkim odgovorom. U ovom slučaju je samo IgG klasa protutijela zadužena za imunizaciju obzirom da je organizam već upoznat sa antigenom. Protutijela mogu aktivirati i komplement, sustav membranskih i serumskih proteina koji su međusobno funkcionalno povezani čijom aktivacijom dolazi do fagocitoze ili do hemolize nepodudarnih eritrocita. Aktivacija komplementa pokreće niz međusobno precizno reguliranih međureakcija (3).

Protutijela smo također podijelili na *aloprotutijela i autoprotutijela*. Aloprotutijela nastaju kao posljedica imunološke reakcije na strani antigen. Autoprotutijela napadaju vlastiti antigenski sustav te uništavaju vlastita protutijela, smatraju se jednim od najopasnijih poremećaja imuniteta koji može dovesti čak i do smrtnog ishoda (3).

U kliničkoj praksi su najvažnije klase protutijela IgM i IgG.IgM protutijela su velike pentamerne molekule koje ne prolaze kroz tjelesne membrane i posteljicu, ali zbog svoje veličine mogu povezati dva udaljena antigena. Optimalna temperatura djelovanja im je od 4°C do 18°C. Reagiraju pri početnom kontaktu sa antigenima i ukazuju na akutnu fazu bolesti.IgG protutijela su monomeri koji nastaju u naknadno obrambenoj fazi i zadržavaju se dulje u organizmu te na taj način štite organizam od ponovnog oboljenja u kratkom vremenskom razdoblju. Prisutnost IgG antitijela u organizmu čovjeka sugeriraju prethodno oboljenje ili umjetnu imunizaciju putem cjepiva (3).

1.3. Krvne grupe

Krvne grupe su nepromjenjive nasljedne biološke karakteristike koje se dobiju rođenjem te se prenose generacijski po Mendelovim zakonima nasljeđivanja. To su nasljedne osobine koje se nalaze na membranama krvnih stanica te jedna od najvažnijih klasifikacijskih odrednica krvi. Geni se nasljeđuju alelima ili se lokusi nalaze blizu jednom drugom na istom kromosomu. Na temelju načina nasljeđivanja, biokemijske

sličnosti i imunohematološke reaktivnosti preko 300 poznatih antigena svrstano je u sustave krvnih grupa, odnosno u skup antigena čiji se geni nalaze na jednom lokusu i zajednički se nasljeđuju. Nasljeđujemo po dva gena, jedan od svakog roditelja. Krvne grupe predstavlju strogu specifičnost svakog pojedinca, a serološki se izražavaju reakcijom antigen-antitijelo. U tablici 1. prikazan je sustav ABO krvnih grupa (4).

1.3.1. ABO sustav

ABO sustav krvnih grupa su ugljikohidratni antigeni na eritrocitnoj membrani i protutijela u plazmi. Predstavljaju jedne od najvažnijih ispitivanih antigena u transfuzijskoj medicini. Najvažniji je sustav u transfuzijskome liječenju jer ABO nepodudarne transfuzije uzrokuju akutnu hemolitičku reakciju, a ABO nekompatibilna transplantacija organa uzrokuje akutno odbacivanje organa(3).

Sustav posjeduje četiri različita fenotipa koji se temelje na izražaju ili neizražaju dva antigena na površini eritrocita A i B.ABO antigeni se nalaze u krvi na eritrocitima,trombocitima, na cirkulirajućim proteinima te otopljeni u plazmi kao glikolipidi. Za izražaj ABO antigena su odgovorna tri gena koja se nezavisno nasljeđuju: ABO gen se nalazi na devetom kromosomu pri čemu su A i B aleli kodominantni, H h geni na devetnaestom kromosomu i Se se gen koji određuje sekrotorni status osobe. Lokusi gena koji kodiraju ove antigene posjeduju tri alela A, B i O. Alel A kodira glikoziltransferazu koja proizvodi A antigen(N-acetilgalaktozamin), dok alel B kodira glikoziltransferazu koja proizvodi B antigen(D-galaktoza). Alel O nema funkciju pa samim time osobe sa krvnom grupom O nemaju A i B antigen na površini crvenih krvnih stanica, već se na površini takvih antigena nalazi prekursor A i B antigena-nemodificirani H antigen(L-fukoza). Sve osobe posjeduju enzim fukozil-transferazu koji katalizira sintezu H antigena. Što se tiče protutijela u ABO sustavu, anti-A i anti-B protutijela prisutna su u cirkulacijiosoba koje nemaju odgovarajući antigen. Javljaju se zbog izlaganja ABH antigenima koji se nalaze u okolišu. Svaki čovjek stvara prirodna protutijela protiv ABH antigena koji nije izražen na površini eritrocita. Obično se javljaju između trećeg i šestoga mjeseca života, a maksimalni titar postignu u dobi od 5-6 godina te nakon toga titar opada obrnuto proporcionalno sa dobi

osobe. Kod određenih bolesti nailazimo na nizak titar kao značajan faktor, primjerice kod hipogamaglobulinemije (3).

ABO protutijela su klase IgM i IgG. U osoba krvnih grupa A i B protutijela su pretežno IgM klase, dok u osoba krvne grupe O antitijela su dijelom i IgG klase. U tablici 1. prikazan je ABO sustav krvnih grupa.

Tablica 1. ABO sustav krvnih grupa (3)

Krvna grupa	Antigeni na eritrocitima	Protutijela u serumu	Genotipovi
A	A antigen	anti-B	AA ili AO
B	B antigen	anti-A	BB ili BO
AB	A i B antigen	Nema protutijela	AB
O	Nema antigena	anti-A i anti-B	OO

1.3.2. Rh sustav krvnih grupa

Rh sustav krvnih grupa je jedan od najsloženijih sustava u čovjeka te ujedno i drugi najvažniji poslije ABO sustava. 1940.godine Landsteiner i Wiener su imunizirali zeca i zamorca eritrocitima Rhesus majmuna koji su razvili antitijelo koje je reagiralo sa 80% eritrocita. Antigen koji su otkrili naziva se RhD antigenom. RhD antigen je najvažniji antigen iz Rh sustava. Pored njega poznato je oko 50 drugih antigena od kojih su najvažniji C,c,E,e jer određuju Rh fenotip.

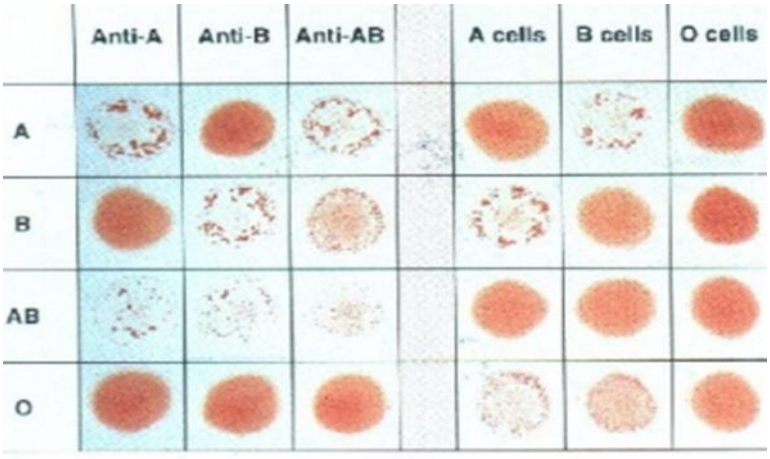
Ovaj sustav je specifičan po svojoj visokoj imunogeničnosti. Najpoznatiji je Rh(D) antigen koji se sastoji od 30 različitih epitopa, a ujedno je i najjači imunogen u ljudskom organizmu. Ovisno o izražaju D antigena, osoba može biti Rh pozitivna ili Rh negativna. (3)Njegova učestalost u europskoj populaciji je oko 85%, dok je 15% populacije RhD negativno. Rh D gen kodira D antigen koji je veliki protein eritrocitne membrane. Ovaj antigen se razvija na eritrocitima fetusa u šestom tjednu starosti. Zbog visoke imunogeničnosti RhD antigena, anti-D protutijelo će stvoriti 50-70% RhD negativnih osoba koje su mu izložene(3).

1.4. Određivanje krvnih grupa metodom aglutinacije

Da bi se odredila krvna grupa, koriste se fiziološki elementi u krvi- antigeni na eritrocitima i protutijela u plazmi. U određivanju krvne grupe miješaju se eritrociti pacijenta s poznatim protutijelima. Ta protutijela su monoklonalna i dobivaju se od B-stanične linije te se na taj način proizvode različiti reagensi sa anti-A, anti- B i anti-D protutijelima (5).

Ovaj laboratorijski proces je jednostavan i zasniva se na principu aglutinacije eritrocita- kapljica krvi se miješa sa reagensima prethodno navedenih protutijela. Da bi se izbjegla zabuna, svaki reagens označen je različitom bojom (5).

Nije teško interpretirati rezultate ovog testa. Najvažnije je uočiti aglutinaciju koja nastaje interakcijom reagensa sa antigenom na eritrocitima. Ukoliko dođe do aglutinacije, to znači da testirane crvene krvne stanice imaju taj antigen. Na slici 1. prikazan je postupak određivanja krvne grupe metodom na pločici(5).



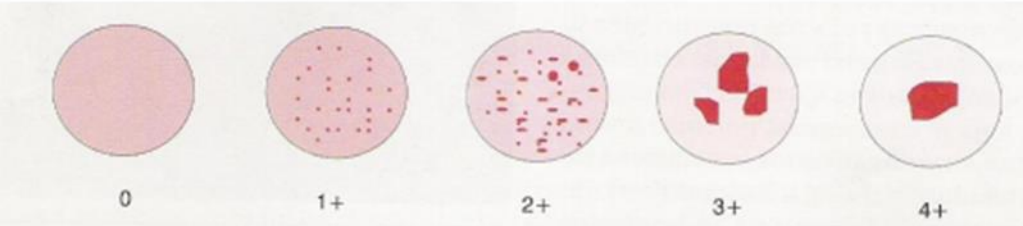
Slika 1. Princip određivanja krvne grupe na pločici. U prva tri stupca prikazan je hemotest a u druga tri stupca eritrotest.

(http://www.bh.mid.edu.au./mls/subjects/abo/resources/genetics1.html)

Budući da je svaki reagens usmjeren protiv točno određenih antigena na eritrocitima, to nam pomaže u određivanju pacijentove krvne grupe. Primjerice, anti-A serum reagira sa A antigenom na eritrocitima, anti-B reagira sa B antigenom. Ako je do aglutinacije došlo, riječ je o krvnoj grupi ovisno o tome koji je reagens doveo do aglutinacije. Ako reagiraju oba, radi se o krvnoj grupi AB, a ako uopće nema aglutinacije krvna grupa je O.Ovakav način određivanja krvnih grupa naziva se hemotest. Eritrotest je drugi dio testa, a određuje anti-A i anti-B protutijela prisutna u serumu.

1.5. Titar protutijela

Titracija je semikvantitativna metoda kojom se određuje koncentracija protutijela u serumu i aviditet protutijela. Semikvantitativna metoda znači da se tom metodom procjenjenjuje sadržaj neke tvari ili njezinu veličinu uspoređivanjem na bazi iskustva. Kod ove metode je značajno izražena subjektivna procjena. Princip metode zasniva se na titriranju seruma i potom dodavanje testnih eritrocita. Rezultat titra protutijela označava vrijednost najvećeg razrjeđenja u kojem je rezultat pozitivan. Jačina aglutinacije vrednuje se uz pomoć tablice u kojoj je jačina aglutinacije opisana veličinom i brojem aglutinata. Izražava se od 1^+ do 4^+. Pa tako kod procjene jačine aglutinacije 0 znači njezinu odsutnost, a 4+ jedan veliki aglutinat.U tablici 2. naveden je opis mogućih rezultata u procjeni jačine aglutinacije, a na slici 2. Izgled pojedinih ishoda aglutinacije (6).



Slika 2. Shematski prikaz izgleda jačina aglutinacije na pločici (6)

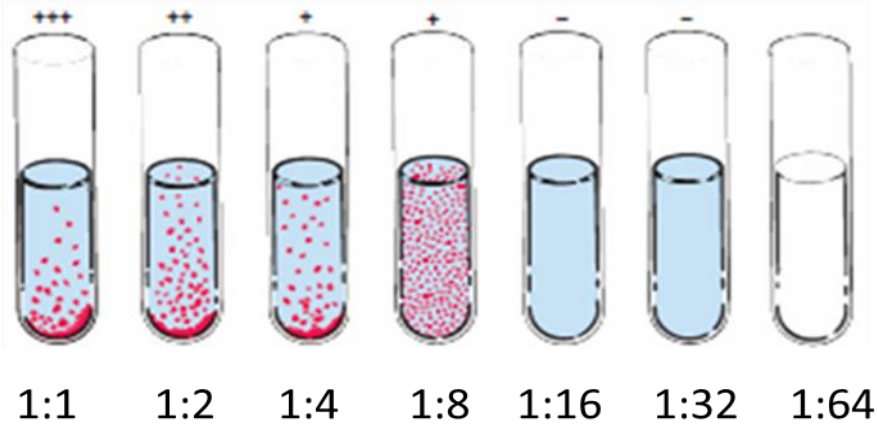
Tablica 2. Jačina aglutinacije eritrocita određena metodom u epruveti (7)

JAČINA	OPIS
+4	Jedan solidni aglutinat bez slobodnih stanica
+3	3 do 4 velika aglutinata bez slobodnih stanica
+2	Puno srednje velikih aglutinata s dosta slobodnih stanica
+1	10-15 stanica u nakupinama; nježno granulirana suspenzija
+W	2 do 3 stanice u nakupinama na zrnatoj podlozi, vizualno nema aglutinata
-	Sve stanice su slobodne
H	Hemoliza (djelomično ili potpuno) interpretira se kao pozitivan rezultat

Optimalne metode ispitivanja titra ABO-izohemaglutinina se još uvijek ispituju i ne postoji opće prihvaćena metoda za kvantifikaciju njihove reaktivnosti. U kliničkoj primjeni su različite metode, od klasične metode direktne i indirektne aglutinacije u epruveti, aglutinacije na mikropločama i mikrokolonama do hemolizinskog testa. Najčešće se koristi klasična metoda aglutinacije u epruvetama. Ona je jedna od najtežih laboratorijskih metoda za standardizaciju pa su samim time međulaboratorijske razlike značajne, a rezultati su teško usporedivi u odnosu sa rezultatima pomoću ostalih metoda.

1.5.1. Izrada serijskih razrjeđenja

Kako bi se pripremio niz dvostrukog razrjeđenja seruma u fiziološkoj otopini, serum se automatskom pipetom prenosi u prethodno pripremljene epruvete sa fiziološkom otopinom. Svaka epruveta u nizu predstavlja dvostruko razrjeđenje uz napomenu da prva epruveta u nizu sadrži samo serum. Jačini aglutinacije dodaje se numerička vrijednost, kao što je već spomenuto, a sljedeća slika shematski prikazuje primjer određivanja titra protutijela i jačine aglutinacije.



Slika 3. Shema određivanja titra protutijela i jačine aglutinacije (8)

1.6. Izohemaglutinini

Izohemaglutinini su izoantitijela koja nastaju imunim odgovorom pojedinca na nepoznati antigen koji mu nije svojstven. Te antigene još nazivamo i izoantigenima. Izohemaglutinini su antitijela na antigene iz sustava krvnih grupa ABO (9).

ABO-izohemaglutinini usko su vezani uz oligosaharidne ABH-antigene i zajedno čine nedjeljivu cjelinu. Njihovi biološki efekti su od izuzetne važnosti u transfuzijskoj i transplantacijskoj medicini. Čine imunološku barijeru antigenima pri nepodudarnim transfuzijama te time ugrožavaju sigurnost terapije. Ona je rezultat njihove stalne prisutnosti u krvi, njihovih snažnih izvršnih mehanizama te prisutnosti ABH-antigena na stanicama endodermnog, mezodermnog i ektodermnog podrijetla. ABO-izohemaglutinine karakterizira raznovrsnost specifičnosti, imunoglobulinskih razreda te neujednačenih koncentracija u serumu koje najčešće povezujemo sa demografskim i etnografskim obilježjima pojedinca te čimbenicima okoline. Stanja koja dovode do hiperimunizacije također utječu na njihovu veću pojavnost u krvi osobe. Među takva stanja ubrajamo trudnoću, transfuziju i vakcinaciju. U kliničkoj praksi važno je smanjiti negativne učinke ABO-izohemaglutinina na minimum. Razvijeniji zdravstveni sustavi obavljaju prospektivno pretraživanje njihove reaktivnosti u davatelja i primatelja krvnih organa i pripravaka (10).

A i B antigenske determinante također postoje i u drugim biološkim oblicima, posebno u bakterijskim staničnim zidovima. Budući da su bakterije široko

rasprostranjene u okolišu, stalna izloženost osobe njihovim antigenima(koji su slični A i B antigenima eritrocita) dovodi do proizvodnje izohemaglutininskih protutijela. Izohemaglutinini se u djece stvaraju tijekom prve godine života u slučaju imunokompetentnosti (10).

Izohemaglutinini uglavnom pripadaju IgM klasi protutijela ukoliko se radi o A i B krvnoj grupi. Klasa IgG protutijela je značajna za serum krvne grupe O. Ovaj podatak je važan zato što IgG prolazi kroz posteljicu te se može zaključiti kako novorođenčad majke krvne grupe O su pod većim rizikom razvoja ABO hemolitičke bolesti (10).

Obje klase imunoglobulina aglutiniraju eritrocite na sobnoj temperaturi(20-24°C) ili ispod nje, a komplement aktiviraju na temperaturi od 37°C. Komplement ovisna litička sposobnost ovih protutijela postaje značajna ako testirani serum uključuje inkubaciju na 37°C.

Serum krvne grupe O sadrži protutijela anti-A,B zato što se ne može metodom diferencijalne adsorpcije razdvojiti na pojedinačne anti-A i anti-B izohemaglutinine (8).Anti-A se nalazi u serumu krvne grupe B. Bolje reagira na temperaturama ispod 37°C i smatra se klinički neznačajnim osim ako reagira na 37°C. Anti-B se nalazi u serumu krvne grupe A sa istim svojstvima kao i anti-A protutijela (10).

ABO-izohemaglutinini kao sastavni dio ABO sustava krvnih grupa predstavljaju dio imunološke barijere koja utječe na učinkovitost transfuzijskih terapijskih postupaka. Svi ABO-izohemaglutinini, prema specifičnosti i imunoglobulinskom razredu imaju potencijal kliničke značajnosti (10).

1.6.1. Nastanak ABO-izohemaglutinina

Budući da ABO izohemaglutinini ne nastaju kao imunološki odgovor na izlaganje antigenima druge osobe, njihov nastanak ne prati u potpunosti vremenski slijed i mehanizam nastanka izoantitijela. Postoji nekoliko znanstvenih hipoteza o mogućnosti njihova nastanka.

Teoriju o spontanom nastanku ABO-izohemaglutinina zagovarao je Karl Landsteiner (9). Nadalje, postoji i genetska hipoteza o nastanku tih antitijela. Ovu hipotezu postavili su Furuhata i Hirszfeld, a prema njoj ova se antitijela nasljeđuju parom povezanih gena od kojih je jedan odgovoran za antigen, a drugi za

komplementarno protutijelo neovisno o izlaganju imunološkog sustava vanjskim antigenima (11).

Tridesetih godina prošlog stoljeća, Dupont je smatrao da široko rasprostranjeni antigeni iz okoline potiču imunološki sustav na stvaranje ABO- izohemaglutinina. Naime, zagovarao je teoriju da antigeni iz okoline posjeduju sličnu antigeničnost kao i stanice ABO sustava krvnih grupa (12).

Springer i suradnici su u drugoj polovici dvadesetog stoljeća doprinijeli potvrdi imunogenetske hipoteze. Prema ovoj hipotezi, ABO-izohemaglutinini nastaju nakon antigene stimulacije. Točnije, najčešće se radi o bakterijama koje su u organizam ušle gastro-interstinalnim traktom. Na njihovoj površini se nalaze terminalni šećeri(L-fukoza, N-acetil-D glukozamin, D-manoza), odnosno PAMP strukture(engl. *Patogen associated molecular patterns*).(12) Upravo su ove strukture ciljne točke mehanizama urođene imunosti. Primjerice, Escherichia coli 0_{86} ima visoku krvno grupnu aktivnost, prije svega krvne grupe B i nešto manje krvne grupe A (12,13).

U jednom francuskom istraživanju otkrivena je za 50% veća razina izohemaglutinina u djece sredinom 20.stoljeća nego pedeset godina ranije. To je vjerojatno posljedica profilaktičnog cijepljenja djece bakterijskim cjepivima i posljedičnom inokulacijom križno-reaktivnih antigenih struktura. To se, uglavnom, odnosi na cjepivo protiv tetanusa, parotitisa i difterije (15). Isto tako, Perez i suradnici smatraju da je razina izohemaglutinina veća kod djece nižeg socijalnog statusa zbog slabijih higijenskih uvjeta i stalne okruženosti velikim razinama raznih mikroorganizama (16). U prilog Dupontovoj teoriji ide i podatak da postoje značajne razlike u titru izohemaglutinina kod zdravih jednojajčanih blizanaca i trojki, 75% za anti-A i čak do 90% za anti-B izohemaglutinine (13). Isto tako, Grundbacher je 1976. godine otkrio razliku u titru izohemaglutinina između bijele i crne rase, a kasnije se pokazalo da čimbenik razlike nije rasa nego okolina (17).

.Smatra se da su ABO-izohemaglutini prisutni u cirkulaciji od trećeg ili četvrtog mjeseca pa do kraja života. Neka su znanstvena istraživanja pokazala postojanje ABO-izohemaglutinina kod novorođenčadi koji nisu majčinog podrijetla. Osim toga, ne mogu se objasniti teorijom da su dio stečene imunosti jer on tada nije razvijen kao što nisu razvijeni niti razgradivi krvno grupni enzimi koji se u stolici djece javljaju tek nakon nekoliko mjeseci života (9,12).

Iako je etiologija i dalje nejasna, pitanje nastanka ABO izohemaglutinina postaje još zanimljivije područje ukoliko se spominju i djelovanja različitih podtipova B limfocita odgovornih za proizvodnju antitijela ovisnih o T limfocitima u sklopu stečene imunosti. Točnije, nastanak ABO-izohemaglutinina povezuje se sa B1(CD5+) i B2(CD5-) limfocita koji su odgovorni za proizvodnju protutijela u sklopu stečene imunosti (10).

Wuttke i suradnici utvrdili su da B1 limfociti prevladavaju u novorođenčadi i da su odgovorni za proizvodnju IgM klase protutijela protiv bakterijskih antigena koja su križno reaktivna sa ABH eritrocitnim antigenima. Nadalje, smatra se da za njihov nastanak nije potrebna stimulacija antigenima jer su prisutna od rođenja. Osim B1 limfocita, B2 limfociti također sudjeluju u odgovoru na krvno-grupnu supstancu te uz njihovu pomoć dolazi do stvaranja IgG protutijela pa se na taj način objašnjava prisustvo oba razreda ABO-izohemaglutinina, prije svega kod krvne grupe O (18).

Postoji Landsteinerov zakon prema kojem se kod ljudi javljaju ABO-izohemaglutinini. Ovaj zakon vrijedi za sve krvne grupe. Osobe koje ne posjeduju nijedan antigen iz sustava ABO razvit će odgovarajuće ABO-izohemaglutinine. Osobe krvne grupe A razvijaju anti-B protutijela jer im je supstanca iz okoline koja sliči strukturi B antigena nepoznata. Isto vrijedi i za osobe krvne grupe B i O, čiji imunološki sustav razvija obje vrste izohemaglutinina jer su im oba antigena strana. U cirkulaciji osoba krvne grupe O se mogu dokazati anti-A,B protutijela koja prepoznaju zajedničke dijelove A i B antigena. Konačno, osobe krvne grupe AB ne razvijaju izohemaglutinine (9).

1.6.2. Građa ABO-izohemaglutinina

Pojavljuju se kao imunoglobulinski razredi IgG, IgA i IgM. Pomoću kromatografije i ultracentrifugiranja ustanovljena su dva tipa molekula, monomerne molekule sa koeficijentom sedimentacije S7 svojstven razredu IgG te pentamerne molekule s koeficijentom sedimentacije S19 koje karakterizira antitijela IgM (12).

U serumu te u majčinom mlijeku i sekretima može se naći i IgA razred izohemaglutinina čija uloga i kliničko značenje nije utvrđeno. Često se javljaju nakon aloimunizacije kao pratitelji IgG razreda izohemaglutinina (10).

ABO-izohemaglutinini su heterogeni razred protutijela te je takva njihova pojavnost uočena kod različitog ABO statusa. IgM razred se dominantno pojavljuje kod A i B krvnih grupa. S druge strane, IgG razred je rijetko izražen u visokom titru kod ovih krvnih grupa. Naime, krvna grupa O u značajnoj mjeri ima IgG razred izohemaglutinina. Ovo se može objasniti činjenicom kako je veća različitost između krvne grupe O i krvnih grupa A ili B nego što je između krvnih grupa A i B. To dovodi do zamjene imunoglobulinskih razreda i proizvodnje IgG razreda protutijela. Postoje i podrazredi ABO-izohemaglutinina, a Brouwers navodi IgG2 kao najčešći (19).

1.6.3. Djelovanje ABO-izohemaglutinina

ABO-izohemaglutinini su važni jer predstavljaju snažnu imunološku barijeru uslijed ABO nepodudarnih transfuzija i transplantacije organa. Ova imunološka barijera nastaje kao rezultat nekoliko čimbenika. Njihova stalna prisutnost u krvi te trajni kontakt sa antigenima iz okoline ili njihova prisutnost kao dio urođene imunosti omogućuju njihovo brzo djelovanje. U kontaktu sa antigenom nije potrebna faza karakteristična za primarni imunološki odgovor u kojoj se imunološki sustav upoznaje prilikom prvog susreta sa nepoznatim antigenom. Izvršni mehanizam ABO-izohemaglutinina je rezultat djelovanja konstantne regije teškog lanca, te zahtijevaju međudjelovanje različitih staničnih i humoralnih dijelova imunološkog sustava, u prvom redu fagocitne stanice i sustav komplementa (14).

Djelovanje IgM razreda je imunološka reakcija tipa 2-aktivacija komplementa. Prilikom vezanja antitijela na antigene(polisaharidi na površini stanica) dolazi do grupiranja Fc-regija antitijela, promjene u njihovoj konfiguraciji koja dovodi do oslobađanja C_H2 i C_H3. Domena na antitijelima IgG i IgM, koja je osnovni uvjet za aktivaciju C1q komponente komplementa. Budući da je IgM razred protutijela građen kao pentamerna molekula, to olakšava vezivanje i aktivaciju C1q komponente komplementa, dok podrazredi IgG1 i IgG3 bolje aktiviraju komplement od ostalih IgG podrazreda (14).

1.6.4. Važnost izohemaglutinina u kliničko-laboratorijskoj praksi

1.6.4.1. ABO izohemaglutinini u transplantacijskoj medicini

Postoji mnogo razloga zbog kojih je ABO sustav važan prilikom transplantacije solidnih organa. Budući da su ABO-izohemaglutinini trajno prisutni u krvi, njihov imunološki mehanizam djelovanja je izuzetno snažan te prisutnost ABO antigena na brojnim stanicama, tkivima i organima mogu bit razlogom hiperakutnog odbacivanja presatka kod nepodudarnih ABO transplantacija. Za ovu imunološku barijeru važna su dva čimbenika: 1) prisutnost antigena na doniranim organima i 2) prisutnost i količina ABO-izohemaglutinina u plazmi primatelja presatka. Jačina reakcije odbacivanja presatka ovisi o krvnoj grupi ABO i podgrupama te o različitoj zastupljenosti tih antigena na pojedinim tkivima i organima. Varijacije ekspresije tih antigena ovise o tipu prekursorskih lanaca. Iako H-antigen može biti vezan na sve prekursorske lance, stanice različitih tkiva različito eksprimiraju prekursorske lance pa je iz tog razloga različita i njihova zastupljenost na različitim tkivima i stanicama. Isto tako, različiti tipovi prekursorskih lanaca imaju različit afinitet prema terminalnim monosaharidima te je tako i ekspresija pojedinih antigena različita. Embrionsko podrijetlo i stanična diferencijacija je u izravnoj vezi sa zastupljenošću pojedinih tipova prekursorskih lanaca. Tkiva koja imaju mezodermalno podrijetlo ne sintetiziraju tip 1 prekursorskog lanca osim eritrocita, dok se tip 2 prekursorskog lanca nalazi i na stanicama ektodermalnog i mezodermalnog podrijetla. Tip 3 i 4 lanaca se sintetizira na stanicama unutarnjih organa, sa iznimkom srca i vaskularnog endotela. Na eritrocitima osoba krvne grupe A i AB su nađeni lanci tipa 3 i 4 (10). Transplantacija solidnih organa započela je 1954. godine sa prvom uspješnom transplantacijom bubrega. Taj uspjeh doveo je do razvoja brojnih znanstvenih i tehničkih dostignuća te se omogućila i transplantacija drugih solidnih organa kao što su jetra, srce, pluća, gušterača i tanko crijevo (10,14).

1.6.4.2. ABO-izohemaglutinini u transfuzijskoj medicini

Transfuzijsko liječenje bilo je rijetko uspješno sve do početka 20. stoljeća. Znanstvena otkrića su se uspješno odrazila i na transfuzijsku medicinu.

Nakon što je Landsteiner otkrio ABO sustav krvnih grupa i nakon Ottenbergovog uvođenja križne probe 1907.godine započinje praktična primjena znanja o podudarnosti krvi primatelja i davatelja koja je neophodna za uspješnu transfuziju krvi i krvnih pripravaka.

Cijeli proces od darivanja krvi pa do njene kliničke primjene obavlja se modernim i sofisticiranim postupcima koji zahtijevaju konstantno usavršavanje, a time se omogućuje sigurno transfuzijsko liječenje (10).

Najvažniju ulogu u tome ima ABO sustav krvnih grupa. Iako su A i B antigeni biokemijski jednostavno građeni, ABO sustav krvnih grupa i dalje je jedan od najzanimljivijih antigenih sustava, te u kliničkom smislu prednjači u važnosti za uspjeh transfuzijskog liječenja (10).

Budući da su ABO-izohemaglutinini imunološka barijera i sastavni dio tog sustava, oni utječu na učinkovitost transfuzijskog liječenja te prema svojoj specifičnosti i imunoglobulinskom razredu imaju golemu kliničku značajnost.

Transfuzija krvnih pripravaka je postupak usporediv sa transplantacijom tkiva te je vidljivo da i stanice s antigenima i izohemaglutinini u plazmi primatelja i krvnog pripravka imaju potencijal za razvoj imunološke reakcije te je njihovo ispravno identificiranje bitno u sprječavanju štetnih reakcija. Te štetne reakcije se javljaju kao rezultat narušavanja imunološke barijere (10).

Membrana svakog eritrocita sadrži milijune antigena koje imunološki sustav tretira kao vlastite. U slučaju primanja nepodudarne transfuzije koncentrata eritrocita imunološki sustav reagira na nepoznate eritrocitne antigene. Budući da tip i intenzitet imunološke reakcije ovisi o vrsti, broju i dostupnosti antigena posljedice reakcije variraju od rane sa izraženom intravaskularnom hemolizom do odgođene s ekstravaskularnom hemolizom. U ovakvom ishodu se uočava djelovanje ABO izohemaglutinina prisutnih u cirkulacija primatelja krvnog pripravka koji dovode do razgradnje primljenih eritrocita. U najgorem slučaju, velika nepodudarnost može imati fatalan ishod. Do ovakve nepodudarnosti najčešće dolazi zbog ljudske pogreške, a

smrtnost može doseći 10%. Međutim, ishod ovisi o količini transfundirane krvi, ali i o količini ABO-izohemaglutinina u cirkulaciji primatelja. Stalna prisutnost ABO izohemaglutinina u slučaju nepodudarnog pripravka dovodi do akutne imunološke reakcije, aktivacije komplementa i intervaskularne hemolize. Osim toga, komplementom posredovana hemoliza pokreće i sistemski upalni odgovor koji može dovesti do zatajenja tkiva i organa i konačnog fatalnog ishoda. Kako bi se izbjegli ovakvi slučajevi, primatelji krvi transfundiraju se s identičnim krvnim pripravcima, a u slučaju nedostatka opravdano je koristiti neidentične, ali serološki podudarne pripravke. Točnije, to su pripravci koji nemaju A i/ili B antigen nepodudaran sa ABO izohemaglutininima bolesnika. Podudarnost se provjerava prijetransfuzijski interakcijom antigena i antitijela te uočavanjem eventualne aglutinacije eritrocita. Određena stanja poput trudnoće ili prethodne transfuzije mogu dovesti do imunizacije pa je takva stanja potrebno identificirati i izbjeći transfuziju s eritrocitima nepodudarnih antigena (10).

1.6.4.3. Imunodeficijencije

Imunodeficijencije predstavljaju skupinu različitih stanja kod kojih imunološki sustav ne djeluje na odgovarajući način. Na osnovi kliničke prezentacije, anamneze, kliničkog nalaza i drugih simptoma može se posumnjati na dio imunološkog sustava koji je zahvaćen poremećajem. Anamnestički podaci koji ukazuju na mogući poremećaj imunosti su: rekurentne bakterijske infekcije, dvije ili više teških infekcija, apscesi unutarnjih organa ili potkožnog tkiva, kronični proljev, kasno nicanje mliječnih zubi, atipična autoimuna bolest i limfoproliferacija (21).

1.7. Laboratorijska dijagnostika imunodeficijencija

Dijagnostički postupci kod sumnje na imunodeficijenciju:

1) kompletna krvna slika- određivanje apsolutnog broja leukocita,limfocita i neutrofila
2) kvantitativno određivanje razine imunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgE u serumu

3) određivanje titra izohemaglutinina
4) komplement: CH50, C3 i C4
5) genomska analiza

1.7.1. Krvna slika

Ovo je osnovna pretraga kojom se procjenjuje in vitro stanična imunost. Ona mora sadržavati relativni i apsolutni broj limfocita, neutrofila i trombocita, ali i morfološke značajke stanica periferne krvi(broj i veličina granula u neutrofilima, veličina i oblik trombocita). Dob ispitanika je vrlo važna u procjeni imunodeficijencije jer apsolutni broj leukocita, neutrocita i limfocita ovisi o tom parametru. Primjerice, limfopenija je određena brojem limfocita manjim od 2500/μL krvi u neonatusa, manje od 4000/μL u dojenčadi (5 do 12 mjeseci) i manje od 1000/μL krvi u odrasloj populaciji (22).

1.7.2. Mjerenje razine imunoglobulinskih razreda

Mjerenje koncentracije serumskih imunoglobulina može se izvoditi u tekućoj fazi (laserska nefelometrija) ili imunoturbidimetrijom. Međutim, postoje i druge metode kao što su radioimunotest i enzimski imunotest koje se koriste kada se mjeri IgE. Koncentracija imunoglobulina u serumu ovisna je o više čimbenika kao što su dob, stupanj sinteze, tkivne razdiobe, potrošnje i gubitka imunoglobulina. Iz tog razloga se moraju uzeti u obzir normalne vrijednosti za lokalno stanovništvo pri tumačenju nalaza, ali i različiti metabolički činitelji koji mogu biti povezani s gubitkom proteina. Istovremeno mjerenje razine drugih proteina u serumu pomoću elektroforeze može biti važno za procjenu ukupnog gubitka proteina i imunoglobulina iz seruma (22).

1.7.3. Mjerenje titra izohemaglutinina

Kao što je spomenuto u prethodnim poglavljima, mjerenje titra izohemaglutinina služi za procjenu proizvodnje „prirodnih“ protutijela razreda IgM. Oni se sintetiziraju u prvim godinama života pa do treće godine većine zdrave djece krvnih grupa A,B i O koje imaju titar najmanje 1:16. čak i u one djece koja mogu imati uredan nalaz serumskih imunoglobulina, manjak izohemaglutinina pokazatelj je oštećenja humoralne imunosti (22).

2. Cilj istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja suispitati karakterestike izohemagutinina anti-A i anti-B protutijelakod djece u dobi od 6. mjeseci do tri godine.

U tu svrhu će se analizirati:

a) Vrijednost titra anti-A i anti-B izohemaglutinina ovisno odobi pacijenta,
b) Vrijednost titra izohemaglutinina pet minuta nakon ukapavanja te nakon inkubacije na temperaturama od 22^{o}C, 4^{o}C, 37^{o}C,
c) Odreditiprosječna vrijednost titra izohemaglutinina nakon ukapavanja te nakon inkubacije na temperaturama od 22^{o}C, 4^{o}C, 37^{o}C,
d) Usporediti titar anti-A i anti-B izohemaglutinina nakon ukapavanja te nakon inkubacije na temperaturama od 22^{o}C, 4^{o}C, 37^{o}C.

3. Metode i ispitanici

Dostavljeno je 20 uzoraka pacijenata starosti od šest mjeseci do pola godine iz Zavoda za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku. Uzorci su uzeti u epruvete s EDTA antikoagulansom, a u Zavod za transfuzijsku medicinu Firule su dostavljeni isti dan kada su vađeni.

Za određivanje titra izohemaglutinina, potrebno je znati ABO krvnu grupu pacijenta da bi se moglo nastaviti sa procedurom. Krvna grupa je određena metodom guste kapi na pločici. Od tih dvadeset uzoraka, dva uzorka krvne grupe AB nisu uzeta u daljnje ispitivanje zbog nemogućnosti izvođenja titra izohemaglutinina obzirom da nemaju ni anti-A ni anti-B protutijela.

Za preostalih 18 uzoraka rađen je titar izohemaglutinina.

3.1. Potrebni reagensi za titarizohemaglutinina

U ovom postupku korišteni su reagensi:

- 3-5% suspenzija eritrocita krvne grupe A1, B i O
- fiziološka otopina(0.9% NaCl).

3.2.Potrebni materijal i oprema za titar izohemaglutinina

Od opreme su korišteni:

Termostat s umjerenom temperaturom na 37 ^{o}C,
hladnjak sa temperaturom od +2 do +6 ^{o}C,
umjerena centrifuga za epruvete,
stalak za epruvete,
Mikropipeta, pipete i epruvete.

3.3. Postupak određivanja titra izohemaglutinina

Uzorci su centrifugirani da bi se mogla izdvojiti plazma od eritrocita pacijenta.

Postupak započinje serijskim razrjeđenjem plazme u osam epruveta obilježenih brojem od 1 do 8 i prezimenom ispitanika. Od druge do osme epruvete ukapa se po 100 µL fiziološke otopine, zatim se u prvu i drugu epruvetu dodaje po 100 µL seruma pacijenta. Mikropipetom se promiješa sadržaj druge epruvete te se iz nje prenosi 100 µL u sljedeću epruvetu. Na istovjetan način se priprema dilucija do kraja niza epruveta.

U dilutirani serum dodaje se suspenzija eritrocita pri čemu su A i B eritrociti potrebni za ispitivanje anti-A i anti-B protutijela, dok O eritrociti služe kao kontrola. Osobama krvne grupe A gdje su pripremljena dva niza dodaje se u jedan niz B eritrocite, a u drugi O eritrocite. Osobama krvne grupe B gdje su pripremljena dva niza dodaje se u jedan niz A1 eritrocite, a u drugi O eritrocite. Osobama krvne grupe O kojima su pripremljena tri niza dodaje se u jedan niz A1 eritrocite, u drugi B eritrocite, a u treći O eritrocite.

Nakon što se epruvete lagano promiješaju, ostaju 5-10 minuta na sobnoj temperaturi. Slijedi prva faza ispitivanja titra izohemaglutinina- **immediate spin**, odnosno centrifugiranje na 1000 okretaja jednu minutu. Nakon centrifugiranja slijedi očitanje stupnja aglutinacije kod svakog pacijenta.

Epruvete su zatim ostavljene da se inkubiraju u termostatu na temperaturi od 37°C 90 minuta. Potom slijedi novo očitavanje aglutinacije bez centrifugiranja - **Titar izohemaglutinina na 37 °C.**

Zatim se epruvete ostavljaju na +22°C da se inkubiraju minimalno 1,5h iza kojeg se iznova očitava titar izohemaglutinina - **Titar izohemaglutinina na +22°C.**

Zadnja faza ovog postupka je inkubacija u hladnjaku na +4°C najmanje dva sata nakon koje se ponovo očitava stupanj aglutinacije pojedinog ispitanika.- **Titar izohemaglutinina na +4°C.**

4. Rezultati

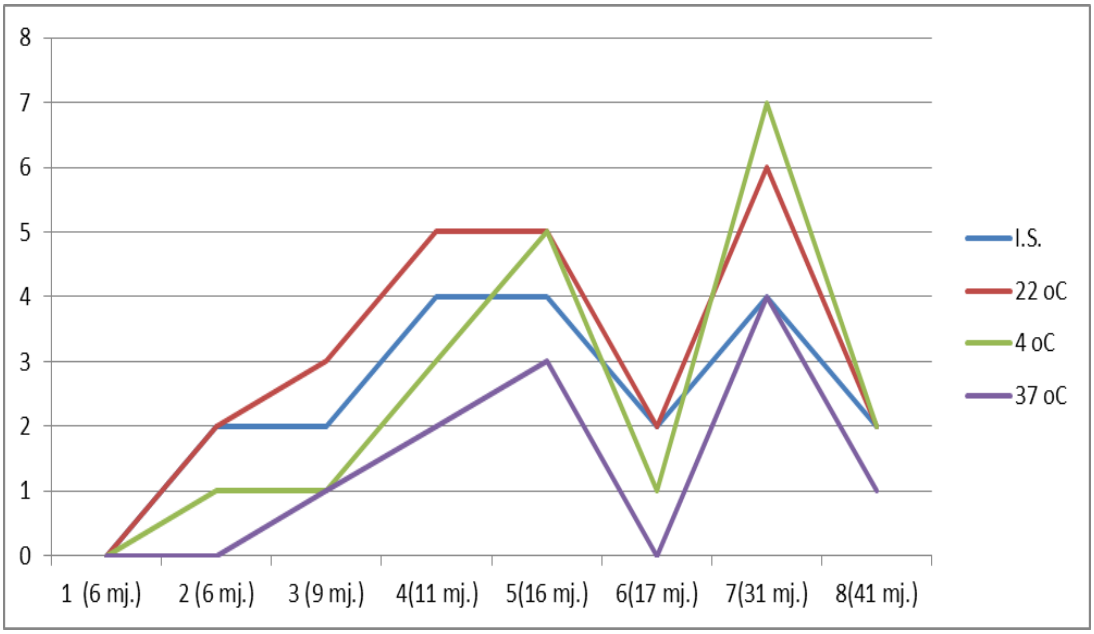
Ukupno je testirano 18 pacijenata u dobi od 6 mj. do 3 god., među njima je bilo 12dječaka i 6 djevojčica. Ispitivani pacijenti su podijeljeni u dobne razrede u intervalima od 6 mjeseci te je bilo 5 grupa ispitanika, a najviše ih je bilo u grupi od 6-12 mjeseci, te u grupi od 31-36 mjeseci. Prikaz svih dobnih skupina i broj ispitanika u svakoj od njih prikazan je u Tablici 3.

Tablica 3. Prikaz dobi testiranih pacijenata u intervalima od 6 mjeseci

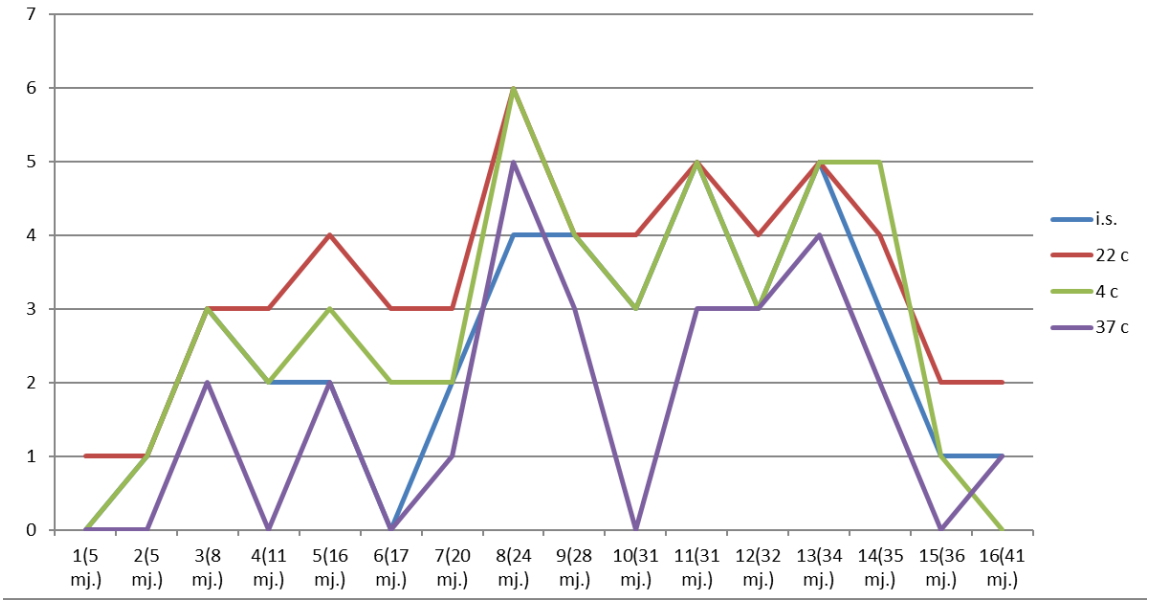
	Dob testiranih pacijenata u mjesecima	**Broj testiranih pacijenata**
1.	6-12	5
2.	13-18	3
3.	19-24	2
4.	25-30	3
5.	31-36	5
Ukupno	30 mjeseci	18

Na slici 4 i 5 prikazani su rezultati određivanja titra protutijela. Od 18 pacijenata bilo je 6 pacijenata krvne grupe O, 10 krvne grupe A, te 2 krvne grupe B. Samim time je ukupno određeno titar anti-A za 8 ispitanika i titar anti-B za 16 ispitanika.Na osi apscise nalaze se ispitanici sa svojim rednim brojem poredani prema svojoj dobi u mjesecima. Na osi ordinata nalaze se redni brojevi epruveta posloženi prema gradijentu titra protutijela. Pri tomu 0 znači da nema titra protutijela, a 8 titar protutijela 128.

Testni eritrociti krvne grupe A su korišteni kod 8 ispitanika krvnih grupa O i B.Pacijent starosti 6 mjeseci nije imao titar protutijela na niti jednoj ispitivanoj temperaturi, a najveći titar imao je ispitanik starosti 31 mjesec, i to titar protutijela 64. Iz grafikona je vidljivo kako je na 37◦C titar najniži kod svih dobnih skupina u odnosu na ostale temperature ispitivanja.



Slika 4. Grafički prikaz titra izohemaglutinina anti-A kod osam testiranih pacijenata. Oznake na ordinati predstavljaju redni broj epruvete u nizu razrjeđenja pri mjerenju titra izohemaglutinina, 0=1:1(nerazrijeđena plazma ispitanika), 1=1:2, 2=1:4, 3=1:8 ,4=1:16, 5=1:32, 6=1:64, 7=1:128, 8=1:256. Na osi apscisa su prikazani testirani pacijenti poredani po dobi.

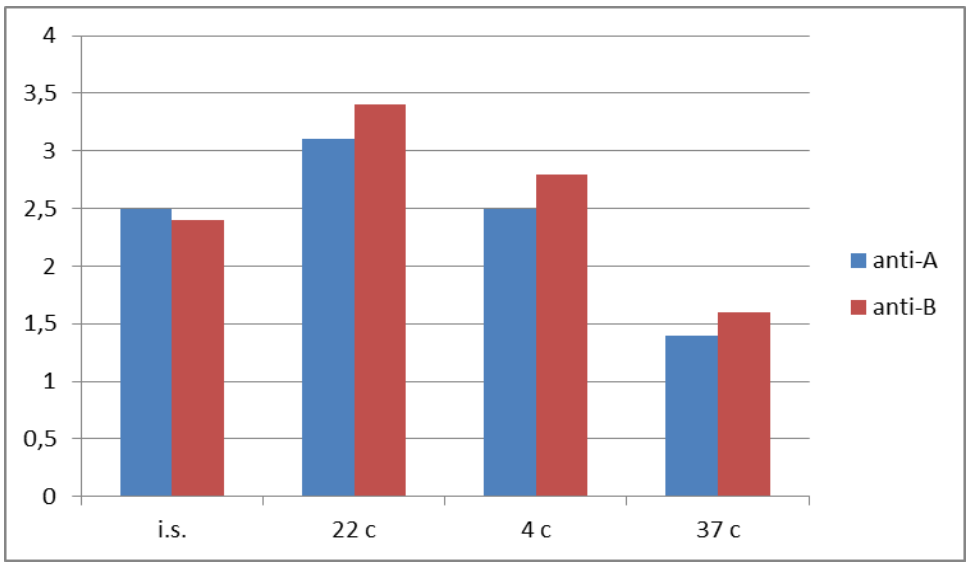


Slika 5. Graficki prikaz titra izohemaglutinina anti-B kod šesnaest testiranih pacijenata.

Oznake na ordinati predstavljaju redni broj epruvete u nizu razrjeđenja pri mjerenju titra izohemaglutinina, 0=1:1(nerazrijeđena plazma ispitanika), 1=1:2, 2=1:4, 3=1:8 ,4=1:16, 5=1:32, 6=1:64, 7=1:128, 8=1:256.

Na grafikonu je prikazan titar izohemaglutinina anti-B nanesen na osi ordinata, dok su redni brojevi pacijenata naneseni na osi apcisa pridruženo sa mjesecima starosti. Brojevi uz krivulje predstavljaju broj epruvete u nizu razrjeđenja, isto kao u prethodnoj tablici. U boji su prikazane linearne oscilacije testnih temperatura immediate spin (i.s.), 22°C, 37°C, 4°C.

Na sljedećoj slici grafički su prikazane i uspoređivanje srednje vrijednosti titra protutijela za anti-A i anti-B testne eritrocite za svaku ispitivanu temperaturu. Iz grafikona je vidljivo da je srednja vrijednost titra osoba krvne grupe A veća od osoba krvne grupe B, osim kod *immediate spina*. Također je razvidno da je srednja vrijednost titra i anti-A i anti-B protutijela najveća na 22^{o}C i iznosi 3,1 za anti-A, a za anti-B 3,4, a najmanja na 37^{o}C gdje iznosi za anti-A 1,4 te za anti-B 1,6.



Slika 6. Usporedba srednje vrijednosti titra izohemaglutinina anti-A i anti-B 5 min nakon ukapavanja te nakon inkubacije na temperaturama od 22°C, 4°C i 37°C.

5. Rasprava

Određivanje i klinička interpretacija kvantitavnog mjerenja protutijela u serumu ovisna je o dobi djeteta. Naime, pri kraju drugog trimestra trudnoće dolazi do aktivnog prijenosa IgG protutijela kroz posteljicu, te je razina protutijela u djeteta nakon rođenja obično 20-25% viša nego u majčinom serumu. Nadalje, katabolizam tih protutijela povezan je sa razvojem endogenih mehanizama proizvodnje protutijela u djeteta, te se taj proces događa 4-6 mjeseci nakon rođenja (23). Ova znanstvena spoznaja se iskoristila u ovom istraživanju, te su djeca mlađa od 6 mjeseci isključena iz istraživanja upravo iz tog razloga, jer titar protutijela tijekom tog razdoblja nije odraz samo djetetovih imunoloških mehanizama.

Reaktivnost protutijela najizraženija je na na sobnoj temperaturi (20-24°C) ili ispod nje, dok na temperaturi od 37°C efikasno aktiviraju komplement. U ovomistraživanju se pokazalo kako je titar protutijela na sobnoj temperaturi veći od titra na 37°C. Za razliku od toga, na 4°C nema značajne razlike u odnosu na titar mjeren na sobnoj temperaturi.

Dosadašnja istraživanja su pokazala kako titar protutijela novorođenčadi i djece dojenačke dobi nije značajan. Potom raste i u dobi od 5-10 godina doseže maksimalnu razinu koja stagnira do poodmakle dobi kada razina titra opada (23). No, u ovom istraživanju se pokazalo kako titar protutijela doseže maksimum i u dobi od 24 mjeseca.

U ovom istraživanju se titar protutijela se određivao manualnom metodom serijskog razrjeđenja. Takvi laboratorijski postupci podložni su ljudskoj grešci te mogu biti izvor analitičkih pogrešaka. U daljnjim istraživanjima ove tematike bi se trebalo razmotriti korištenje automatiziranih sustava kako bi se eventualne greške svele na najmanju moguću razinu. Iz ovoga proizlazi i važnost sljedivosti rezultata i jednaki laboratorijski uvjeti za svaki pojedini uzorak. Kao i sama metodologija, interpretacija rezultata je također podložna greškama zbog subjektivnog tumačenja rezultata laboratorijskog osoblja zbog čega rezultati mogu varirati. Samom automatizacijom postupka došlo bi standardizacije rezultata.

Iako je istraživanje pokazalo kako postoje razlike u titru protutijela između djece različite dobi i kako se on sa odrastanjem povećava, ograničavajući faktori ovog istraživanja su mali broj ispitanika, izostanak uvida u anamnezu djeteta i majke, pa tako i eventualnih medicinskih postupaka nakon rođenja (transfuzija krvi).

Nijedan ispitanik nema imunodeficijenciju čemu ovaj laboratorijski postupak služi. Iz ovog proizlazi i još jedan ograničavajući faktor- neuključivanja imunodeficijentnih osoba u istraživanje. Na taj način bi se ova metoda mogla adekvatno povezati sa određivanjem titra protutijela u tu svrhu.

6. Zaključak

S obzirom na specifične ciljeve ovog istraživanja, u čiju su svrhu analizirane karakteristike izohemaglutinina anti-A i anti-B protutijela kod djece u dobi od 6 mjeseci do 3 godine, zaključci ovog istraživanja su:

a) Vrijednost titra anti-A i anti-B izohemaglutinina povećava se do 24 mjeseca starosti i nakon toga doseže maksimalnu vrijednost i stagnira
b) Titar protutijela na sobnoj tempoeraturi je veći od titra na 37°C, a na 4°C nema značajne razlike u odnosu na titar mjeren na sobnoj temperaturi
c) Prosječna vrijednost titra izohemaglutinina anti-A i anti-B je najveća na sobnoj temperaturi, a najmanja na 37^{o}C. Međutim izohemaglutinini su pozitivni u značajnom titru na 37^{o}C i zbog toga imaju veliki klinički značaj.

7. Literatura

1. Giangrande PL. The history of blood transfusion. British Journal of Haematology. 2000; 110: 758-767.

2. Ksenija Vujaklija-Stipanović. Povijest transfuzijske medicine, razvoj transfuzijske medicine u Rijeci. Uvodnik Editorial. Medicina 2005;42(41):143-150, UDK:615.38(497.5 Rijeka)(091).

3. Mitra R., Mishra N., Rath GP. Blood groups systems. Indian Journal of Anaesthesia. 2014;58(5):524-528. doi:10.4103/0019-5049.144645.

4. Dean L., Blood group antigens are surface markers on the red blood cell membrane, National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Chapter 2, Chapter 3

5. Kansas City University of medicine and biosciences. Blood typing. Department of Physiology. https://courses.kcumb.edu/physio/btypes/blood_typing.htm (1.6.2018.)

6. Bhangale A., Pathak A., Pawar S., Jeloka T. Comparison of antibody titers using conventional tube technique versus column agglutination technique in ABO blood group incompatible renal transplant. Asian Journal of Transfusion Science. 2017;11(2):131-134. doi:10.4103/0973-6247.214343.

7. Bošković A. Pravilno izvođenje titra protutijela kod imuniziranih trudnica. Sveučilište u Splitu. 2014. Završni rad.

8. Microbe online. Antigen-antibody reactions. Immunology. https://microbeonline.com/immunology-note/

9. Branch DR. Anti-A and anti-B: what are they and where do they come from. Transfusion.2015;55: 74-9.

10. Hećimović A. Utvrđivanje razine izohemaglutinina u zdravoj populaciji RH. Sveučilište u Zagrebu. 2018. Doktorski rad.

11. Watkins WM. The ABO blood group system: historical background. Transfusion Medicine. 2001; 11: 243-265.

12. D'Adamo PJ.ABO Bias in natural immunity. J. Naturopath.Med. 1991; 2: 11-17. 1991.

13. Springer GF, Horton RE.Stimulation in man by feeding blood group-Active bacteria. The Journal of Clinical Investigation 1969; 48: 1280-1291.

14. Abba AK, Lichtman AH, Pillai Shiv. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier. Canada.2014.

15. Godsiz J. Synthesis of natural allohemagglutinins of the ABO system in healthy children aged 3 month to 3 years. Rev Fr Transfus Immunohematol. 1979; 22(4): 399-412.

16. Pérez N, Iannicelli JC, Girard-Bosch C, González S, Varea A, i sur. Effect of probiotic supplementation on immunoglobulins, isoagglutinins and antibody response in children of low socio-economic status. Eur J Nutr . 2014; 49:173-179.

17. Klein HG, Anstee DJ. Mollison's Blood Transfusion in Clinical medicine. Wiley Blackwell. 2014;12.

18. Wuttke NJ, Macardle PJ, Zola H. Blood group antibodies are made by CD5+ and by CD5- B cells. Immunol Cell Biol. 1997; 75(5): 478-83.

19. Stussi G, Huggel K, Lutz H., Schanz U, Rieben, Seebach JD. Isotype-specific detection of ABO blood group antibodies using a novel flow cytometric method. Br J Hematolo. 2005; 130(6): 954-63.

20. Dean L The ABO Blood Group - Blood groups and red cells antigens. Bethesda Maryland National center for Biotechnology Information (US). 2005.

21. Sertić J. Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Medicinska naklada. 2015; 2: 54.poglavlje. Primarne imunodeficijencije

22. Sertić J. Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Medicinska naklada. 2015. 2: 55.poglavlje, Laboratorijska dijagnostika imunodeficijencijskih sindroma.

23. Rich RR., Shearer, WT., Frew AJ., Fleischer AT., Schroeder HW., Weyand CM. Clinical Immunology. Elsevier Health Sciences. 2013.

8. Sažetak

Uvod: Krvne grupe su nepromjenjive nasljedne biološke karakteristike koje se dobiju rođenjem te se prenose generacijski po Mendelovim zakonima nasljeđivanja. Antigeni su glavne odrednice krvi, a po definiciji je to svaka tvar ili molekula koja stimulira imunološki odgovor. Antigeni po kemijskoj strukturi mogu biti glikoproteini, glikolipidi, ugljikohidrati ili proteini. Nalaze se na membrani eritrocita. Krvne grupe predstavlju strogu specifičnost svakog pojedinca, a serološki se izražavaju reakcijom antigen-antitijelo. Jedan od najvažnijih sustava krvnih grupa je ABO sustav, koji je određen Izohemaglutininima. To su izoantitijela koja nastaju imunim odgovorom pojedinca na nepoznati antigen koji mu nije svojstven. Te antigene još nazivamo i izoantigenima. ABO-izohemaglutinini su važni jer predstavljaju snažnu imunološku barijeru uslijed ABO nepodudarnih transfuzija i transplantacije organa. Određuju se mjerenjem titra izohemaglutinina koja je semikvantitativna metoda kojom se određuje koncentracija protutijela u serumu i aviditet protutijela.

Cilj: Dostavljeno je 20 uzoraka pacijenata starosti od šest mjeseci do pola godine iz Zavoda za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku. Uzorci su uzeti u epruvete s EDTA antikoagulansom, a u Zavod za transfuzijsku medicinu Firule su dostavljeni isti dan kada su vađeni. Za određivanje titra izohemaglutinina, potrebno je znati ABO krvnu grupu pacijenta da bi se moglo nastaviti sa procedurom. Krvna grupa je određena metodom guste kapi na pločici. Od tih dvadeset uzoraka, dva uzorka krvne grupe AB nisu uzeta u daljnje ispitivanje zbog nemogućnosti izvođenja titra izohemaglutinina obzirom da nemaju ni anti-A ni anti-B protutijela. Za preostalih 18 uzoraka rađen je titar izohemaglutinina

Materijali i metode: Ciljevi ovog istraživanja su ispitati karakterestike izohemagutinina anti-A i anti-B protutijela kod djece u dobi od 6. mjeseci do tri godine. U tu svrhu analizirala se vrijednost titra anti-A i anti-B izohemaglutinina ovisno o dobi pacijenta, titra izohemaglutinina pet minita nakon ukapavanje te nakon inkubacije na temperaturama od 22°C, 4°C, 37°C. Određivala se je i prosječna vrijednost titra izohemaglutinina nakon ukapavanje te nakon inkubacije na temperaturama od 22°C, 4°C, 37°C, te se uspoređivao titar anti-A i anti-B izohemaglutinina nakon ukapavanje te nakon inkubacije na temperaturama od 22°C, 4°C, 37°C.

Rezultati: Ukupno je testirano 18 pacijenata u dobi od 6 mjeseci do 3 godine, među njima je bilo 12 dječaka i 6 djevojčica. Ispitivani pacijenti su podijeljeni u dobne razrede u intervalima od 6 mjeseci te je bilo 5 grupa ispitanika, a najviše ih je bilo u grupi od 6-12 mjeseci, te u grupi od 31-36 mjeseci. Od 18 pacijenata bilo je 6 pacijenata krvne grupe O, 10 krvne grupe A, te 2 krvne grupe B. Samim time je ukupno određeno titar anti-A za 8 ispitanika i titar anti-B za 16 ispitanika. Pacijent starosti 6 mjeseci nije imao titar protutijela na niti jednoj ispitivanoj temperaturi, a najveći titar imao je ispitanik starosti 31 mjesec, i to titar protutijela 64. Srednja vrijednost titra osoba krvne grupe A je veća od osoba krvne grupe B, osim kod *immediate spina*. Srednja vrijednost titra i anti-A i anti-B protutijela je najveća na 22^{o}C , a najmanja na 37^{o}C.

Zaključak: Vrijednost titra anti-A i anti-B izohemaglutinina povećava se do 24 mjeseca starosti i nakon toga doseže maksimalnu vrijednost i stagnira. Titar protutijela na sobnoj temperaturi je veći od titra na 37°C, a na 4°C nema značajne razlike u odnosu na titar mjeren na sobnoj temperaturi. Prosječna vrijednost titra izohemaglutinina anti-A i anti-B se značajno razlikuje na svim temperaturama osim na immediate spinu.

Ključne riječi: krvne grupe, izohemaglutini, titar protutijela

9. Summary

Introduction: Blood groups are irreversible inherited biological characteristics that are transmitted generationally to Mendel's inheritance laws. Antigens are the main determinants of the blood, and by definition it is any substance or molecule that stimulates the immune response. Antigens by chemical structure can be glycoproteins, glycolipids, carbohydrates or proteins. They are found on the erythrocyte membrane. Blood groups represent the strict specificity of each individual and are serologically expressed by the antigen-antibody reaction. One of the most important blood group systems is the ABO system, which is determined by isohemaglutinins. These are isoantibodies that are generated by the immune response of an individual to an unknown antigen that is not unique to him. These antigens are also called isoenzymes. ABO isohemaglutines are important because they represent a strong immune barrier due to ABO incompatible blood transfusion or organ transplantation. They are determined by measuring the isohemagglutinin titre, which is a semi-quantitative method to determine the serum antibody concentration and the avidity of the antibody.

Objective: Twenty samples of patients aged 6 months to a half were submitted from the Firule Central Laboratory. Samples were taken in EDTA anticoagulant tubes, and in the Department of Transfusion Medicine Firule were delivered the same day they were taken. To determine the isohemagglutinin titers, it is necessary to know the ABO patient's blood group to proceed with the procedure. The blood group was determined by a dense drop in the plate. Of these twenty samples, two AB blood sample samples were not taken for further testing due to the impossibility of performing the isohemagglutinin titers since they do not have either anti-A or anti-B antibodies. For the remaining 18 samples, the isohemagglutinin titer was made.

Materials and Methods: The objectives of this study were to examine the characteristics of isohemagglutinin anti-A and anti-B antibodies in children aged 6 months to 3 years. For this purpose, anti-A and anti-B isohemagglutinin titers were evaluated depending on patient age, isohemoagglutinin titre five minutes after incubation and incubation at 22˚C, 4˚C, 37˚C. The mean isohemagglutinin titre rating was determined after the incubation and after incubation at 22˚C, 4˚C, 37˚C, and anti-A

and anti-B isohemagglutinin titers were compared after incubation and incubation at 22˚C, 4˚C, 37˚C.

Results: A total of 18 patients were tested in the age of 6 months to 3 years, including 12 boys and 6 girls. Examined patients were divided into age classes at 6 months intervals, and there were 5 groups of subjects, most of them in the 6-12 month group and 31-36 months. Of the 18 patients therewere 6 blood group O patients, 10 blood group A and 2 blood group B. The anti-A titer was determined for 8 subjects and anti-B titer for 16 subjects. The patient aged 6 months did not have an antibody titer at any of the tested temperatures, and the highest titer had a 31-month old, titer of antibody 64. The mean value of titer of a blood group A subject is higher than the blood group B titer, except for the immediate spin. The mean value of blood group A and blood group B titer is highest at 22°C and lowest at 37°C.

Conclusion: The titer of anti-A and anti-B isohemagglutinin increases up to 24 months of age and then reaches maximum value and stagnates. The titer of the antibody at room temperature is higher than the titer at 37°C, and at 4°C there is no significant difference in the titer measured at room temperature. The average titer of isohemagglutinin anti-A and anti-B is significantly different at all temperatures except for immediate spin.

Key words: blood groups, isohemagglutinins, antibody titers

10. Životopis

Osobni podaci

Ime i prezime	Ivan Bašić
Datum rođenja	14. prosinca 1995. godine u Splitu
Državljanstvo	Hrvatsko
Adresa	Marina Getaldića 25, 21 000 Split
Web adresa	ivan.basic.20@gmail.com

Školovanje

2002. - 2010.	Osnovna škola Split 3
2010. - 2014.	Srednja škola Opća gimnazija „Marko Marulić“ Split
2014. - 2018.	Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika; Odjel zdravstvenih studija Sveučilište u Splitu

Osobne vještine i kompetencije

Strani jezik	Engleski	Tečno
Strani jezik	Talijanski	Tečno
Strani jezik	Španjolski	Tečno

Korištenje računala	Napredno (rad u operacijskom sustavu Windows, korištenje Microsoft Office paketa)