

# Važnost pravilnog izvođenja i osjetljivosti testa "Du" varijante kod dobrovoljnih darivatelja krvi

---

Gavranić, Katica

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:176:598268>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-21**



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 REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Katica Gavranić**

**VAŽNOST PRAVILNOG IZVOĐENJA I OSJETLJIVOSTI  
TESTA „D“ VARIJANTE KOD DOBROVOLJNIH  
DARIVATELJA KRV**

**Završni rad**

Split, 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Katica Gavranić**

**VAŽNOST PRAVILNOG IZVOĐENJA I OSJETLJIVOSTI  
TESTA „D<sup>u</sup>“ VARIJANTE KOD DOBROVOLJNIH  
DARIVATELJA KRV**

**THE IMPORTANCE OF PROPER PERFORMANCE AND  
SENSITIVITY OF THE „D<sup>u</sup>“ VARIANT TEST IN BLOOD  
DONORS**

**Završni rad / Bachelor's thesis**

Mentor:

**Mirela Zec, univ. mag. med. dipl. ing.**

Split, 2016.

# SARDŽAJ

|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>                                                                               | <b>1</b>  |
| 1.1. Dobrovoljni darivatelji krvi.....                                                            | 1         |
| 1.1.1. Prava i pogodnosti koja imaju dobrovoljni darivatelji krvi.....                            | 1         |
| 1.1.2. Kriteriji za odabir darivatelja krvi i darivanje krvi.....                                 | 2         |
| 1.2. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu.....                                                | 3         |
| 1.3. Krvni pripravci.....                                                                         | 4         |
| 1.4. ABO i Rh krvne grupe.....                                                                    | 6         |
| 1.5. Varijante slabog D <sup>u</sup> .....                                                        | 7         |
| <b>2. CILJ RADA.....</b>                                                                          | <b>10</b> |
| <b>3. IZVORI PODATAKA I METODE.....</b>                                                           | <b>11</b> |
| 3.1. Proces darivanja krvi.....                                                                   | 11        |
| 3.2. Imunohematološko testiranje dobrovoljnih darivatelja krvi.....                               | 15        |
| 3.2.1. Opći zahtjevi.....                                                                         | 15        |
| 3.2.2. Uzorci.....                                                                                | 16        |
| 3.2.3. Reagensi.....                                                                              | 17        |
| 3.2.4. Oprema.....                                                                                | 18        |
| 3.2.5. Metode testiranja.....                                                                     | 19        |
| 3.2.6. Rezultati testiranja.....                                                                  | 19        |
| 3.2.7. Obavezni i dodatni imunohematološki testovi.....                                           | 20        |
| 3.3. Postupak imunohematološkog testiranja dobrovoljnih darivatelja krvi.....                     | 20        |
| 3.4. Priprema uzoraka krvi DDK za imunohematološko testiranje.....                                | 22        |
| 3.4.1. Pribor i materijali.....                                                                   | 22        |
| 3.4.2. Postupci pripreme uzoraka krvi .....                                                       | 23        |
| 3.5. Imunohematološko testiranje uzoraka krvi novih i višestrukih DDK .....                       | 24        |
| 3.6. Određivanje slabog Rh D antigena indirektnim antiglobulinskim testom.....                    | 27        |
| 3.6.1. Pribor i materijali .....                                                                  | 27        |
| 3.6.2. Opis aktivnosti pri izvođenju testa.....                                                   | 28        |
| 3.7. Završna kontrola imunohematološkog testiranja i pohranjivanje obrađenih uzoraka<br>DDK ..... | 30        |
| <b>4. RASPRAVA.....</b>                                                                           | <b>31</b> |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| 4.1. Prikaz slučaja ..... | 31        |
| <b>5. ZAKLJUČAK.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>6. LITERATURA.....</b> | <b>36</b> |
| <b>7. SAŽETAK.....</b>    | <b>37</b> |
| <b>8. SUMMARY.....</b>    | <b>39</b> |
| <b>9. ŽIVOTOPIS.....</b>  | <b>41</b> |

# **1. UVOD**

## **1.1. Dobrovoljni darivatelji krvi**

Međunarodna udruga transfuziologa (ISBN), Međunarodni Crveni križ (IFCR), Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i Europsko vijeće (Council of Europe) su odredili definiciju dobrovoljnog darivatelja krvi koja je prihvaćena u svim zemljama svijeta.

Dobrovoljni darivatelj krvi je osoba koja daruje krv, plazmu ili stanične dijelove krvi po svojoj slobodnoj volji i ne prima za to nikakvu nadoknadu, niti novčanu niti u obliku koji se može smatrati nadomjeskom novca. Skromni dar, kao uspomena i osvježenje nakon davanja krvi prihvatljivi su za dobrovoljno davalatstvo.

Dobrovoljni darivatelj krvi je aktivna veza između zdravog dijela društva i bolesnika. (2) Darivanje krvi se zasniva na načelima dobrovoljnosti, besplatnosti, solidarnosti i anonimnosti.

### **1.1.1. Prava i pogodnosti koja imaju dobrovoljni darivatelji krvi**

1. Dobrovoljni darivatelji krvi u Republici Hrvatskoj, s naslova Dobrovoljnog darivatelja krvi, imaju pravo na plaćeni dopust, tj. na 1 slobodan dan koji se sukladno radnim obavezama ostvaruje tijekom kalendarske godine.
2. Dobrovoljnim darivateljima krvi pripada pravo na 2 dana plaćenog dopusta za svako darivanje krvi do najviše 10 dana u kalendarskoj godini.
3. Muškarci koji su darovali krv više od 35 puta i žene koje su krv darovale više od 25 puta ostvaruju pravo na oslobođenje od plaćanja participacije za zdravstvene usluge u cijelosti na teret Državnog proračuna.
4. U gradu Zagrebu muškarci koji su darovali krv više od 30 puta i žene koje su darovale krv više od 20 puta imaju pravo na besplatnu godišnju pokaznu kartu za javni prijevoz ako to pravo nisu ostvarili po nekoj drugoj osnovi.

### **1.1.2. Kriteriji za odabir darivatelja krvi i darivanje krvi**

Darivatelj krvi može biti svaka osoba dobrog zdravstvenog stanja između 18 i 65 godina. Darivatelj krvi ako prvi put daruje krv mora imati do 60 godina, a neki mogu darivati krv i do 70 godina 1-2 puta godišnje ako nakon pregleda tako odluči liječnik specijalist transfuzijske medicine. Tjelesna težina mora biti iznad 55 kg i proporcionalna visini. Tjelesna temperatura mora biti niža od 37 °C. Sistolički krvni tlak mora biti od 100 do 180 mm Hg, dijastolički od 60 do 110 mm Hg, a puls između 50 i 100 otkucaja u minuti. Koncentracija hemoglobina kod muškaraca mora biti iznad 135g/L, a kod žena iznad 125 g/L.

Muškarci mogu dati krv 4 puta godišnje s razmakom od 3 mjeseca između darivanja, a žene mogu dati krvi 3 puta godišnje s razmakom od 4 mjeseca.

Krv je dragocjeni lijek koji nije moguće proizvesti na umjetan način i zato su jedini izvor krvi dobrovoljni darivatelji krvi koji svojom plemenitošću mogu spasiti ljudske živote.

Darivanje krvi je jednostavan postupak koji ne šteti zdravlju ako se pravilno provedu svi propisani postupci pri odabiru darivatelja krvi. Ne ugrožava zdravlja već je ujedno i kontrola zdravlja. Zdrav organizam darivatelja krvi vrlo brzo u potpunosti nadoknadi izgubljenu količinu i sastavne dijelove darovane krvi. Tako plazmu i njene sastojke, broj trombocita i leukocita nadoknađuje već unutar 24 sata, a eritrocite unutar 4 do 6 tjedana. Uobičajeno se uzima 450 mL krvi i organizam gubi manje od 10% ukupne količine krvi. To je standardna doza uzete krvi i na osnovu te količine se izračunava broj doza proizvedenih krvnih pripravaka. Darivanjem 450 mL krvi darivatelj gubi oko 200 mg željeza, a organizam taj gubitak nadoknađuje povećanom apsorpcijom iz hrane nakon 1 do 2 mjeseca. Krv se uzima samo ako je darivatelj zdrav i ima dovoljnu količinu željeza. Zato se obavezno provjerava zdravstveno stanje darivatelja i količina željeza u krvi. Na osnovu davateljevih podataka o njegovom zdravstvenom stanju i fizikalnom pregledu liječnik donosi odluku može li neka osoba dati krv. Oko 10 % davatelja se odbije tijekom pregleda. Mogu biti privremeno ili trajno odbijeni, a razlog odbijanja je opasnost od uzimanja krvi za darivateljevo zdravlje ili opasnost od krvnih

pripravaka za zdravlje bolesnika. Osobe koje bi darivanjem krvi ugrozili svoje ili bolesnikovo zdravlje ne smiju dati krv.

Tijekom darivanja ne postoji mogućnost zaraze za darivatelja jer je sav pribor koji se koristi pri uzimanju krvi sterilan i namijenjen za jednokratnu uporabu. Većina zdravih ljudi dobro podnosi gubitak 450 mL krvi, ali u oko 3-5 % davanja krvi mogu se pojaviti nuspojave koje su najčešće blage poput nelagode, vrtoglavice, ubrzanog ili dubokog disanja, mučnine, povraćanja i sl. Srednje i jake nuspojave, kao što su nesvjestica i grčevi vrlo su rijetki i opažaju se u 1 do 3 % svih nuspojava. Strah od darivanja krvi, premorenost i neispavanost su najčešći uzroci nuspojava zbog čega se organizam nije u stanju prilagoditi kratkotrajnom gubitku krvi.

Krv može dati oko 60% muškaraca i oko 50% žena, ali stvarni postotak ljudi koji daju krv je puno manji. U Hrvatskoj tako krv daje 3,8 % stanovništva, odnosno sakupi se 38 doza na 1 000 stanovnika.

Najčešći način davanja krvi je davanje jedne doze pune krvi gdje se u plastičnu vrećicu uzima 450 mL krvi u kojoj se nalaze svi sastojci kao što su eritrociti, plazma, trombociti i leukociti. Također se mogu uzimati i pojedini krvni sastojci pomoću aparata koji se naziva stanični separator.

Promidžbu davalatstva i organizaciju akcija darivanja krvi provode Hrvatski Crveni križ i Transfuzijska služba Hrvatske.

## **1.2. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu**

Hrvatski Zavod za transfuzijsku medicinu je neprofitna zdravstvena ustanova osnovana 1945. godine s ciljem obavljanja zdravstvene djelatnosti za potrebe transfuzijskog liječenja bolesnika. Osnovan je iza Drugog svjetskog rata kao vojna ustanova. U prvim godinama poslije II svjetskog rata krv se uzimala u staklene boce i bila je primjenjivana kroz gumene sisteme koji su se čuvali, prali i koristili više puta. U bolnicama su se u potpuno neadekvatnim uvjetima pripravljalje infuzijske otopine. Infuzije i transfuzije krvi su vrlo često bile praćene reakcijama primatelja i prijenosom zaraznih bolesti i zbog tih razloga je 1949. u Zavodu osnovana proizvodnja infuzijskih otopina, a 1960.



proizvodnja sistema za transfuziju i infuziju od plastike. Djelatnici Zavoda su tijekom prve godine rada (1946.) prikupili 557 doza krvi, a 55 godina kasnije (2000.) prikupljeno je 68 158 doza krvi darovane od dobrovoljnih darivatelja. 1949. godine proizvedeno je 25 000 otopina, a broj proizvedenih otopina je narastao na skoro 2 000 000.

Sve djelatnosti u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu odvijaju se u skladu s Zakonom o zdravstvenoj zaštiti (članak 102.-104.).

### **1.3. Krvni pripravci**

Krvni pripravci su lijekovi biološkog podrijetla namijenjeni sprječavanju ili liječenju različitih bolesti, a proizvode se jednostavnim fizikalnim postupcima od ljudske krvi u ustanovama za transfuzijsku medicinu. Izdvojeni su dijelovi darovane krvi. Upotrebljavaju se često i drugi nazivi kao krvni proizvodi, krvne komponente ili krvni sastojci. Priprava krvnog pripravka se osniva na činjenici da se pojedini sastojci krvi razlikuju po specifičnoj težini. Diferencijalno centrifugiranje je fizikalni postupak koji se najčešće koristi za razdvajanje sastojaka u dozi krvi na način da najteži sastojci padaju na dno vrećice, a ostali sastojci, ovisno o specifičnoj težini, u slojevima naliježu na njih. Odgovarajući sastojak krvi se izdvaja u zaseban pripravak odabirom brzine i vremena centrifugiranja. (1)

U krvne pripravke ubrajamo punu krv, koncentrat eritrocita, koncentrat eritrocita u aditivnim otopinama, koncentrat trombocita, koncentrat leukocita, svježe smrznutu plazmu, krioprecipitat, ali i pripravke koji su dobiveni njihovom modifikacijom poput koncentrata eritrocita i trombocita sa smanjenim brojem leukocita, oprane eritrocite, oprane trombocite i sl.

Krvni pripravci se dijele na labilne i stabilne. Labilni krvni pripravci su nazvani labilnima jer se u njima brzo smanjuje djelovanje, tj. aktivnost stanica ili proteina i tu spadaju eritrocitni, trombocitni, leukocitni i granulocitni pripravci, pripravci plazme i krioprecipitat. Eritrocitni, trombocitni i granulocitni pripravci su stanični pripravci, a pripravci plazme su svježe smrznuta plazma, plazma i krioprecipitat.

Stabilni krvni pripravci su derivati plazme, tzv. stabilni lijekovi koji se proizvode od mješavine plazme (engl. pool) dobivene miješanjem više stotina ili tisuća pojedinačno proizvedenih krvnih pripravaka plazme.

Iz jedne doze krvi najčešće se dobivaju 4 krvna pripravka:

- koncentrat eritrocita
- koncentrat trombocita
- koncentrat leukocita
- plazma

Također se iz jedne doze darovane krvi pripravlja više raznih krvnih pripravaka kojima se može liječiti više bolesnika. U Republici Hrvatskoj se godišnje skupi oko 160 000 doza krvi, a od njih se pripravi oko 350 000 doza krvnih pripravaka. (7)

Bolesnici tijekom transfuzijskog liječenja dobivaju samo sastojak krvi koji je potreban za liječenje. Količina pripravaka koju oni prime ovisi o vrsti bolesti i načinu liječenja. Tako treba više koncentrata eritrocita u liječenju kirurških bolesnika, više plazme trebaju bolesnici s opeklinama, a bolesnici s malignim bolestima koji se liječe kemoterapijom ili transplantacijom koštane srži trebaju više desetaka doza koncentrata trombocita. Staničnim separatorom se od jednog darivatelja dobiva količina trombocita koja je jednaka količini koja se dobije pripravljanjem koncentrata trombocita iz 6 do 8 doza krvi. Koncentrat trombocita koji je priređen na taj način može zadovoljiti dnevnu potrebu liječenja jednog bolesnika.

Bolesnici koji se liječe transfuzijama krvi prosječno prime 2 doze koncentrata eritrocita, 1,5 dozu plazme i 6 do 8 doza koncentrata trombocita.

Svaka doza krvi ili krvnog pripravka se nakon darivanja krvi testira na prisutnost uzročnika krvlju prenosivih bolest : hepatitis B, hepatitis C, AIDS i sifilis. (5) Krvni pripravci u Hrvatskoj su izuzetno sigurni. Rizik od transfuzijama uzrokovane zaraze HBV-om je 1:72 000, HCV-om 1:230 000 i HIV-om 1:2 000 000.

Potrebno je prije transfuzijskog liječenja eritrocitnim pripravcima odrediti i krvne grupe ABO i Rh (D) na eritrocitima davatelja i bolesnika te ispitati prisustvo iregularnih

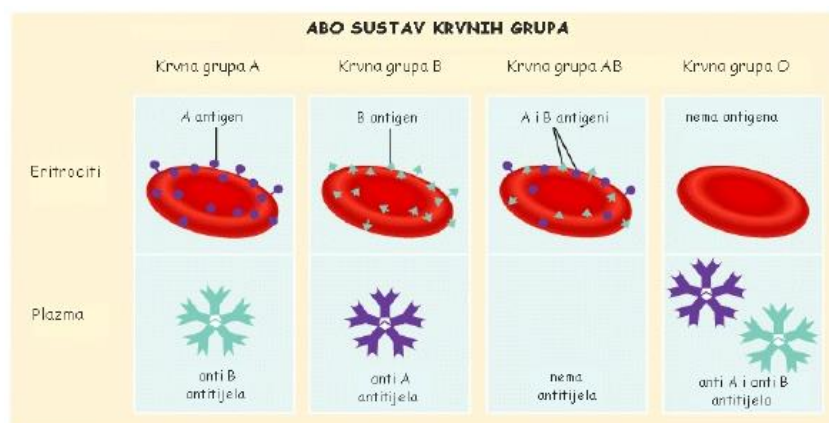
antieritrocitnih protutijela. Transfuzijsko liječenje se provodi najčešće krvnim pripravcima istovjetne ili podudarne ABO ili Rh (D) krvne grupe. (4)

## 1.4. ABO i Rh krvne grupe

Krvne grupe su nasljedne karakteristike koje se ne mijenjaju tijekom života i stoga su vrlo važne u transfuzijskoj medicini. Sastavni su oblik membrane krvne stanice te su nužne za njen oblik, ulogu i život. 1901. godine Landsteiner je otkrio ABO sustav krvnih grupa i objasnio, kod ABO nepodudarnih grupa između davatelja i primatelja krvi, akutnu hemolitičku transfuzijsku reakciju. Od tada je otkriveno više od 600 eritrocitnih antigena. 194 od njih su svrstana u 23 različita sustava krvnih grupa koji čine antigeni koji se nasljeđuju zajednički.

Za transfuzijsku medicinu najvažniji su ABO i Rh D sustavi, odnosno krvne grupe, koje se obavezno određuju kod svakog darivatelja krvi.

**ABO sustav** krvnih grupa je prvi otkriven sustav krvnih grupa i najvažniji je sustav. ABO antigeni su rasprostranjeni. Nalaze se na membrani eritrocita, na stanicama drugih tkiva i otopljeni su u plazmi i tjelesnim tekućinama. (6) U ABO sustavu spadaju četiri krvne grupe: krvna grupa A, krvna grupa B, krvna grupa AB i krvna grupa 0. ABO fenotip se određuje prisutnošću antigena koji se nalazi na membrani eritrocita i protutijela u serumu.



Slika 1. ABO sustav krvnih grupa (Preuzeto s:  
<http://www.slideshare.net/radenovic/transfuzijska-medicina-online-teaj>)

**Rh sustav** je najveći i najsloženiji sustav kojeg čine 54 antigena, a među njima je najvažniji antigen D. Po značajnosti ga zatim slijede C, c, E i e.

Rh antigeni su kodirani sa dva usko povezana homologna gena (RHD i RHCE) i oni se nalaze na kraćem kraku kromosoma 1. RHD gen proizvodi D antigen, a RHCE proizvodi Cc i Ee antigene. RHD i RHCE geni kodiraju Rh D (CD240D) i Rh CcEe (CD240CE). (3) Oni su jako hidrofobni neglikozilirani proteini koji prelaze membranu eritrocita 12 puta.

Još jedan protein koji je izuzetno bitan je RhAG (eng. Rh-associated glycoprotein) (CD241). Njega kodira gen RHAG koji se nalazi na kraćem kraku kromosoma 6. Potrebna je njegova prisutnost na membrani eritrocita za ekspresiju Rh antigena.

Rh D (RH1) antigen je prvi otkriven i klinički najvažniji jer je najviše imunogeničan. Ima manju ekspresiju kada je prisutan C antigen i zbog toga DcE/DcE eritrociti imaju veći skor od DCE/DCE eritrocita u titraciji sa anti-D.

Osobe koje na svojim eritrocitima posjeduju antigen D nazivaju se Rh (D) pozitivnim, a osobe koje ne posjeduju Rh (D) negativnim.

Oko 85% populacije je Rh D poz., a oko 15 % Rh D neg..

U Hrvatskoj od prikupljenih 100 doza darovane krvi se može očekivati da će se dobiti :

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| - 36 doza A Rh (+) | - 6 doza A Rh (-)  |
| - 14 doza B Rh (+) | - 3 doze B Rh (-)  |
| - 29 doza 0 Rh (+) | - 5 doza 0 Rh (-)  |
| - 6 doza AB Rh (+) | - 1 doza AB Rh (-) |

## **1.5. Varijante slabog D<sup>u</sup>**

Rh (D) antigen je transcelularni proteinski antigen koji 12 puta prolazi kroz membranu. Ima najmanje 30 epitopa, a broj antigenskih mjesta na eritrocitu varira od 20-tak do 200 000. Postoje razne varijante antigena D. Neki su rezultat nedostatka broja D epitopa, a neki smanjene ekspresije antigena D. Većina uključuje oboje.

Slabi D je varijanta gdje je broj epitopa normalan, ali je jako smanjena ekspresija D antigena. Postoji i parcijalni D, varijanta gdje nedostaje broj epitopa, a ekspresija je normalna. Kod normalnih Rh (D) pozitivnih osoba na membrani eritrocita se nalazi oko 10 000 – 30 000 antigena D, a slabi D eritrociti imaju između 70 i 4 000 antigena. (8) Slabi D antigeni se hvataju u direktnoj aglutinaciju, a parcijalni se ne mogu. Parcijalni D fenotipovi poput DIIIa, DVI, DBT i DFR mogu stvoriti anti-D protutijela i odrediti se serološki. Većina, tj. oko 90% slabih D fenotipa u kojima spadaju slabi D tip 1, 2, 3, 4.0 ne stvaraju anti-D protutijela i određuju se molekularnim metodama. Postoje iznimke poput slabi D tip (4.2, 5, 11, 15, 19, 20) koji mogu stvoriti anti-D protutijela kada im se daje Rh (D) pozitivna krvna grupa. (9) Neki parcijalni D fenotipovi poput DIII i DIV imaju normalan broj antigenskih mjesta na membrani eritrocita, dok kategorija DVI-1 i DVI-2 ima mali broj i teže se određuje.

Jako slaba varijanta D antigena koja ima najmanji broj antigenskih mjesta je DEL i povezana je sa prisutnošću mutiranog RHD gena. Učestalost darivatelja sa DEL-om u Europi je između 1:350 i 1:2 000. (10) Najveći broj antigenskih mjesta kod DEL-a je 36, ali u većini slučajeva je manji od 22 i zato se ne može otkriti aglutinacijskim testovima, dok slabi D-26 eritrociti sa 70 antigenskih mjesta mogu se aglutinirati sa anti-D u antiglobulinskom testu. (6) DEL i druge vrlo slabe varijante ne mogu se otkriti rutinskim serološkim metodama, nego se radi identifikacija molekularnim metodama. Neke od tih varijanti koje je teže otkriti jer imaju manje od 500 antigenih mjesta su DVI-1, DAU-2, DIM, DVL-2, Slabi (weak) D tip (1.1, 2 i 15), DEL-1 i DEL-5.

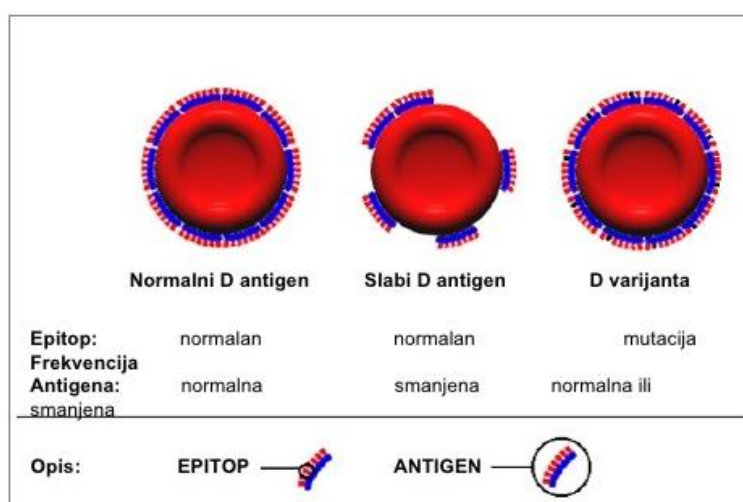
Zbog varijabilnosti Rh (D) antigena u određivanju se koriste reagensi (najmanje 2) koji sadrže različite klonove anti-Rh (D) protutijela.

Rh (D) antigen je kod 1-2 % osoba slabije izražen te ne pokazuje direktnu aglutinaciju nakon inkubacije eritrocita s anti-D reagensom ili anti-D serumom na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Neki eritrociti koji su Rh (D) pozitivni zahtijevaju produženu inkubaciju s anti-D, a neki se pozitivnima prikazuju tek nakon što se doda AHG (antihumani globulin), kao kod određivanja Rh (D) antigena u IAT-u, pri čemu je obavezno koristiti neki od Rh (D) reagensa koji mogu detektirati VI kategoriju parcijalnog Rh (D) antigena. Eritrociti koji su zahtijevali dodatne korake u testiranju su se prije obilježavali kao D<sup>u</sup>, ali danas se više taj termin ne smatra prikladnim. Osoba se

obilježava kao Rh (D) pozitivna, ali treba biti napomena da se radi o „slabom D“ ili „weak D“. „Slabi D“ može biti kvantitativno slabi D ili parcijalni D.

Rh (D) antigen se određuje indirektnim antiglobulinskim testom na principu aglutinacije eritrocita u mikrostupcu. Anti-Rh (D) protutijela su IgG razreda i nalaze se u anti-Rh (D) reagensu te oblažu eritrocite ispitanika, no kod slabog Rh (D) ne uzrokuju izravnu aglutinaciju. Anti-humani globulinski reagens u mikrostupcu omogućava vezanje i aglutinaciju obloženih eritrocita. Ovom metodom se tako mogu otkriti vrlo male količine Rh (D) antigena na eritrocitima ispitanika i to je izrazito važno da bi se spriječila Rh (D) imunizacija kod Rh (D) negativnih primatelja krvi. Ponekad osobe imaju slabiju ekspresiju antigena D stoga se kod davatelja krvi koji je Rh (D) negativan obavezno ispituje je li Rh (D<sup>u</sup>) pozitivan jer D<sup>u</sup> antigen kod Rh (D) negativnih osoba može potaknuti imunološki odgovor i stvoriti protutijela.

D<sup>u</sup> je nepotpuno izražen antigen D i zato se još naziva i slabi D. Slabi D izraz je za eritrocitni fenotip koji na membrani eritrocita ima mali broj antigena ili promijenjenu strukturu antigena D gdje nedostaje dio molekule antigena D. U osoba kod kojih nedostaje dio molekule D antigena mogu se stvoriti protutijela protiv dijela antigena koji im nedostaje. Osobe koje su Rh (D) negativni, a D<sup>u</sup> pozitivni su kao davatelji krvi Rh (D) pozitivni, a kao primatelji Rh (D) negativni.



Slika 2. Varijacije D antigena (Preuzeto s :

<http://www.slideshare.net/radenovic/transfuzijska-medicina-online-teaj> )

## **2. CILJ RADA**

Cilj ovog rada je ukazati na kliničku važnost i pravilnost izvođenja testa D<sup>u</sup> varijante kod dobrovoljnih darivatelja krvi. Od iznimne važnosti i za darivatelja, a osobito za primatelja određenog krvnog pripravka je pravilna analiza i visoka osjetljivost određivanja ABO sustava te Rh faktora. Kod DDK koji se pokazu prema rezultatima testiranja Rh negativni, šalje ih se na dodatno određivanje slabe varijante D<sup>u</sup>. Na osnovu tog testa možemo zaključiti koji ćemo krvni pripravak dati bolesniku.

### **3. IZVORI PODATAKA I METODE**

#### **3.1. Proces darivanja krvi**

Darivanje krvi je dragovoljan čin kojim se uzima krv za pripravu krvnih sastojaka i transfuzijsko liječenje bolesnika. Prije svakog darivanja krvi darivatelj mora proći neke postupke da bi se utvrdilo da li darivatelj može pristupiti darivanju krvi.

Kad darivatelj krvi dođe u zdravstvenu ustanovu darovati krv mora donijeti osobnu iskaznicu ili neki drugi identifikacijski dokument sa slikom iz kojeg se provjeravaju sljedeći podaci :

- ime i prezime
- mjesto rođenja
- jedinstveni matični broj građana (JMBG)
- adresa stanovanja
- mjesto zaposlenja
- broj telefona u stanu i na poslu
- knjižica darivatelja krvi i broj dosadašnjih darivanja krvi (kod darivatelja koji su više puta darovali krv)

Svakoj osobi koja odluči darovati krv se kompjuterski otvara Karton darivatelja krvi. Osim osobnih podataka unose se i sljedeći podaci :

- mjesto darivanja krvi
- broj trenutnog darivanja
- ime liječnika koji je pregledao darivatelja
- rezultat liječničkog pregleda prije darivanja
- razlozi za odgađanje od darivanja ili trajno isključenje
- ime djelatnika koji je izvršio uzimanje krvi
- rezultati laboratorijskog ispitivanja krvi



Nakon identifikacije darivatelj dobiva upitnik sa nekim važnim pitanjima za ispuniti. Izuzetno je bitno da se iskreno odgovori na ta pitanja zbog zaštite zdravlja samog darivatelja i pacijenta koji će primiti krv.

| UPITNIK ZA DAVATELJE KRVİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | DA                           | NE                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 1.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Prepoznajete li se u bilo kojoj od navedenih skupina ljudi s povećanim rizikom?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 2.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Jeste li u posljednjih 12 mjeseci imali spolni kontakt s osobom s povećanim rizikom?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 3.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Jeste li sada dobroga zdravlja?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 4.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Jeste li već davali krv?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 5.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Jesu li Vas ikad odbili na akciji davanja krvi i zašto?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 6.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Jeste li danas konzumirali alkoholna pića?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 7.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Bolujete li od akutnih i kroničnih infekcija? Jeste li u posljednja 2 tjedna imali povišenu temperaturu?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 8.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Bolujete li od bolesti probavnog i dišnog sustava? Nedavni proljevi, povraćanja, mučnine, kašalj...?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 9.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Jeste li nedavno imali neobjašnjive vrućice, gubitak tjelesne težine, povećane limfne čvorove?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 10.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Jeste li bili cijepljeni u posljednja 4 tjedna/godinu dana?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 11.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Jeste li u posljednjih mjesec dana imali ubod krpelja?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 12.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Jeste li posljednja 4 tjedna uzimali neke lijekove, uključujući i aspirin (tablete, injekcije, čepiće)?<br>Koje?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 13.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Jeste li ikad uzimali lijekove za prostatu, akne, psorijazu, alopeciju (Roaccutane, Proscar, Avodart,...)?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 14.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Jeste li u posljednjih 7 dana bili potvrgnuti nekom stomatološkom ili lakšem kirurškom zahvatu?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 15.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Jeste li ikad primili ljudski hormon rasta?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 16.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Je li Vam ikad transplantirano tkivo/organ (npr. rožnica, tvrda moždana ovojnica...)?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 17.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Je li itko u Vašoj obitelji bolovao ili boluje od Creutzfeld-Jacobove bolesti?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 18.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Jeste li se rodili ili živjeli i/ili putovali u tropske zemlje? Ili općenito putovali u zadnjih mjesec dana?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 19.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Jeste li u posljednjih 6 mjeseci: primili transfuziju krvi, bili operirani?<br>• bili na akupunkturi, tetovirali se, bušili uho ili bilo koji drugi dio tijela?<br>• uboli se na medicinsku iglu ili bili u kontaktu s tuđom krv?<br>• bili podvrgnuti endoskopskom pregledu (artroskopiji, gastroskopiji, laparoskopiji...)?<br>• bili u kontaktu s bolesnikom s virusnim hepatitisom B?                                                | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 20.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Jeste li ikad imali: • virusnu žuticu, tuberkulozu, malariju, reumatsku groznicu, mononukleozu?<br>• bolesti srca i krvnih žila, bubrega, jetre, previsok ili nizak krvni tlak?<br>• težak oblik alergije, astmu?<br>• psihičke ili neurološke bolesti, epilepsiju?<br>• sklonost krvarenju, bolesti krvi?<br>• dijabetes, bolesti štitnjače, malignu bolest (tumor, karcinom)?<br>• spolno prenosivu bolest, kožne bolesti osip i akne? | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 21.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Obavljate li opasne poslove: rad na visini, u dubini, upravljanje zrakoplovom, alpinizam?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| 22.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | (Samo za žene) U posljednjih 6 mjeseci - trudnoća, pobačaj, porod, dojenje? Menstruacija u tijeku?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <input type="checkbox"/>     | <input type="checkbox"/> |
| <p>⇒ Obaviješten/a sam o postupku uzimanja krvi i mogućim posljedicama za moje zdravlje te o tome da mogu u bilo kojem trenutku povući pristanak za davanje krvi.</p> <p>⇒ Upoznat/a sam s informacijama na temu AIDSa i drugih krvlju prenosivih bolesti. Upoznat/a sam s mogućnosti postavljanja dodatnih pitanja u bilo koje doba.</p> <p>⇒ U slučaju pojave bilo kakvih znakova bolesti u roku 48 sati od davanja krvi, zamoljen/a sam da o tome obavijestim KBC Split</p> <p>⇒ Ne smatram se osobom povećanog rizika</p> <p>⇒ Upoznat/a sam o obveznom testiranju svake uzete doze krvi.</p> <p>⇒ Upoznat/a sam da ću biti obaviješten u slučaju da rezultati testiranja pokažu odstupanje značajno za moje zdravlje, a da će doza biti uništena.</p> <p>⇒ Sva pitanja su mi objašnjena i razumljiva i moji odgovori su iskreni te pristajem dati krv.</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                              |                          |
| Potpis liječnika: _____                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Potpis davatelja krvi: _____ |                          |
| <p>Podaci o davatelju krvi navedeni na ovom listiću zakonom su zaštićeni i KBC Split je dužan s tim podacima postupati u skladu sa zakonom.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                              |                          |

Slika 3. Primjer upitnika za dobrovoljne darivatelje krvi (Snimljeno u ambulanti Centra za transfuzijsku medicinu KBC Split)

Zatim se radi provjera hemoglobina koja se radi prije svakog darivanja krvi. Hemoglobin je krvna boja koja u sebi sadrži željezo, a manjak željeza može ukazati na slabokrvnost. Mjerenje koncentracije hemoglobina se provodi ubodom u jagodicu prsta. Metoda određivanja hemoglobina može biti kvantitativna ili kvalitativna, ali se većinom koristi kvalitativna metoda gdje se upotrebljavaju otopine bakrenog sulfata ( $\text{CuSO}_4$ ). Zelena otopina bakrenog sulfata je specifične težine 1,055 i ima jednaku specifičnu težinu kao i krv u kojoj je vrijednost hemoglobina 135g/L te ona služi za određivanje graničnih vrijednosti hemoglobina u krvi kod muških dobrovoljnih darivatelja. Za žene se koristi plava otopina bakrenog sulfata koja je specifične težine 1,053 što je jednako vrijednosti hemoglobina 125g/L. Lancetom se ubacuje kap krvi u plavu ili zelenu otopinu bakrenog sulfata, ovisno o spolu. Ukoliko kap krvi ima veću specifičnu težinu od otopine bakrenog sulfata potonut će unutar 15 sekundi, odnosno ako je jednake specifične težine ostat će lebdjeti u otopini. Kap će ostati na površini ili će se nakon djelomičnog potonuća vratiti na površinu ako ima manju specifičnu težinu od otopine  $\text{CuSO}_4$ . Davatelj može dati krv ako kap krvi u otopinu tone ili lebdi, a ako kap krvi ostaje na površini ili se vraća na površinu nakon djelomičnog potonuća, onda davatelj ne može dati krv.

Nakon provjere hemoglobina, ukoliko je davatelj zadovoljio kriterij, slijedi liječnički pregled koji podrazumijeva razgovor s liječnikom, provjeru rada srca, mjerenja tlaka, a po potrebi i tjelesne težine. Liječnik razgovorom može pomoći u rješavanju nejasnoća vezanih za upitnik davatelja ili za zdravstvene probleme. Zdravstvena anamneza se dobiva putem upitnika i razgovora sa liječnikom te može pomoći pri identificiranju i izdvajanju osoba čije bi uzete doze krvi ili krvnog sastojka mogle predstavljati zdravstveni rizik. Dakle, liječnik postavljanjem određenih pitanja odlučuje da li osoba smije darovati krv bez da naškodi svom zdravstvenom stanju i bez opasnosti za potencijalne primatelje krvi. Kad doktor ustanovi da osoba smije darovati krv, dobiva svoj barkod i može pristupiti darivanju krvi. Barkod koji osoba dobije, lijepi se na vrećice za uzimanje krvi i isti se nalazi i na upitniku. Prije svake venepunkcije provjerava se davateljev identitet usporedbom podataka dobivenih od njega s podacima koji se nalaze na davateljevom kartonu.

Darivatelj krvi je udobno smješten na krevetu za darivanje krvi te iskusan zdravstveni tehničar provjera vene na objema rukama i odabire najpogodnije mjesto za napraviti venepunkciju. Uzimanje krvi provodi se aseptično, punktira se površinska vena kubitalne jame i uzima krv u sterilnu vrećicu bez kontakta sa zrakom. Koža se na mjestu venepunkcije dezinficira sa 76%-tnim alkoholom ili nekim drugim dezinficijensom te se čeka između 30 sekundi i 1 minute da bi alkohol ishlapio i postigao optimalan učinak. Potrebno je pripaziti da se koža nakon sušenja više ne dira. Tlak se u manšeti, koja je postavljena iznad mjesta venepunkcije povisi te se vena punktira. Kada krv poteče kroz sistem, otpusti se tlak u manšeti tlakomjera, a adhezivnom trakom 10-14 cm ispod ubodnog mjesta se učvrste igla i plastični sustav. Igla je povezana cjevčicom s plastičnom vrećicom u koju se prikuplja krv. I igla i plastična vrećica za uzimanje krvi su sterilne i namijenjene za jednokratnu uporabu. Krv prvo ide u predonacijsku vrećicu, a nakon toga se puni velika vrećica u kojoj se nalazi antikoagulantna otopina. Tijekom uzimanja krvi, krv treba miješati sa antikoagulantnom otopinom da bi se spriječilo stvaranje ugruška krvi u vrećici. Omjer krvi i antikoagulantne otopine ne smije biti veći od 7:1. Darivanje krvi traje 8-12 minuta i uzima se 450 mL krvi. Medicinski tehničar ili medicinska sestra trebaju cijelo vrijeme biti prisutni da bi mogli uočiti prve znakove nuspojava ako se dogode te pravodobno poduzeti mjere prevencije ili liječenja.



Slika 4. Darivanje krvi dobrovoljnog darivatelja (Preuzeto s: <http://www.nst.com.my/news/2016/04/137713/blood-donation-drive-ummc-april-20>)

Nakon što se prikupi puna doza krvi, vadi se igla iz vene i darivatelj mora ostati sjediti 10-ak minuta držeći pritisnuto mjesto uboda. Mora držati pritisnuto sterilnom vatom da bi se spriječili krvni podljevi i naknadno krvarenje iz mjesta uboda te se zatim stavlja zavoj ili flaster. Darivatelj nakon darivanja krvi dobiva obrok zahvalnosti te se preporuča da darivatelj uzme barem ponuđeni napitak radi nadoknade izgubljenog volumena. Preporuča se da se darivatelj nakon darivanja krvi suzdrži od alkohola i pušenja barem jedan sat te da poštedi ruku težih fizičkih napora, također i da flaster ili zavoj ne skida najmanje dva sata.

Nakon darivanja krvi iz predonacijske vrećice pune se mala ljubičasta epruveta s EDTA za kontrolu krvne grupe, žuta (biokemijska) epruveta sa separacijskim gelom za provjeru krvi na krvlju prenosive bolesti, tj. za serologiju, te ljubičasta epruveta koja se šalje na dodatno NAT testiranje.

## **3.2. Imunohematološko testiranje darivatelja krvi**

### **3.2.1. Opći zahtjevi**

Svi postupci imunohematološkog testiranja, način provođenja osiguranja i kontrole kvalitete testiranja, vođenje dokumentacije i zapisa moraju biti detaljno opisani u slijedu postupaka (algoritmi), radnim uputama i/ili standardnim operativnim postupcima (SOP) (12). Radne upute i preporuke moraju biti dostupne te pri ruci svim djelatnicima koji provode i nadziru provođenje imunohematološkog testiranja dobrovoljnih darivatelja krvi. Sve transfuzijske ustanove u kojima se izvode imunohematološka testiranja moraju sudjelovati u programima vanjske kontrole kvalitete testiranja. Voditelj transfuzijske jedinice mora pokrenuti postupak provjere opreme i svih procesa uključenih u izvođenje testa ukoliko rezultati kontrole nisu točni. Postupci provjere, rezultati, zaključak i korektivne mjere koje su provedene moraju biti dokumentirani i pohranjeni. U nekim slučajevima se može odstupiti od načela i pravila opisanih u radnim uputama ili preporukama, tada odgovornost snosi rukovoditelj transfuzijske ustanove za svako odstupanje.

Odstupanje se mora detaljno obrazložiti i opisati na sljedeći način :

- razlog odstupanja mora biti jasno dokumentiran
- promijenjeni postupak mora biti detaljno opisan u pisanom obliku
- jasno naznačene moraju biti moguće posljedice promjena i točno opisani postupci u cilju sprečavanja istih

Kada se tijekom imunohematološkog testiranja dogode poteškoće koje transfuzijska ustanova ne može sama riješiti, onda se uzorci krvi trebaju poslati u neki drugi transfuzijski laboratorij ili referentni laboratorij gdje se mogu napraviti potrebna testiranja ili riješiti problem u laboratorijskom ispitivanju. U radnoj uputi treba pisati u koji se referentni ili drugi laboratorij šalje uzorak, na koji način se pakira, kako se šalje, te ime i prezime kontaktne osobe u tom laboratoriju. Ustanova koja šalje rezultate dodatnog testiranja mora uz rezultate još navesti vrste testova koje su primijenili i točnu interpretaciju rezultata.

### 3.2.2. Uzorci

Uzorci za imunohematološko testiranje se uzimaju u epruvete s antikoagulantnom otopinom (etilen tetra-octenom kiselinom / EDTA uzorak).



Slika 5. Epruveta sa EDTA za imunohematološko ispitivanje (Preuzeto s: <http://www.keyword-suggestions.com/dmFjdXRhaW5lcjBIZHRh/> )

U pisanim postupcima treba biti :

- opisan način čuvanja uzorka prije imunohematološkog testiranja
- opisan način obaveznog vizualnog pregleda uzorka kojim se utvrđuje da je uzorak prikladan za imunohematološko testiranje
- nesukladan uzorak jasno definiran
- postupak s nesukladnim uzorcima opisan na točan način

Nesukladni uzorci su :

- hemolitični uzorci
- lipemični uzorci
- uzorci s ugrušcima
- uzorci s nedovoljnom količinom krvi
- uzorci u kojima je nezadovoljavajući omjer količine eritrocita i plazme (12)

Na uzorcima za imunohematološko testiranje mora biti obilježen „barkod broj“ i odgovarajući alfanumerički broj koji se može jasno pročitati. „Barkod broj“ i odgovarajući alfanumerički broj uzorka omogućavaju sljedivost uzorka s dozom krvi, krvnim pripravcima koji su proizvedeni iz te doze i matičnim kartonom davatelja te doze.

### **3.2.3. Reagensi**

Ovlaštena transfuzijska ustanova mora voditi zapise o podacima koji potvrđuju prikladnost svakog korištenog reagensa upotrijebljenog pri testiranju uzoraka davatelja krvi ili krvnog sastojka i to radi za sve reagense koji se koriste u testiranju. Propisanu ulaznu kontrolu mora proći svaki lot i/ili pošiljka reagensa prije upotrebe. Bez provedene i zapisom ovjerene ulazne kontrole nije dozvoljena rutinska upotreba reagensa. Način upotrebe reagensa i skladištenje mora biti u skladu s uputama proizvođača. Pisani postupci o kontroli ulaznog materijala, validiranju i kontroli opreme, načinu proizvodnje te procesne i završne kontrole reagensa moraju postojati za

„in house“ proizvedene reagense. Moraju postojati zapisi u kojima se evidentiraju postupci od početka proizvodnje do izdavanja reagensa za korištenje.

Pisanim postupcima mora biti :

- izraženi najmanje sljedeći elementi vezani uz reagense : naziv proizvođača i/ili dobavljača, broj serije (lot) reagensa, datum isteka roka valjanosti reagensa i količina reagensa u skladištu
- osigurana jasna sljedivost tijeka uporabe svake serije reagensa korištenih u testiranju svakog uzorka
- opisan način upravljanja zalihama reagensa na način „first in first out“, uz naglasak da se prvo koriste reagensi s najkraćim rokom uporabe. (12)

#### **3.2.4. Oprema**

Ispravnost rada svakog aparata mora biti provjerena (validirana) sukladno pisanim postupcima prije uvođenja u rutinsku upotrebu. Potrebno je učiniti za svaki aparat validacijski plan unutar kojega su detaljno opisani postupci koji se moraju provesti da bi se utvrdilo da se s opremom pouzdano dobivaju ispravni rezultati. U pisanim uputama mora biti opisan način korištenja, čišćenja i kalibriranja aparata. Pisane upute moraju biti u skladu s preporukama proizvođača. Nakon završetka popravka i/ili kalibriranja aparata, prije početka puštanja u rutinski rad, mora biti opisan postupak načina kontrole aparata. Svaki postupak treba biti opisan i potvrđen validacijskim postupkom ako dođe do odstupanja od uputa proizvođača tijekom korištenja aparata. Za svaki uređaj čija upotreba može utjecati na rezultat imunohematoloških testova mora postojati Dnevnik opreme i zapisi iz njega se moraju čuvati.

U Dnevniku opreme moraju biti najmanje sljedeći podaci :

- naziv servisne ustanove i/ili ime i prezime servisera i njegov telefonski broj
- datum prekida u radu, datum i vrsta kvara
- datum čišćenja i datum kalibracije i/ili popravka (12)



### **3.2.5. Metode testiranja**

Prije uvođenja u rutinski rad metode testiranja moraju biti provjerene u validacijskom postupku kojim se utvrđuje i/ili potvrđuje njihova osjetljivost, specifičnost i reproducibilnost. Sukladno propisanim postupcima validacije, postupci i zaključci moraju biti u pisanom obliku pohranjeni. U radnim uputama mora biti detaljno opisan način izvođenja pojedinih testova te svaki test mora biti izveden u potpunosti prema naputcima radnih uputa. Svako odstupanje od preporuka proizvođača mora biti ispitano (validirano), potvrđena valjanost i reproducibilnost testa i dokumentirano. Provođenjem dnevne procesne kontrole mora biti provjerena i praćena ispravnost izvođenja testa, a način provođenja mora biti opisan u pisanim postupcima.

### **3.2.6. Rezultati testiranja**

Rezultati imunohematoloških testiranja moraju biti upisani u bazu podataka i dokumentirani u provjerenom automatskom informatičkom sustavu (12). Validacijskim postupkom se potvrđuje valjanost automatskog prijenosa podataka. Postupak mora biti dokumentiran. Točnu identifikaciju svakog uzorka mora osigurati sustav pomoću kojeg se dobiva izvješće s rezultatima. Sustav uključuje minimalno programsko definiranje točnog (očekivanog), pozitivnog, negativnog i nejasnog rezultata. Automatski izravnim prijenosom iz sustava za testiranje mora biti izveden upis rezultata laboratorijskog testiranja krvi davatelja u elektronički informacijski sustav.

Testovi moraju biti izvođeni na automatiziranim sustavima za testiranje i moraju zadovoljiti najmanje :

- potpunu identifikaciju uzorka, čitanje i tumačenje rezultata testa
- sigurno povezivanje rezultata testa s odgovarajućim uzorkom krvi, dozom krvi i kartonom davatelja
- prijenos rezultata automatski u elektronički informacijski sustav

Prijenos rezultata iz sustava za testiranje u elektronički informatički sustav iznimno može biti izveden ručno i taj postupak ručnog unosa rezultata mora biti detaljno opisan,



validiran i siguran. Nakon ručnog unosa mora se napraviti kontrola ispravnosti unosa testa koja mora biti opisana u pisanom postupku. Kada se rezultati upisuju ručno, svaki rezultat trebaju provjeriti neovisno dvije stručne osobe. Nakon testiranja rezultati moraju odmah biti upisani u bazu podataka. Moraju se rezultati testiranja automatski vezati uz dozu uzete krvi ili uz krvni sastojak te uz matični karton davatelja. Elektronički informacijski sustav mora otkriti razlike u ABO, Rh i drugim krvnim grupama između rezultata zadnjeg testiranja i rezultata ranijih određivanja krvnih grupa. Svi rezultati testiranja moraju biti arhivirani i dostupni za provjeru. Ručnim imunohematološkim metodama se mogu rješavati nejasni rezultati imunohematoloških ispitivanja.

### **3.2.7. Obavezni i dodatni imunohematološki testovi**

U obavezne imunohematološke testove spadaju ABO, Rh (D) krvna grupa i pregledni testovi pretraživanja iregularnih protutijela / indirektni antiglobulinski test (IAT). ABO i Rh (D) krvna grupa se moraju odrediti nakon svake donacije krvi. Obavezni imunohematološki testovi su testovi bez kojih se ne može izdati niti jedan krvni pripravak i oni se moraju izvoditi prema točno propisanim algoritmima.

Dodatni imunohematološki testovi su Rhesus fenotip, Kell antigen i direktni antiglobulinski test (DAT). Dodatni testovi se ne izvode nakon svake donacije, već samo u jasno definiranim slučajevima s ciljem da osiguraju sigurnost transfuzijske terapije ili povećaju kliničku učinkovitost određenog krvnog pripravka te se oni također moraju izvoditi po propisanim algoritmima.

## **3.3. Postupak imunohematološkog testiranja dobrovoljnih darivatelja krvi**

Imunohematološko testiranje je obavezno pri svakom davanju pune krvi i/ili krvnih sastojaka. Za provođenje postupka imunohematološkog testiranja odgovoran je liječnik specijalist transfuzijske medicine.

**Ulazni elementi** se dijele na opće i specifične. Opći elementi su zakonska regulativa, dokumentirani postupci, stručna literatura i edukacija. Specifični su ID obilježeni uzorci krvi DDK iz epruvete i ID obilježeni uzorci krvi iz nastavka donacijske vrećice, ID uzorak ili uzorci za dodatno imunohematološko ispitivanje te iz programa e-Delphyn-a se dobivaju kartoni DDK, Prateći list doza krvi i uzoraka i Upozorenja i napomene za laboratorij.

Broj zaprimljenih ID obilježenih uzoraka i broj kartona DDK mora biti identičan s brojem navedenim na Pratećem listu doza krvi i uzoraka krvi DDK. Barkod zapisi na epruvetama i/ili nastavcima donacijskih vrećica moraju biti identični barkod zapisu koji se nalazi na kartonima DDK iz programa e-Delphyn. Svi uzorci za ispitivanje moraju se pregledati sukladno Postupku s nesukladnim uzorcima i uputnicama za laboratorijsko ispitivanje.

Opis procesa :

- preuzimaju se uzorci krvi iz epruvete ili nastavaka donacijskih vrećica i kartoni DDK uz prateće liste doza krvi i uzoraka iz programa e-Delphyn-a
- kontrolira se bar kod uzorka DDK iz epruvete ili donacijske vrećice i kontrolira se bar kod na kartonu DDK
- radi se kontrola ispravnosti uzorka
- liječniku se na uvid daje lista iz programa e-Delphyn-a „UPOZORENJA I NAPOMENE ZA LABORATORIJ“
- pripremaju se uzorci DDK i priprema se aparat ORTHO AUTO/VUE Innova za imunohematološko testiranje te se za njega radi dnevna procesna kontrola
- zadavaju se odgovarajući imunohematološki profili (novi/višestrukih DDK)
- novim DDK se obavezno određuje ABO i Rh (D) krvna grupa, Rh fenotip, Kell antigen i pregledni testovi pretraživanja na iregularna antieritrocitna protutijela (IAT). Novim Rh (D) negativnim DDK se obavezno određuje slabi Rh (D) antigen mikrometodom u IAT-u (D<sup>u</sup>) i rezultati se moraju obavezno upisati u program e-Delphyna
- obavezno se napravi kontrola ABO i Rh (D) krvne grupe iz nastavka donacijske vrećice za nove DDK

- višestrukim DDK obavezno se radi kontrola ABO i Rh (D) krvne grupe, a pregledni testovi pretraživanja iregularnih antieritrocitnih protutijela rade samo višestrukim DDK kojima rezultat nije unesen u e-Delphyn i onima kojima je kroz listu programa liječnik dao opasku
- višestrukim DDK obavezno je napraviti Rh fenotip / Kell antigen ako kod prethodnih donacija nije upisan ili potvrđen u program e-Delphyn
- višestrukim Rh (D) negativnim DDK koji u Rh fenotipu imaju C+ i/ili E+ određuje se **slabi Rh (D) antigen (D<sup>u</sup>) mikrometodom** u IAT-u i obavezno se upisuju rezultati u program e-Delphyn-a ako kod prethodnih donacije nije upisan ili potvrđen
- potrebno je trajno praćenje tijeka testiranja uzoraka DDK
- vizualna kontrola i potvrda rezultata se radi prema radnoj listi iz ORTHO AUTO/VUE Innova i treba biti sukladna kartonu DDK
- obavezno se radi dodatno imunohematološko ispitivanje svih nejasnih i inicijalno pozitivnih rezultata prema algoritmima
- rezultati se validiraju i odgovorni liječnik specijalist transfuzijske medicine daje potpis

**Izlazni elementi** su radna lista dnevnih procesnih kontrola, radna lista ispis ORTHO AUTO/VUE Innova uz upis rezultata Rh(D) u IAT-u (D<sup>u</sup>) napravljen ručnom metodom u mikrokartici, protokol za inicijalno nejasne rezultate, nalaz u elektronskom i pisanom obliku, validacijska lista, lista nesukladnosti rezultata i karton DDK iz programa e-Delphyn-a, knjižica DDK i obrađeni uzorci DDK.

### 3.4. Priprema uzoraka krvi DDK za imunohematološko testiranje

#### 3.4.1 Pribor i materijali

- Oprema
  - laboratorijska centrifuga : Heraeus – Megafuga 1.0
  - hladnjak za čuvanje uzoraka krvi DDK
  - jednokanalna viševolumska pipeta

- dispencer za fiziološku otopinu
- Pribor
  - zaštitne rukavice
  - metalni stalci za držanje epruveta
  - stalci za držanje mikrokartica
  - staklene ili plastične epruvete
  - staklene ili plastične pipete
  - plastični nastavci za jednokanalnu viševolumsku pipetu
  - bubrežnjak
  - kontenjer za infektivni materijal

### **3.4.2. Postupci pripreme uzoraka krvi**

- Centrifugiranje uzoraka krvi

S epruveta ID obilježenih uzoraka DDK uzetih u vakutainere s antikoagulansom EDTA ne skida se zaštitni poklopac. Uzorci krvi se centrifugiraju na 2500 okretaja tijekom 3 minuta. Nakon što se centrifuga zaustavi treba pogledati da li je došlo do pravilnog odvajanja plazme. Ako nije došlo do odvajanja plazme, postupak centrifugiranja se ponavlja, ali prvo se trebaju promiješati uzorci krvi okretanjem epruvete

Potrebno je prirediti staklenu ili plastičnu epruvetu na koju se napišu identifikacijski podaci DDK za uzorke krvi koji se ručno obrađuju.

Ako dođe do pravilnog odvajanja plazme nakon centrifugiranja, plastičnom ili staklenom pipetom se izdvaja plazma u obilježenu epruvetu. Izdvojena plazma se obavezno prije izvođenja testova centrifugira na 2500 okretaja 2 minuta.

- Razvrstavanje uzoraka krvi DDK za imunoematološko ispitivanje
  - Novi DDK
  - Višestruki DDK

- Pohranjivanje netestiranih uzoraka krvi DDK

Neobrađeni uzorci krvi DDK se pohranjuju u hladnjak za čuvanje uzoraka krvi. Imunohematološka testiranja neobrađenih uzoraka krvi DDK moraju se najkasnije sljedećeg dana izvesti.

### **3.5. Imunohematološka testiranja uzoraka krvi novih i višestrukih DDK**

Oprema :

- laboratorijska centrifuga : Heraeus Megafuga 1.0
- automatski uređaj za imunohematološku dijagnostiku Ortho Auto/Vue Innova.
- laboratorijska centrifuga Ortho BioVue
- laboratorijski inkubator Ortho BioVue
- hladnjak Thermo Scientific
- kombinirani hladnjak/zamrzivač COMBI 2T 425
- laboratorijski inkubator DiaHem ID-Incubator 37 SI
- laboratorijska centrifuga DiaHem ID-Centrifuge 12S II
- jednokanalna viševolumska pipeta
- dispencer za fiziološku otopinu



Slika 6. Aparat Auto/Vue Innova za imunohematološko testiranje(Preuzeto s: <http://www.orthoclinical.com/en-be/about-us/newsroom>)

Pribor :

- zaštitne rukavice
- metalni stalci za držanje epruveta i stalci za držanje mikrokartica
- plastične ili staklene epruvete i pipete
- plastični nastavci za jednokanalnu viševolumsku pipetu
- bubrežnjak
- kontenjer za infektivni materijal
- povećalo
- aglutinoskop

Materijali:

- fiziološka otopina (0,9% - NaCl)
- destilirana voda
- NaOH
- Mikrokartice za imunohematološko ispitivanje krvi DDK
- Mikrotitar ploča
- Testni eritrociti
- Testni reagensi
- Aditivne otopine (11)

Opis aktivnosti :

Automatski sustav za imunohematološko testiranje Ortho Auto/Vue Innova se priprema i postavljaju se ladice s odgovarajućim mikrokarticama. Postavlja se mikrotitar ploča za suspenziju eritrocita i stalak s testnim eritrocitima u aparat.

Dnevne procesne kontrole koje se rade su :

- Kontrola reagensa i testnih stanica za određivanje ABO i Rh (D) krvnih grupa i preglednih testova pretraživanja (IAT) u automatskom sustavu Ortho Auto/Vue Innova. Ona se mora provoditi najmanje jednom dnevno i/ili obavezno kad se nova serija reagensi počinje koristiti.

Tablica 1. Testni uzorci za kontrolu

|            |                                         |
|------------|-----------------------------------------|
| KONTROLA 1 | 0-(neg.) uzorak krvi                    |
| KONTROLA 2 | AB+(poz.) uzorak krvi                   |
| KONTROLA 3 | Kontrolni reagens s anti-D protutijelom |

- Kontrola određivanja slabe Rh D grupe (D<sup>u</sup>) u IAT-u ručnom mikrometodom
- Kontrola određivanja Rh fenotipa, Kell antigena i ostalih eritrocitnih antigena

Nakon kontrola zadaju se imunohematološki profili i radi se vizualna kontrola i provjera rezultata.

Uzorcima novih DDK se određuje Rh fenotip i Kell antigen automatskim uređajem za imunohematološku dijagnostiku zadavanjem profila RH KEL. Još se određuje i Rh (D<sup>u</sup>) antiglobulinskim testom u mikrometodi.

Kod višestrukih DDK u uzorcima se određuje ili potvrđuje RH fenotip i Kell antigen ako kod prethodnih donacija nije upisan ili potvrđen u e-Delphyn-u.

Uzorcima Rh (D) neg. DDK koji u Rh fenotipu imaju C+ i/ili E+ određuje se Rh (D) antigen mikrometodom u IAT-u ručnom metodom i potrebno je obavezno upisati rezultate u e-Delphyn ako prethodno nisu upisani ili potvrđeni.

### **3.6. Određivanje slabog Rh D antigena indirektnim antiglobulinskim testom**

#### **3.6.1. Pribor i materijali**

- Oprema i resursi:
  - termostat na 37 °C
  - centrifuga za mikrokartice Ortho BioVue
  - automatske pipete
- Reagensi / serum
  - Anti-D BioClone Ortho monoklonal-poliklonal blend (IgM-klon MAD 2, IgM poliklonal)
  - Anti-D MonoGnost „MG“ BioGnost (IgM klon RUM-1, IgG-poliklonal)
  - Anti-D IgM+IgG Novaclone GAMMA, monoklonal blend (IgM klon 175-2, IgG klon D415 i IE4)
  - Anti-D IgM+IgG DiaClone
  - mikrokartica Ortho BioVue anti-IgG
  - uzorak ispitivane krvi koji se preferira sa antikoagulansom EDTA ili CPD (11)
- Pribor
  - staklene pipete
  - epruvete
  - stalci
  - plastični nastavci za automatske pipete
- Uzorak krvi ispitanika



### 3.6.2. Opis aktivnosti pri izvođenju testa

Rh (D) antigen se indirektnim antiglobulinskim testom određuje tako da se prvo mikrostupac kartice obilježava (prezime DDK i njegov barkod).

U stupac mikrokartice se dodaje :

- 50 µl BioLiss<sup>1</sup>,
- 10 µl 3-5 % suspenzije eritrocita ispitanika i
- 40 µl anti-Rh (D) reagensa<sup>2</sup>

Potrebno je resuspendirati laganim prelaženjem prstom po mikrokartici i zatim inkubirati u termostatu 20 minuta na 37 °C.

Mikrokartica se stavlja na centrifugiranje 5 minuta u centrifugi za Ortho BioVue kartice.

Nakon centrifugiranja očitava se aglutinacija golim okom.

Na isti način se određuje i Rh (D) negativna kontrola, samo se umjesto 40 µL anti-Rh (D) reagensa upotrebljava ista količina anti-Rh (D) negativne kontrole.

#### Stupnjevi aglutinacije u mikrokartici :

- 4+ → aglutinirani eritrociti čine uniformni sloj na vrhu mikrostupca
- 3+ → većina aglutiniranih eritrocita nalazi se na gornjoj polovici mikrostupca, bez eritrocita na samom dnu mikrostupca
- 2+ → aglutinirani eritrociti se vide uzduž cijelog mikrostupca, uz malo eritrocita na samom dnu mikrostupca
- 1+ → većina aglutiniranih eritrocita nalazi se na donjoj polovici mikrostupca, uz eritrocite na dnu mikrostupca

---

<sup>1</sup> Bio-LISS reagens je modificirana otopina niske ionske jakosti koja naknadnim dodavanjem mješavini eritrocita i seruma smanjuje ionsku jakost medija i omogućava kraću inkubaciju i/ili bolju osjetljivost testa. Služi za brže otkrivanje antitijela u IAT-u.

<sup>2</sup> Anti-D reagens (Anti-RH1) je anti-D humano (IgG) monoklonsko antitijelo (klon D7B8) koje služi za dokazivanje D antigena principom aglutinacije.

- w → mali broj aglutiniranih eritrocita vidljiv iznad sloja eritrocita na dnu mikrostupca, koji nema ravnu i glatku površinu
- mf → aglutinirani eritrociti se vide u gornjem dijelu mikrostupca, uz eritrocite na samom dnu mikrostupca
- 0 → svi eritrociti nalaze se na dnu mikrostupca, s glatkom i ravnom gornjom površinom

Tumačenje rezultata :

- ❖ **pozitivan rezultat** - aglutinacija u stupcu (mf, w, 1+, 2+, 3+, 4+), uz negativnu kontrolu
- ❖ **negativan rezultat** - nema aglutinacije, uz negativnu kontrolu



Slika 7. Prikaz stupnjeva aglutinacije u mikrokartici (Preuzeto s:  
<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/BloodGroupingReagent/UCM362133>)

### **3.7. Završna kontrola imunohematološkog testiranja i pohranjivanje obrađenih uzoraka DDK**

Imunohematološki nalazi su pisani zapisi u računalnom sustavu o rezultatima testiranja eritrocitnih krvno grupnih antigena uzoraka krvi DDK, rezultati testiranja pretraživanja uzoraka krvi DDK na nazočnost antieritrocitnih protutijela i rezultati određivanja antieritrocitnih aloprotutijela i/ili autoprotutijela uzoraka krvi DDK.

Kod novih DDK finalizaciju nalaza vrši osposobljeni med.lab.ing./lab.teh., a završni nalaz imunološkog testiranja potpisuje liječnik spec.transf.med., a kod višestrukih DDK med.lab.ing./ med.teh. vrši završnu kontrolu i potvrdu rezultata uz uvid liječnika spec.transf.med.

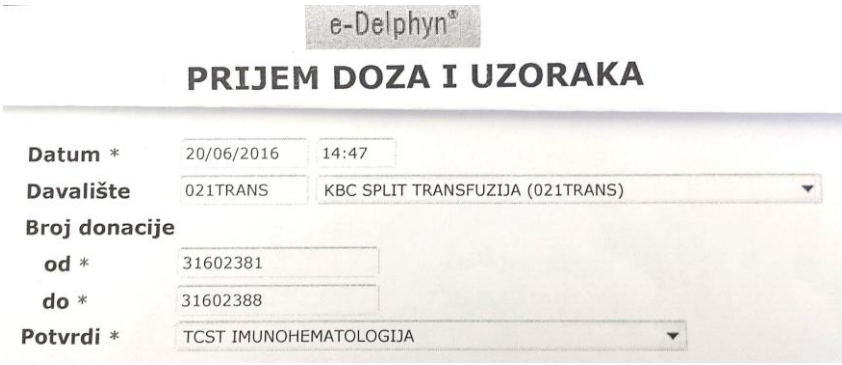
Uzorci krvi DDK nakon imunohematološke obrade (epruvete zatvorene plastičnim čepom) se pohranjuju u hladnjak za čuvanje uzoraka krvi na temperaturi od +4 °C u stalcima gdje je obilježen datum obrade. Osam dana se uzorci pohranjuju, a osmi dan nakon pohranjivanja uzorci se odlažu u plastične vreće za infektivni materijal i s njima se postupa sukladno Zakonu o odlaganju infektivnog materijala.

## 4. RASPRAVA

### 4.1. Prikaz slučaja

Dana 20/06/2016 u transfuzijski centar zaprimljeni su uzorci tj. doze dobrovoljnih darivatelja krvi s Pratećim listom doza krvi i uzoraka. Broj zaprimljenih ID obilježenih uzoraka i broj kartona DDK je identičan s brojem navedenim na Pratećem listu doza krvi i uzoraka krvi DDK.

Prva od osam donacija je bila pod brojem 31602381. Napravljen je prijem doza i uzoraka u programu e-Delphyn gdje su ispunjeni potrebni podaci.



The screenshot shows the 'e-Delphyn' program interface with the title 'PRIJEM DOZA I UZORAKA'. The form contains the following fields:

| Field         | Value                                     |
|---------------|-------------------------------------------|
| Datum *       | 20/06/2016 14:47                          |
| Davalište     | 021TRANS KBC SPLIT TRANSFUZIJA (021TRANS) |
| Broj donacije |                                           |
| od *          | 31602381                                  |
| do *          | 31602388                                  |
| Potvrdi *     | TCST IMUNOHEMATOLOGIJA                    |

Slika 8. Prijem doza i uzoraka u programu e-Delphyn (snimljeno u laboratoriju Centra za transfuzijsku medicinu KBC Split)

Uzorci se zatim stavljaju u rad na aparatu AutoVue.

Kod višestrukih dobrovoljnih darivatelja krvi radi se kontrola krvne grupe i fenotip za one darivatelje kojima nije određen. Rezultate smo dobili na radnoj listi.

| Laboratory<br>KBC SPLIT - |           |              | Worklist Report |     |       |      | Area: Sel. lines<br>Sorting: None<br>Filters: None |      |       |
|---------------------------|-----------|--------------|-----------------|-----|-------|------|----------------------------------------------------|------|-------|
| Status                    | Sample ID | Profile Name | ABO             | Rh  | Pheno | Kell | ABScr                                              | Poly | Ident |
| 😊                         | 31602381  | DDK kon      | B               | POS |       |      |                                                    |      |       |
| 😊                         | 31602382  | DDK kon      | O               | NEG |       |      |                                                    |      |       |
| 😊                         | 31602383  | DDK kon      | B               | POS |       |      |                                                    |      |       |
| 😊                         | 31602384  | DDK kon      | O               | POS |       |      |                                                    |      |       |
| 😊                         | 31602385  | DDK kon      | O               | NEG |       |      |                                                    |      |       |
| 😊                         | 31602386  | DDK kon      | B               | POS |       |      |                                                    |      |       |
| 😊                         | 31602387  | DDK kon      | B               | POS |       |      |                                                    |      |       |
| 😊                         | 31602388  | DDK kon      | A               | POS |       |      |                                                    |      |       |

Slika 9. Prikaz rezultata krvnih grupa na radnoj listi (snimljeno u laboratoriju Centra za transfuzijsku medicinu KBC Split)

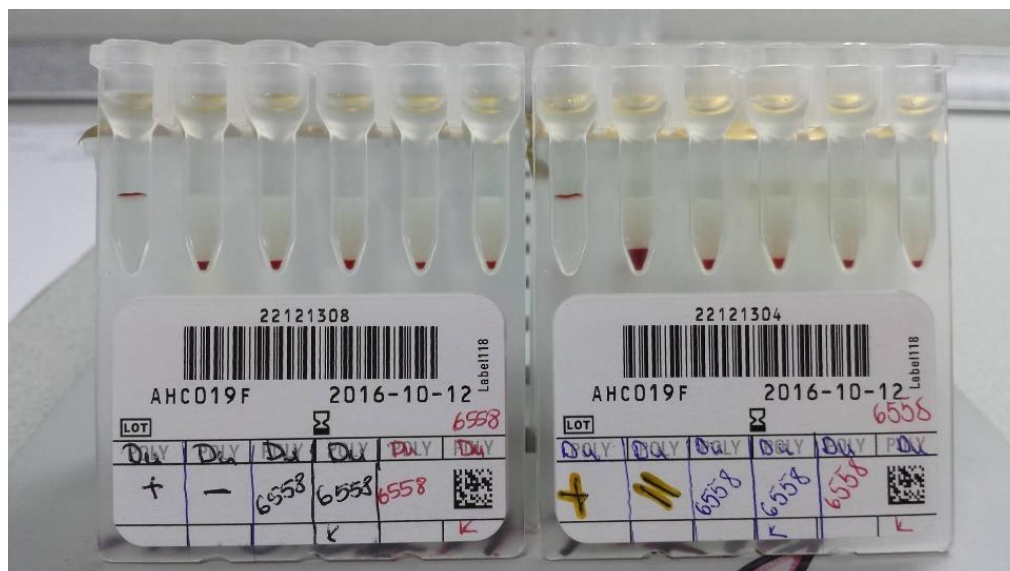
Jedan uzorak je bio od novog darivatelja krvi. Njemu se određuje ABODD, IAT<sub>3</sub> i Rh fenotip iz nastavka donacijske vrećice te se radi kontrola.

| NAZIV PRETRAGE                  | REZULTAT             |
|---------------------------------|----------------------|
| ABO krvna grupa                 | <b>O</b>             |
| Rh(D) krvna grupa               | <b>- (negativan)</b> |
| HBsAg probirni test             | NEG.                 |
| Hepatitis C-At probirni test    | NEG.                 |
| HIV Ag/At probirni test         | NEG.                 |
| Sifilis probirni test           | NEG.                 |
| NAT probirni test HBV/HCV/HIV-1 | NEG.                 |
| NAT zaključni test              | NEG.                 |

Slika 10. Rezultati krvne grupe novog darivatelja krvi (snimljeno u laboratoriju Centra za transfuzijsku medicinu KBC Split)

Darivatelj je krvne grupe 0- i zato je bilo potrebno još dodatno analizirati D<sup>u</sup> koji se određuje kod svih darivatelja krvi koji su Rh negativni.

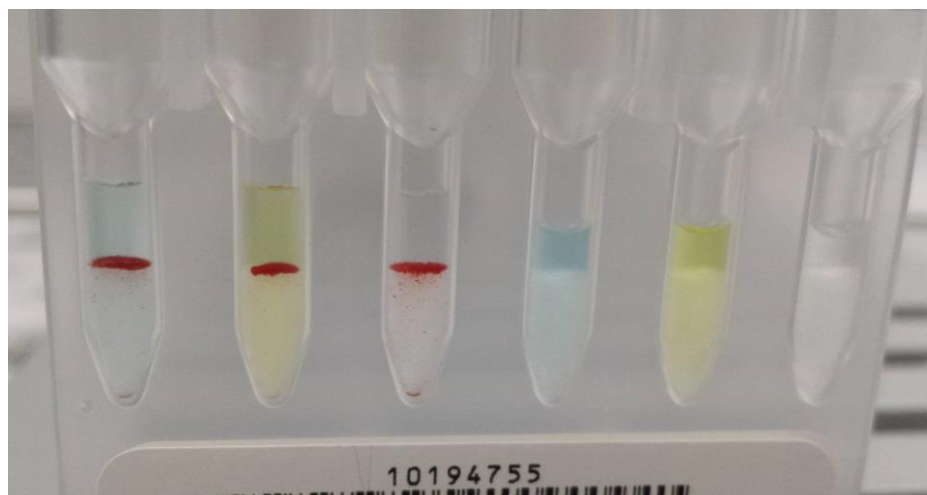
D<sup>u</sup> je određen mikrometodom u IAT-u i iz mikrokartice smo na principu aglutinacije očitali da je D<sup>u</sup> darivatelja negativan i on se sada vodi se kao Rh negativan darivatelj krvne grupe 0.



Slika 11. Rezultati D<sup>u</sup> testa ispitanika u mikrokartici (snimljeno u laboratoriju Centra za transfuzijsku medicinu KBC Split)

Drugi prikaz slučaja je prikaz višestrukog darivatelja krvi kojem se radi kontrola ABO i Rh (D) krvne grupe mikrometodom.

Dobiveni rezultati ukazuju da je darivatelj AB krvne grupe te da ima slabiju ekspresiju D antigena jer je vidljivo rasipanje u mikrostupcu.

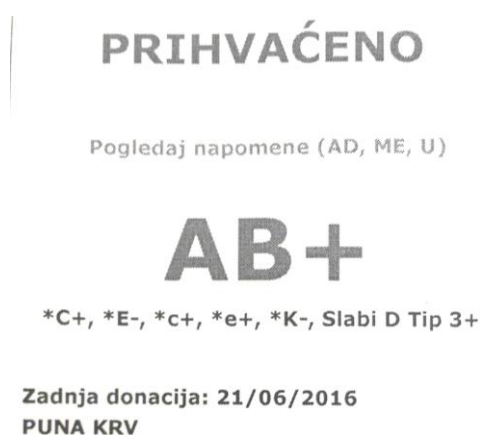


Slika 12. Rezultati D<sup>u</sup> pozitivnog darivatelja krvne grupe AB (snimljeno u laboratoriju Centra za transfuzijsku medicinu KBC Split)

Radi slabije ekspresije D antigena zabilježava se kao Rh (D) pozitivan darivatelj.

Uzorak krvi se šalje na dodatna testiranja (genotipizaciju) u Zagreb da bi se identificirao tip D antigena. Genotipizacijom se otkriva da ima slabi D tip 3.

Zbog D<sup>u</sup> pozitivnog testa (slabi D tip 3) on je i kao darivatelj i kao primatelj krvi Rh (D) pozitivan.



Slika 13. Rezultati genotipizacije darivatelja (snimljeno u laboratoriju Centra za transfuzijsku medicinu KBC Split)

## 5. ZAKLJUČAK

Antigen D iz Rh sustava je klinički najznačajniji antigen zbog izrazito jake imunogenosti. Može potaknuti jaki imuni odgovor i stvaranje anti-D protutijela kod pacijenata koji prime neodgovarajuću dozu krv. Zbog toga je za darivatelje važno da se eritrociti koji mogu imunizirati Rh (D) negativnog primatelja stvaranjem anti-D označe Rh (D) pozitivnim. U 20-30 % Rh (D) negativnih pacijenata, koji prime veliku količinu Rh (D) pozitivne krvi, stvaraju se anti-D protutijela. Kod dobrovoljnih darivatelja krvi potrebno je otkriti da li postoji slabija ekspresija D antigena kako bi se spriječilo stvaranje anti-D protutijela, tj. Rh imunizacija kod Rh negativnih primatelja krvi. Rh (D) antigen se određuje u mikrokartici iz koje se očitava jačina serološke reakcije koja je važna za interpretaciju rezultata kod slabih varijanti D antigena. Darivateljima, koje je aparat zabilježio kao Rh negativne i kojima se nije mogla očitati vizualno serološka reakcija, se određuje D<sup>u</sup> antigen mikrometodom u IAT-u. Ako je rezultat negativan, tj. nema aglutinacije, darivatelj se smatra Rh (D) negativnim i kao takav se označava na nalazu. U slučaju pozitivnog rezultata dokazuje se slabija izraženost D antigena. Slabo izražen D antigen imaju i darivatelji koji u mikrokartici imaju vizualno pozitivnu (do +1 i +2) serološku reakciju te su na aparatu pozitivni. Svi darivatelji koji imaju slabo izražen D antigen su na nalazu napisani kao Rh (D<sup>u</sup>) pozitivni. Potrebno je napomenuti da su DDK sa slabo izraženim D antigenom kao primatelji Rh (D) negativni. Ako je molekularnom metodom određen slabi D (tip 1, 2 ili 3), darivatelj krvi se smatra kao primatelj Rh (D) pozitivan. Darivatelji koje je aparat odredio kao pozitivne i koji imaju pozitivnu od 2+ do 4+ serološku reakciju na nalazu su zabilježeni kao Rh (D) pozitivni darivatelji krvi.

Osobe sa slabim D antigenom su kao donori Rh (D) pozitivni, a kao primatelji Rh (D) negativni, dok su osobe sa parcijalnim D i kao donori i kao primatelji Rh (D) negativni. Zbog toga je iznimno važno pravilno izvođenje D<sup>u</sup> testa da bi se mogla otkriti točna D<sup>u</sup> varijanta te spriječiti Rh imunizacija koja bi mogla ozbiljno naštetiti primatelju krvi.



## 6. LITERATURA

1. Grgičević, Damir; Vuk, Tomislav. *Imunohematologija i transfuzijska medicina*, Zagreb: Medicinska naklada, 2000.
2. Grgičević D i sur. *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi* : Medicinska naklada, 2006.
3. Daniels G. *Human Blood Groups*; 3rd edition ; Willey-Blackwell ; 2013.
4. Balen S. *Osnove transfuzijske medicine*, Medicinski fakultet Osijek 2014, II izdanje.
5. Golubić-Čepulić B., i sur.: *Klinička transfuziologija, Prijetransfuzijska ispitivanja*, KBC Zagreb, 2001.
6. Labar B., Hauptmann E. i sur. : *Hematologija*, Zagreb, Školska knjiga, 2007.
7. M. Balija, A. Hećimović, I. Jukić, *Transfuziološki vjesnik*, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, broj 54/2014-2015
8. Juan Gu and others : *Analysis of density and epitopes of D antigen on the surface of erythrocytes from DEL phenotypic individuals carrying the RHD1227A allele*; Blood Transfus. 2014 Apr; 12(2): 244–249.
9. Susan T.Johnson : *Partial D and Weak D - Picking up the Rhesus Pieces* ; Heart of America Association of Blood Banks ; April 24<sup>th</sup> , 2012.
10. Franz F. Wagner : *RHD PCR of D-Negative Blood Donors*; Transfus Med Hemother. 2013 Jun; 40(3): 172–181.
11. Vengelen-Tyler et al.: *Technical Manual*, 14<sup>th</sup> edition, American Association of Blood Banks, Bethesda MA, USA, 1999.
12. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu: *Preporuke za imunohematološko testiranje darivatelja krvi u transfuzijskoj djelatnosti RH* ; 2016.

## 7. SAŽETAK

### Uvod

Dobrovoljni darivatelji krvi (DDK) su osobe koje na principima dobrovoljnosti, solidarnosti, besplatnosti i anonimnosti daruju krv, plazmu ili stanične dijelove. Krv se ne može proizvesti na umjetan način i zato su bitni darivatelji kao jedini izvor krvi. Iz krvi darivatelja se rade razni krvni pripravci koji moraju biti sigurni za liječenje pacijenata. Zbog toga se svi krvni pripravci i doze krvi moraju testirati na uzročnike krvlju prenosivih bolesti. Određuju se još ABO i Rh (D) krvne grupe i prisutnost iregularnih antieritrocitnih protutijela.

Krvne grupe su nasljedne karakteristike koje je bitno odrediti u transfuzijskoj medicini. ABO sustav krvnih grupa je najvažniji i u njemu spadaju četiri krvne grupe : A, B, 0 i AB. Rh sustav je najveći, a najvažniji antigen u njemu je antigen D. Osobe koje posjeduju antigen D su Rh (D) pozitivne, a one koje ne posjeduju Rh (D) negativne. Osobe koje su Rh (D) negativne mogu imati slabiju ekspresiju antigena D i zato se određuje D<sup>u</sup> da bi se utvrdilo da li je riječ o slabom D antigenu.

### Cilj rada

Cilj rada je ukazati na važnost pravilnog izvođenja i osjetljivosti testa D<sup>u</sup> varijante kod dobrovoljnih darivatelja krvi.

### Izvori podataka i metode

Pri svakom davanju krvi i krvnih pripravaka, iz uzorka krvi darivatelja se obavezno radi imunohematološko testiranje. U laboratoriju trebaju postojati radne upute i preporuke koje moraju biti pri ruci svim djelatnicima koji rade imunohematološka testiranja. Uzorci za imunohematološko testiranje moraju se uzeti u epruvete sa antikoagulantnom otopinom EDTA. Uzorci krvi mogu biti od novih i višestrukih darivatelja krvi. Novim DDK se obavezno određuje ABO i Rh (D) krvna grupa, Rh fenotip, Kell antigen i IAT. Višestrukim DDK se radi kontrola ABO i Rh (D) krvne grupe, a IAT, Rh fenotip i Kell antigen se određuju samo ako rezultati nisu zabilježeni. Darivateljima koji su Rh (D) negativne krvne grupe se određuje slabi D antigen (D<sup>u</sup> test). Slabi D antigen se određuje

IAT-om u mikrokartici. Rezultati se očitavaju na principu aglutinacije i upisuju se u program e-Delphyn.

### **Rasprava**

U raspravi su prikazani slučajevi D<sup>u</sup> pozitivnog i D<sup>u</sup> negativnog darivatelja.

### **Zaključak**

D antigen je jako imunogeničan te može potaknuti stvaranje protutijela i jaki imuni odgovor. Zbog toga je izrazito važno kod DDK otkriti ako postoji slabija ekspresija D antigena i razlučiti radi li se o slabom ili parcijalnom D. Pravilnim izvođenjem i točnom interpretacijom rezultata D<sup>u</sup> testa sprječava se Rh imunizacija kod Rh negativnih primatelja.

## **8. SUMMARY**

### **Introduction**

Blood donors are individuals who give blood, plasma and other blood components voluntarily, anonymously, without any compensation and purely as an act of solidarity. Blood cannot be produced artificially, so therefore blood donors are the sole source of blood. Various blood products may be produced from donated blood and must be safe for curing patients. That is why all blood products and blood doses must be tested for causes of transmitted diseases. ABO and Rh (D) blood type are also determined and the presence of irregular anti erythrocyte antibodies.

Blood types have hereditary characteristics which are important to define in transfusion medicine. ABO system of blood types is the most important and it is composed of four blood types: A, B, O and AB. The Rh system is the largest and the antigen that is most important is antigen D. Individuals who have antigen D are Rh (D) positive and those who do not possess it are Rh (D) negative. Rh (D) negative individuals may have a weaker expression of antigen D and therefore D<sup>u</sup> must be defined in order to determine if it is due to weak D antigen.

### **Objective**

The objective of this thesis is to show the importance of conducting the D<sup>u</sup> variant test properly and the sensitivity of this test in blood donors.

### **Data sources and methods**

Mandatory immunohematology testing is performed before each donation of blood and blood products. Medical instructions and recommendations must exist in the laboratory and be available to all medical staff who conduct immunohematology testing. Samples for immunohematology testing must be conducted in test tubes which have anticoagulant EDTA solution. Blood samples may be from new or repeat donors. With new blood donors it is mandatory to determine ABO and Rh (D) blood type, Rh phenotype, Kell antigen and IAT. Repeat blood donors are tested for ABO and Rh (D) blood type. IAT, Rh phenotype and Kell antigen are only tested if the results are not

recorded. For donors who are Rh (D) negative, weak antigen (D<sup>u</sup> test) is determined. Weak D antigen is determined in a microcard by IAT. Results are based on the principle of agglutination and are recorded in the e-Delphyn program.

### **Discussion**

In this discussion the cases of D<sup>u</sup> positive and D<sup>u</sup> negative blood donors are shown.

### **Conclusion**

D antigen is highly immunogenic and may elicit the production of antibodies and a strong immune response. Because of this, it is extremely important to detect the existence of weak D antigen expression in blood donors and resolve whether it is a weak or partial D. Conducting the D<sup>u</sup> test properly and interpreting the results correctly prevents Rh immunization in Rh negative recipients.

## 9. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI:

**Ime i prezime:** Katica Gavranić

**Datum rođenja:** 06. listopada 1994. godine

**Mjesto rođenja:** Windsor, Ontario, Kanada

**Adresa stanovanja:** Ul. 5 br. 15/1 ; 20271 Blato, Korčula

**Kontakt (broj mobitela):** 091/528 6013

**E-mail :** katicagavranic06@gmail.com

### OBRAZOVANJE :

2001. – 2009. Osnovna škola Blato

2009. – 2013. Srednja škola Blato – opća gimnazija

2013. – 2016. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu

Smjer : Medicinsko laboratorijska dijagnostika

### POSEBNA ZNANJA, VJEŠTINE I POHAĐANI SEMINARI :

- Poznavanje Microsoft Office paketa i korištenje interneta
- Strani jezici : aktivno poznavanje engleskog jezika u govoru i pismu  
pasivno poznavanje talijanskog jezika u govoru i pismu  
pasivno poznavanje španjolskog jezika u govoru
- Vozačka dozvola B kategorije

**RADNO ISKUSTVO :**

2015. – 2016. ispomoć u Müller trgovini preko student servisa

2013. sezonski posao kao konobarica u Fast food Porat, mjesto Prižba na otoku Korčuli

U sklopu obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva (OPG) Nikica Gavranić radim sve pomoćne poslove vezane za maslinarstvo, vinogradarstvo i povrtlarstvo.

U ljetnoj sezoni radim na održavanju šest apartmana koje uključuje poslove pospremanja i čišćenja.