

# Pravilna interpretacija rezultata krvne grupe i direktnog antiglobulinskog testa kod neonatološke djece

---

Tarabene, Maja

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:617706>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Maja Tarabene**

**PRAVILNA INTERPRETACIJA REZULTATA KRVNE  
GRUPE I DIREKTOG ANTIGLOBULINSKOG TESTA  
KOD NEONATOLOŠKE DJECE**

**Završni rad**

Split, 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Maja Tarabene**

**PRAVILNA INTERPRETACIJA REZULTATA KRVNE  
GRUPE I DIREKTOG ANTIGLOBULINSKOG TESTA  
KOD NEONATOLOŠKE DJECE**

**CORRECT INTERPRETATION OF BLOOD TYPE AND  
DIRECT ANTIGLOBULIN TEST IN NEWBORN**

**Završni rad/ Bachelor's thesis**

Mentor:

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

Split, 2016.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Povijest transfuzijskog liječenja i razvoja krvnih grupa.....	1
1.2. Eritrocitne krvne grupe i ABO sustav.....	2
1.3. Direktni i indirektni antiglobulinski test.....	4
1.4. Trudnoća i određivanje krvne grupe kod trudnica.....	5
<b>2. CILJ RADA</b> .....	7
<b>3. IZVORI PODATAKA I METODE</b> .....	8
3.1. Odgovornosti vezane uz provođenje, interpretaciju i točnost imunohematološkog testiranja.....	8
3.2. Definicija i izvori.....	8
3.2.1. ABO antigeni.....	8
3.2.2. Regularna protutijela.....	8
3.2.3. RhD antigen.....	9
3.2.4. Indirektni antiglobulinski test (IAT).....	10
3.2.5. Direktni antiglobulinski test (DAT).....	10
3.2.6. Određivanje eritrocitnih antigena (Rh fenotipa i Kell antigena).....	10
3.2.7. Testovi podudarnosti (križne reakcije).....	11
3.2.8. Titar izohemaglutinina.....	11
3.2.9. Elucija antieritrocitnih protutijela.....	12
3.3. Pribor i materijali.....	12
3.3.1. Uzorak.....	12

3.3.2. Reagensi.....	13
3.3.3. Oprema i instrumenti.....	15
3.3.4. Pribor.....	18
3.4. Opis aktivnosti.....	18
3.4.1. Zaprimanje i priprema uzorka za obradu.....	18
3.4.2. Imunohematološko testiranje novorođenčadi RhD negativnih roditelja.....	19
3.4.3. Imunohematološko testiranje novorođenčadi i dojenčadi do 4 mj.....	20
3.4.4. Ispitivanje ostalih eritrocitnih antigena, dojenčadi starije od 4 mj.....	22
3.4.5. Testovi podudarnosti za novorođenčad i dojenčad.....	23
3.5. Upozorenja u radu s mikrokarticama.....	24
3.6. Zapisi.....	25
<b>4. RASPRAVA.....</b>	<b>26</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>27</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>28</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>30</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>32</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>34</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Povijest transfuzijskog liječenja i razvoja krvnih grupa <sup>(1)</sup>

Početak sedamnaestog stoljeća stvoreni su preduvjeti za transfuzijsko liječenje otkrićem načina srčanog rada i opisom krvnog optoka, za što je zaslužan W. Harvey. Početkom dvadesetog stoljeća transfuzijsko se liječenje zasnivalo na transfuzijama životinjske i vlastite ili tuđe krvi. Zbog nepoznavanja krvnih grupa te poslije transfuzijskih reakcija i komplikacija, smrt liječenog bolesnika bila je vrlo česta. Važnije godine iz povijesti transfuzijske medicine prikazane su u tablici 1.

**Tablica 1. Važne godine u povijesti transfuzijske medicine (Grgičević i Vuk,2000.)**

Godina	Autori i otkriće
1628.	Harvey W, Otkriće funkcije krvotoka i rada srca objavljeno u »De Motu Cordis«
1667.	Dennis J, Heterologne transfuzije krvi
1818.	Blundell J, Autologne transfuzije krvi u liječenju postpartalnih krvarenja
1900.	Landsteiner K, Otkriće A,B,O krvnih grupa
1902.	Sturli i Decastello, Otkriće četvrte krvne grupe AB
1908.	Ottenberg R, Transfuzije krvi prema ABO krvnim grupama
1914.	Hustin A, Agote L, Lewisohn R, Konzerviranje krvi s natrijevim citratom
1923.	Prva transfuzija u Hrvatskoj primijenjena je u Klinici za ženske bolesti i porode u Zagrebu
1940.	Landsteiner K, Wiener AS, Rh krvne grupe
1945.	Coombs RRA, Mourant AE, Race RR, Antiglobulinski test (Coombov test)
1952.	Walter CW, Plastične vrećice i sistemi za jednokratnu upotrebu
1966.	Freireich EJ, Judson G, Levine RH, Stanični separator za odvajanje plazme i krvnih stanica

Posebno važno otkriće na kojem počiva ovaj rad je otkriće krvnih grupa, koje je 1900. godine otkrio K. Landsteiner kada je pokazao da serum nekih osoba hemolizira ili aglutinira eritrocite drugih, ali ne i svih osoba. Otkrio je krvne grupe A, B i C koje su danas poznate kao A, B i O.

Ovaj rad posvećen je imunohematološkom testiranju neonatološke djece pa ćemo se u nastavku rada zadržati upravo na krvnim grupama i važnosti određivanja direktnog Coombsovog testa u toj populaciji.

## **1.2. Eritrocitne krvne grupe i ABO sustav**

Eritrocitna membrana je polupropusni lipidni dvosloj kojeg čine eritrocitni antigeni. Eritrocitni antigeni su građeni od proteina, glikoproteina, polisaharida, glikolipida i lipoproteina. Svaki taj antigen je definiran specifičnim protutijelom s kojim reagira. U posljednjih 90 godina otkriveno je oko 650 eritrocitnih antigena, a ta se brojka svakodnevno povećava napretkom medicine.

Eritrocitni antigeni imaju važne biološke funkcije za ljudski organizam:

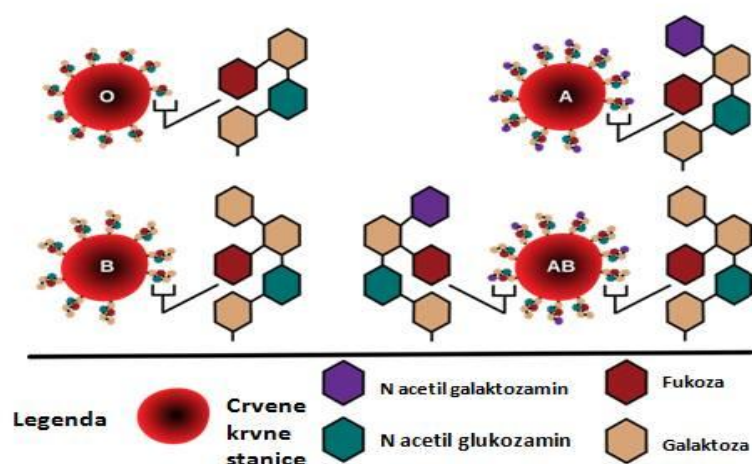
- služe kao transportni proteini za različite supstance
- vezna su mjesta za različite citokine
- sudjeluju u regulaciji aktivacije komplementa
- neki antigeni sudjeluju u adheziji stanica na limfocite T i B

Na eritrocitnoj membrani novorođenčeta nisu u potpunosti izraženi svi antigeni koji su prisutni kod odrasle osobe. Razvijenost im ovisi o njihovoj fizikalno-kemijskoj strukturi. Antigeni čiju specifičnost određuju šećeri (ABH) nisu dobro razvijeni neposredno nakon rođenja dok su dobro izraženi antigeni građeni od proteina (Rh, Kell, Kidd, Duffy...)

Antieritrocitna protutijela su imunoglobulini koji pripadaju klasama IgG, IgM ili IgA i specifično reagiraju s antigenima na površini eritrocita. Ta protutijela mogu biti prirodna ili imuna, osim toga mogu biti klinički značajna, tj. uzrokovati promjene kod

pacijenta, ili mogu biti bezopasna. Neposredno nakon rođenja, u serumu novorođenčeta se ne nalaze njegova vlastita anti-A, anti-B ili druga antieritrocitna protutijela već se samo mogu dokazati majčina protutijela koja su prešla posteljicu i dospjela u djetetov krvotok. Takva protutijela koja mogu prijeći posteljičnu barijeru su imunoglobulini klase IgG, te se samo oni nalaze u novorođenčetoj krvi. Tek nakon 3 do 6 mjeseci djetetova života u krvotoku se pouzdano mogu dokazati njegova vlastita protutijela iz ABO sustava krvnih grupa. To je upravo razlog zašto se u novorođenčeta ABO krvne grupe dokazuju samo na eritrocitima. Taj test nazivamo hemotest i o njemu će biti riječi kasnije.<sup>(1)</sup>

ABO sustav je prvi otkriveni sustav krvnih grupa i ujedno najvažniji krvnogrupalni sustav u transfuzijskoj medicini. Antigeni koji pripadaju tom sustavu ne nalaze se samo na eritrocitima nego ih nalazimo i na drugim stanicama i u većini tjelesnih tekućina. U ABO sustavu postoje dva antigena: A i B antigeni. Oni nastaju djelovanjem dvaju sustava, a to su sustavi gena ABO i Hh. Pod utjecajem gena H nastaje ugljikohidratni lanac koji predstavlja antigen H. Na taj antigen H se vežu šećeri N-acetilgalaktozamin, koji karakterizira krvnu grupu A, i D-galaktoza koja karakterizira krvnu grupu B. U slučaju krvne grupe AB nailazimo na oba navedena šećera na kraju ugljikohidratnog lanca eritrocita. O gen ne proizvodi funkcionalni enzim koji može katalizirati vezanje šećera pa H antigen ostaje nepromijenjen (Slika 1).<sup>(2)</sup>



Slika 1. Prikaz ABO antigena

(Preuzeto s: [https://en.wikipedia.org/wiki/ABO\\_blood\\_group\\_system](https://en.wikipedia.org/wiki/ABO_blood_group_system))



Krvne grupe se nasljeđuju prema Mendelovom zakonu, a sintezu određuje jedan gen ili kompleks više usko povezanih homolognih gena. Geni jednog sustava nasljeđuju se neovisno o genima drugih krvnih grupa. A i B aleli su kodominantni dok je O alel recesivan.<sup>(2)</sup>

**Tablica 2. Antigeni i protutijela u ABO sustavu krvnih grupa (Grgičević i Vuk, 2000.)**

<b>Krvna grupa</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>AB</b>	<b>O</b>
<b>Antigeni na eritrocitima</b>	A	B	A,B	--
<b>Antitijela u plazmi</b>	anti-B	anti-A	--	anti-A, anti-B
<b>Genotip</b>	AA ili AO	BB ili BO	AB	OO
<b>Učestalost</b>	42%	18%	6%	34%

U serumu osoba A, B i O uvijek su prisutna anti-A i/ili anti-B protutijela. U osoba krvne grupe AB u serumu nema ni anti-A ni anti-B protutijela (Tablica 2.).

### **1.3. Direktni i indirektni antiglobulinski test**

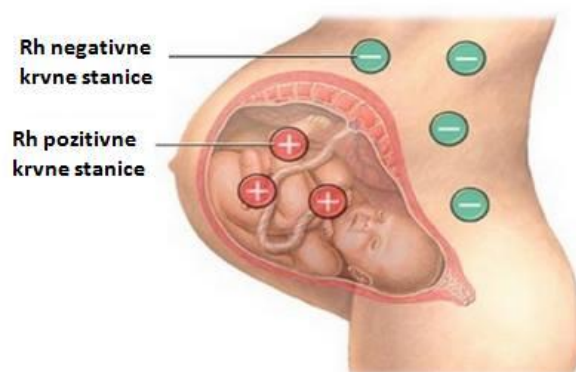
Direktnim antiglobulinskim testom dokazujemo protutijela ili komplement vezan na eritrocite *in vivo*.<sup>(1)</sup> Dokazana protutijela ili komplement predstavljaju antigen za antihumani globulin. Antihumani globulin, poznat kao i Coombsov reagens, koristi se za direktni i indirektni Coombsov test. Proizvodi se injektiranjem humanog globulina u životinje čime se generira stvaranje poliklonalnih protutijela specifičnih za humane imunoglobuline.<sup>(3)</sup>

Indirektni Coombsov test se koristi kod prenatalnog testiranja trudnica za detekciju reakcije slobodnih protutijela ili komplementa s test eritrocitima *in vitro*. Koriste se eritrociti krvne grupe O na kojima se nalaze antigeni koji uzrokuju aloimunizaciju.<sup>(4)</sup>

#### 1.4. Trudnoća i određivanje krvne grupe kod trudnica

Trudnoća je stanje pri kojem se unutar tijela nosi fetus, od začeća do poroda. Dijeli se na tri mjesečna razdoblja (40 tjedana). Začeće je početak trudnoće, trenutak kada spermij oplodi jajnu stanicu. Oplođena jajna stanica ponavljano se dijeli dok putuje niz jajovod do maternice. Isprva je zigota čvrsta nakupina stanica, zatim postaje šuplja loptica stanica nazvana blastocista. Unutar maternice, blastocista se ugnježđuje u endometrij, gdje se razvija u embrij i placentu. Krv embrija u resicama, koje stvara placenta, odvojena je od majčine krvi, koja ispunjava prostor između resica, tankom opnom. Na taj se način može vršiti izmjena tvari između krvi majke i embrija. Embrij pliva u tekućini koja se nalazi unutar amnijske vreće. Ta tekućina predstavlja prostor unutar kojeg embrij može nesputano rasti te ga štiti od ozljeda.

Komplikacija trudnoće koja je povezana sa krvnim grupama je Rh inkompatibilnost, koja može dovesti do hemolitičke bolesti novorođenčeta. Ta se bolest može razviti samo onda kada majka čija je krv Rh negativna, i otac, čija je krv Rh pozitivna, imaju fetus čija je krvna grupa pozitivna te majka stvara protutijela protiv krvi fetusa (Slika 2.).<sup>(5)</sup>



Slika 2. Rh negativna majka i Rh pozitivno dijete  
(Preuzeto s: <http://www.mamaibeba.rs/trudnoca-i-porodjaj.html?start=35>)

Ako je trudnica Rh negativna svaka 2 mjeseca se provjerava prisutnost protutijela na krv fetusa. U slučaju Rh pozitivne majke kontrola se vrši na početku i na kraju trudnoće.

Krv majke i djeteta može doći u dodir tijekom poroda, uzrokujući stvaranje protutijela na krv fetusa.

Zbog toga se, kao mjera predostrožnosti Rh protutijela u obliku Rh<sub>0</sub>(D) imunoglobulina, daju injekcijom majci koja ima Rh negativnu krv unutar 72 sata po porodu djeteta koje ima Rh pozitivnu krv u slučaju negativnog testa na iregularna protutijela.<sup>(6)</sup>

## **2. CILJ RADA**

Cilj ovog rada je ukazati na važnost pravilnog izvođenja i interpretacije imunohematološkog testiranja neonatološke djece s ciljem sprječavanja ABO i RhD imunizacija.

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

### **3.1. Odgovornosti vezane uz provođenje, interpretaciju i točnost imunohepatološkog testiranja**

Testiranje se provodi na novorođenčadi od 0-28 dana, dojenčadi od 28 dana do 4 mjeseca života te na dojenčadi od 4 mjeseca života do 1 godine.

Svi postupci određivanja, način provođenja osiguranja i kontrole kvalitete testiranja, vođenje dokumentacije i zapisa moraju biti detaljno opisani u slijedu postupaka, radnim uputama i/ili standardnim operativnim postupcima.

Liječnik voditelj Odsjeka za imunohepatologiju odgovoran je za pouzdanost postupaka te uspostavu tehnike rada.<sup>(6)</sup>

### **3.2. Definicija i izvori**

#### **3.2.1. ABO antigeni novorođenčadi**

ABO antigeni su ugljikohidratni lanci koji su u vrijeme poroda slabije razvijeni jer imaju manji broj antigenih mjesta. Potpuno se razvijaju u periodu od druge do četvrte godine života. Upravo iz tog razloga u određivanju ABO krvne grupe novorođenčadi i dojenčadi do četiri mjeseca života u detekciji antigena koristimo osjetljive metode- mikrohemaglutinaciju i izvodi se samo hemotest.<sup>(6)</sup> Hemotestom se dokazuju antigeni na eritrocitima.<sup>(1)</sup>

#### **3.2.2. Regularna protutijela**

Regularna protutijela, izohemaglutinini (anti-A, anti-B i anti-A,B) obično se detektiraju u serumu i plazmi nakon četiri do šest mjeseci života. Pripadaju imunoglobulin M (IgM) tipu protutijela. IgM je primarno protutijelo nastalo iz B limfocita, tip bijelih krvnih

stanica, koji igraju značajnu ulogu u primarnoj imunosti. Formiraju polimerne lance koji su povezani kovalentno disulfidnim vezama. Primarno mjesto nastanka je slezena.<sup>(7)</sup>

Nerijetko u eritrotestu novorođenčeta detektiramo regularna protutijela koja su uglavnom majčinog podrijetla stoga test ne smatramo valjanim do četvrtog mjeseca života.

ABO krvna grupa dojenčadi od četiri mjeseca života do godine dana određuje se na isti način kao i kod odraslih, izvodi se eritrotest i hemotest.<sup>(6)</sup>

### **3.2.3. RhD antigen**

RhD antigen je transmembranski protein čija je struktura nalik ionskim kanalima.<sup>(8)</sup> Dvanaest puta prolazi kroz membranu i ima najmanje 30 epitopa. U vrijeme poroda je u potpunosti razvijen. Broj antigenih mjesta na eritrocitu varira, a kreće se u rasponu od 20-tak do 200 000. Zbog izrazite varijabilnosti u izražajnosti broja antigenih mjesta i epitopa pri određivanju RhD antigena se koriste reagensi koji sadrže različite klonove anti-Rh(D) protutijela, i to najmanje dva. Rh(D) antigen je kod 1-2% osoba, uključujući i novorođenčad, slabije kvantitativno i kvalitativno izražen te nakon inkubacije eritrocita s anti-Rh(D) reagensom na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta ne pokazuju direktnu aglutinaciju. Za neke Rh(D) pozitivne eritrocite je potrebna produžena inkubacija s anti-Rh(D) reagensom, a neki se prikazuju pozitivni nakon dodavanja anti humanog globulina (AHG) pri čemu se obavezno koristi neki od anti-Rh(D) reagensa koji imaju mogućnost detekcije VI kategorije parcijalnog Rh(D) antigena. Kod slabije izraženog Rh(D) antigena protutijela razreda IgG, koja oblažu eritrocite ispitanika, ne uzrokuju izravnu aglutinaciju. Vezanje i aglutinaciju obloženih eritrocita omogućuje anti-humani globulinski reagens u mikrostupcu te se ovom metodom mogu otkriti i vrlo male količine Rh(D) antigena na eritrocitima što je izrazito važno u procjeni indiciranosti Rh(D) imunoprofilakse u trudnica koje su Rh(D) antigen negativne.<sup>(6)</sup>

### **3.2.4. Indirektni antiglobulinski test (IAT)**

Budući da je imunološki sustav djeteta nezreo i neće stvoriti antieritrocitna aprotutijela nakon transfuzijskog liječenja, nije potrebno raditi indirektni antiglobulinski test u novorođenčadi i dojenčadi do četvrtog mjeseca života. Dovoljno je napraviti indirektni antiglobulinski test u roditelja čime se utvrđuje eventualna nazočnost iregularnih antieritrocitnih protutijela. Određivanjem IAT-a kod roditelja sprječavamo hemolitičke reakcije i omogućavamo sigurnije transfuzijsko liječenje novorođenčadi i dojenčadi do četiri mjeseca života. Nakon navršena četiri mjeseca života u dojenčadi se izvodi indirektni antiglobulinski test kao i kod odraslih.<sup>(6)</sup>

### **3.2.5. Direktni antiglobulinski test (DAT)**

Direktni antiglobulinski test izvodi se u novorođenčadi i dojenčadi do četiri mjeseca života, zbog mogućeg transplacentarnog prijelaza majčinih IgG protutijela i mogućeg razvoja hemolitičke bolesti novorođenčeta i hemolize djetetovih eritrocita.<sup>(6)</sup>

### **3.2.6. Određivanje eritrocitnih antigena (Rh fenotipa i Kell antigena)**

Određivanje Rh fenotipa, Kell antigena te drugih eritrocitnih antigena kod novorođenčadi i dojenčadi do četiri mjeseca života nije potrebno zbog nezrelosti i nemogućnosti djetetovog imunološkog sustava da stvori iregularna antieritrocitna protutijela. Iznimka su novorođenčad i dojenčad imuniziranih majki s identificiranim antieritrocitnim protutijelima u trudnoći ili nakon poroda, kojima je potrebno odrediti komplementarni eritrocitni antigen/e. Ukoliko postoji potreba za izdavanjem krvnih pripravaka dojenčadi nakon navršena četiri mjeseca života, potrebno je odrediti Rh fenotip i Kell antigen pridržavajući se transfuziološkog pravila u slučaju eventualnog ranijeg transfuzijskog liječenja eritrocitnim krvnim pripravcima. Ako je dojenče unutar tri mjeseca primilo eritrocitni krvni pripravak kontraindicirano je određivanje Rh fenotipa.

Postoji mogućnost genotipizacije u HZTM-u i određivanja RH genotipa ukoliko se ukaže potreba za određivanjem Rh fenotipa zbog daljnjeg transfuzijskog liječenja.<sup>(6)</sup>

### **3.2.7. Testovi podudarnosti (križne reakcije)**

Testovi podudarnosti se izvode sa serumom ili plazmom pacijenta, u ovom slučaju novorođenčeta i dojenčeta, i eritrocitima davatelja uz inkubaciju na 37° C. Ovi testovi, uz indirektni antiglobulinski test, služe za otkrivanje klinički značajnih antieritrocitnih protutijela na antigene niske učestalosti.<sup>(9)</sup>

S obzirom na nezrelost imunološkog sustava novorođenčeta i dojenčeta do četiri mjeseca života i nemogućnost stvaranja iregularnih antieritrocitnih protutijela, testovima podudarnosti se dokazuju eventualno pasivno transplacentarno prenesena majčina antieritrocitna protutijela. Kako je primarni cilj transfuzijskog liječenja spriječiti prijenos krvlju prenosivih bolesti nastoji se novorođenčad i dojenčad do četiri mjeseca života transfuzijski liječiti uz izlaganje što manjem broju dobrovoljnih davatelja. Upravo iz tog razloga dovoljno je jednom napraviti test podudarnosti i ako je rezultat negativan nepotrebno je ponavljati križnu probu sa eritrocitima iste doze kod ponovnog transfuzijskog liječenja istim eritrocitnim krvnim pripravkom.

Kod nastavka transfuzijskog liječenja s eritrocitnim krvnim pripravkom drugog/ih davatelja (druga doza) potrebno je ponovno samo jedanput napraviti test podudarnosti i ako je rezultat negativan nema potrebe za ponavljanjem križne probe s eritrocitima iste, druge doze.<sup>(6)</sup>

### **3.2.8. Titar izohemaglutinina**

Mjerenje titra izohemaglutinina služi kao pokazatelj proizvodnje protutijela tipa IgM. Ta se protutijela sintetiziraju u svih osoba osim u onih krvne grupe AB, a nastaju kao reakcija na ubikvitarne bakterijske antigene čija građa nalikuje polisaharidima antigena krvnih grupa (križna reakcija). Osoba krvne grupe A razvija protutijela anti-B, osoba krvne grupe B razvija anti-A, a osoba krvne grupe O razvija anti-A i anti-B.



Izohemaglutinini se sintetiziraju u prvim godinama života, pa do treće godine većina (98%) zdrave djece krvnih grupa A, B i O imaju titar izohemaglutinina najmanje 1:16.<sup>(10,11,12)</sup>

Titar izohemaglutinina se izvodi u okviru imunohematološkog testiranja dojenčadi starije od četiri mjeseca u sklopu dijagnostičke obrade bolesnika (prirođene i stečene imunodeficijencije, imunohematološka obrada prije transplantacije organa...)<sup>(6)</sup>

### **3.2.9. Elucija antieritrocitnih protutijela**

Elucija antieritrocitnih protutijela se izvodi u okviru imunohematološkog testiranja novorođenčadi i dojenčadi s pozitivnim direktnim antiglobulinskim testom i sumnjom na hemolitičku bolest fetusa i novorođenčeta, a nije moguće provesti imunohematološko testiranje roditelja (ne zna se status indirektnog antiglobulinskog testa, identificirano antieritrocitno protutijelo/a).<sup>(13)</sup>

## **3.3. Pribor i materijali**

### **3.3.1. Uzorak**

Uzorak krvi za imunohematološko ispitivanje je puna venska krv ispitanika uzeta u staklenu ili plastičnu epruvetu ili mikrovacutainer ili vacutainer sa ili bez antikoagulansa EDTA (etilen-diaminotetraoctena kiselina) (Slika 3.).



Slika 3. Krv u epruveti sa antikoagulansom EDTA  
(Preuzeto s: <https://blog.personalgenomes.org>)

U pisanim uputama treba biti:

- opisan način obaveznog vizualnog pregleda uzorka kako bi se utvrdila prikladnost za daljnje testiranje
- opisan način čuvanja uzorka prije početka analize
- jasno definiran nesukladan uzorak
- opisan način postupanja s nesukladnim uzorcima

Svaki uzorak mora biti pravilno označen odgovarajućim barkodom kako bi se postanalitičke greške svele na minimum. Pravilno obilježavanje uzorka te njegova sljedivost temelj je dobre laboratorijske prakse.<sup>(6)</sup>

### **3.3.2. Reagensi**

Ovlaštena medicinska ustanova mora voditi zapise o podacima koji potvrđuju prikladnost svakog korištenog reagensa upotrijebljenog pri testiranju. Nije dozvoljena rutinska upotreba reagensa bez provedene i ovjerene ulazne kontrole stoga svaki lot i/ili pošiljka mora proći kroz tu propisanu ulaznu kontrolu.

Skladištenje i način upotrebe reagensa moraju biti u skladu sa uputama proizvođača.

Svaki reagens na svom pakiranju mora imati jasno naznačen broj serije reagensa, datum isteka roka valjanosti te naziv proizvođača i/ili dobavljača.

Reagensi koji se koriste u imunohematološkom testiranju su:

- Mikrokartice:

- Anti-IgG, C3d; polyspecific Ortho BioVue System: Anti-IgG (kunićji), Anti-C3b (mišje monoklonalno stanična linija F7G3), Anti-C3d (mišje monoklonalno stanična linija C4C7);
- Anti-A/ Anti-B/ anti-D Ortho BioVue System: Anti-A mišja (IgM) monoklonska protutijela (stanične linije MHO4 i 3D3), Anti-B mišja (IgM) monoklonska

protutijela (stanične linije Nb10.5A5 i NB1.19), Anti-D ljudsko (IgM) monoklonsko protutijelo (stanična linija D7B8);

- Anti-A / Anti-B/ Anti-A,B/ Anti-D/ Anti-D Control Ortho BioVue System: Anti-A mišja (IgM) monoklonska protutijela (stanične linije MHO4 i 3D3), Anti-B mišja (IgM) monoklonska protutijela (stanične linije Nb10.5A5 i NB1.19), Anti-A,B mišja (IgM) monoklonska protutijela (stanične linije MHO4 i 3D3) Anti-A i (stanične linije Nb10.5A5 i NB1.19) Anti-B uz dodatak potencijatora za otkrivanje podgrupa A i B, anti-D ljudsko (IgM) monoklonsko protutijelo (stanična linija D7B8), Anti-D ljudsko (IgM) monoklonsko protutijelo (stanična linija RUM1), potencijatori optimizirani za uporabu kao kontrola testiranja krvnih grupa
- Anti-C/ Anti-E/ Anti-č/ Anti-e/ Anti-Kell/ Control Ortho BioVue System: Anti-C (IgM) monoklonsko protutijelo (stanična linija MS24), Anti-E (IgM) monoklonsko protutijelo (stanična linija C2), Anti-č (IgM) monoklonsko protutijelo (stanična linija MS42), anti-e (IgM) monoklonska protutijela (stanične linije MS16, MS21 i MS63), Anti-K1 (IgM) monoklonsko protutijelo (stanična linija MS56), potencijatori optimizirani za uporabu kao kontrola testiranja krvnih grupa;
- Reverse Diluent Ortho BioVue System: potencijatori optimizirani za uporabu u reverznom testiranju krvnih grupa;
- ID- Card LISS/ Coombs 6xAHG BIO-RAD: (zečji anti-IgG i monoklonalni anti-C3d, stanična linija C139-9);
- Neutral Ortho BioVue System; sve mikrokartice obavezno koristiti u roku trajanja i nakon sukladnih rezultata dnevnih kontrola

- Fiziološka 0.9% otopina NaCl

- Reagensi za hemotest u epruveti:

- Anti-A (stanična linija BIRMA-1)
- Anti-B (stanična linija LB-2)
- Anti-A,B (stanične linije BIRMA-1, ES-4 i ES-15)(svi MonoGnost)

- Anti-D MG MonoGnost (stanične linije RUM-1 (IgM) i MS-26 (IgG); sve reagense obavezno koristiti u roku trajanja i nakon sukladnih rezultata testiranja dnevnih kontrola
- Reagensi za hemotest na pločici:
- Anti-A (stanična linija A-98)
  - Anti-B (stanične linije B84 i B97)
  - Anti-A,B (stanične linije A98, B84, B97, AB125)(svi NovaClone)
  - NovaClone Anti-D: IgM+IgG monoklonska protutijela koja sadrže stanične linije D175(IgM) i D415(IgG) obavezno u roku trajanja i nakon sukladnih rezultata testiranja dnevnih kontrola
- Reagens za otkrivanje slabog Rh(D) antigena u IAT-u koji obavezno otkriva VI kategoriju parcijalnog Rh(D) antigena; Anti-D (RH1) BioClone (mješavina ljudskog monoklalnog i poliklalnog protutijela), Anti-D (ljudski IgM) monoklonsko protutijelo (stanična linija MAD-2) i Anti-D (IgG iz ljudskog seruma) obavezno u roku trajanja i nakon sukladnih rezultata testiranja dnevnih kontrola
- Otopina niske ionske jakosti Bio-LISS
- Suspenzija eritrocita A1, B i O za eritrotest u epruveti
- Otopina Diluent 2
- Testni eritrociti 0.8% Affirmagen A1 i B za eritrotest u Reverse Diluent Ortho BioVue System mikrokartici obavezno u roku trajanja i nakon sukladnih rezultata testiranja dnevnih kontrola.<sup>(6)</sup>

### **3.3.3. Oprema i instrumenti**

Svaki aparat koji se koristi pri testiranju mora biti validiran sukladno pisanim normama. Za svaki aparat treba posjedovati validacijski plan unutar kojeg su detaljno opisani postupci koji se moraju provesti da bi se utvrdilo da se sa određenom opremom

dobivaju ispravni rezultati. Trebaju postojati pisane upute u kojima je jasno naznačen način korištenja, čišćenja i kalibriranja aparata.

Oprema i instrumenti potrebni za imunohematološko testiranje:

- Stolna laboratorijska centrifuga za pripremu uzoraka (krv pupkovine, venska krv) (Slika 6.)
- BioVue i/ili Ortho Workstation termostat za inkubaciju mikrokartica na 37° C (Slika 4.)
- Automatski sustav Ortho AutoVue Innova za izvođenje imunohematoloških testova (Slika 5.)
- Automatski sustav IH-1000
- BioVue i/ili Ortho Workstation centrifuga za centrifugiranje Ortho mikrokartica
- e-Delphyn elektroničko-informatički sustav<sup>(6)</sup>



Slika 4. Ortho Workstation termostat

(Preuzeto s: <http://www.samirgroup.com/ortho-clinical-diagnostic/>)



Slika 5. Ortho AutoVue Innova

(Preuzeto s: <http://www.samirgroup.com/ortho-clinical-diagnostic/>)



Slika 6. Ortho Workstation centrifuga

(Preuzeto s: <http://www.samirgroup.com/ortho-clinical-diagnostic/>)

### **3.3.4. Pribor**

Pribor potreban za imunohematološko testiranje:

- Plastične ili staklene epruvete
- Plastični nastavci za mikropipete
- Stalci
- Mikropipete<sup>(6)</sup>

## **3.4. Opis aktivnosti**

### **3.4.1. Zaprimanje i priprema uzorka za obradu**

Djelatnik koji izvodi testiranja provjerava identičnost podataka na uzorku i na uputnici/nalazu za imunohematološko testiranje. Provjeravaju se podaci vezani uz prezime, spol, broj novorođenčeta u rodilištu, ime majke ili ime i prezime te MBO.

Provjerava se da li bolesnik od prije „postoji“ u elektroničko-informatičkom sustavu e-Delphin. U slučaju postojanja zadaju se testovi vežući se za postojeći elektronički karton bolesnika, a u slučaju da karton ne postoji otvara se novi. Uzorku i uputnici se dodjeljuje identifikacijski broj (barcod).

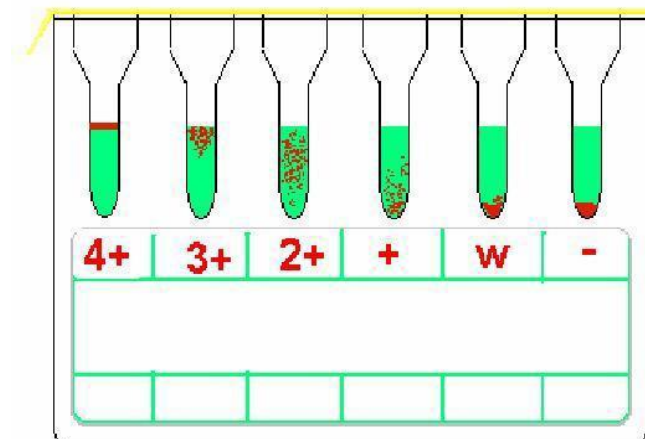
Slijedeći korak je odabir odgovarajućeg profila imunohematoloških testova nakon što se provjeri dob djeteta i zadaje se pomoću elektroničko-informatičkog sustava e-Delphin. Testovi se izvode pomoću automatskog sustava Ortho AutoVue Innova prema RU-OIH-04 i/ili ručno prema RU-OIH-03.

Pripremanje uzorka (krv pupkovine, venska krv) za imunohematološko ispitivanje slijedi nakon što djelatnik provjeri identičnost podataka na uzorku i uputnici.

Ako se rade testovi iz uzorka krvi pupkovine dolazi u obzir pranje eritrocita jedan put u fiziološkoj otopini kako bi se uklonila Wartonova sluz nakon čega se uzorak centrifugira.<sup>(6)</sup>

### 3.4.2. Imunohematološko testiranje novorođenčadi RhD negativnih roditelja-pupkovina

Direktni antiglobulinski test iz uzorka krvi pupkovine radi se isključivo ručno u Anti-IgG, C3d; polyspecific Ortho BioVue System mikrokartici. Ukoliko je rezultat pozitivan naručuje se novi uzorak iz venske krvi- epruveta s antikoagulansom EDTA (etilen-diaminotetraoetna kiselina) i ponavlja se direktni antiglobulinski test (automatski i ručno) u Ortho mikrokartici prema RU-OIH 09 DAT u mikrometodi s polispecifičnim antihumanim globulinom. Pozitivnim rezultatom se smatra aglutinacija očitana kao w (weak; većina eritrocita je na dnu stupca ali ne formiraju ravan rub), 1+ (većina aglutiniranih eritrocita nalazi se u donjoj polovici stupca), 2+ (aglutinirani eritrociti su vidljivi duž cijelog stupca, a manji broj eritrocita može biti vidljiv i na dnu), 3+ (aglutinirani eritrociti su zadržani u gornjoj polovici stupca), 4+ (aglutinirani eritrociti se kao ravna crta nalaze na vrhu stupca) ili mixed field (miješana aglutinacija, jedan dio eritrocita je na dnu stupca, a dio se zadržava na vrhu stupca). Negativnim rezultatom se smatra odsutnost aglutinacije i u tom slučaju su svi eritrociti na dnu stupca (Slika 7.)



Slika 7. Metoda aglutinacije u stupcu  
(Preuzeto s: [www.emedicine.medscape.com](http://www.emedicine.medscape.com))

Pozitivan rezultat smatra se neočekivanim rezultatom i zahtijeva prijavu neočekivanog rezultata te dodatna imunohematološka ispitivanja.



Traži se uzorak krvi roditelje uzet na EDTA te se radi indirektni antiglobulinski test; ako je majka krvne grupe O u ABO sustavu i njezin IAT je negativan, a dijete krvne grupe „A“, „B“ u ABO sustavu na nalazu krvne grupe piše se jačina DAT-a, naputak o suspektnoj ABO imunizaciji te nalaz krvne grupe majke „O“, IAT negativan.

Iznimno novorođenče roditelje koja je „O“ krvna grupa može biti i „AB“ krvne grupe što je vrlo rijetko cis nasljeđivanje ABO antigena.

Rh(D) antigen u epruveti i na pločici te Rh(D) antigen u IAT-u iz uzorka krvi pupkovine izvodi se ručno u Anti-IgG, C3d; polyspecific Ortho BioVue System mikrokartici u okviru obrade Rh(D) negativnih roditelja s negativnim IAT-om ili pozitivnim IAT-om bez antieritrocitnih anti-Rh(D) protutijela primarno u cilju procjene indiciranosti Rh(D) imunoprofilakse prema RU-OIH 19 Testiranje i preporuke za primjenu RhD imunoprofilakse u trudnica i roditelja. Testiranje se radi isključivo u paru tako što se paralelno uzima uzorak roditelje i novorođenčeta, što je moguće prije po porodu. Indicira se imunoprofilaksa optimalno unutar 72 sata od poroda.

Ako je novorođenče Rh(D) pozitivno u direktnoj aglutinaciji indicira se Rh(D) imunoprofilaksa i preporuča se kontrola testova imunizacije za šest mjeseci.

Ako je novorođenče Rh(D) negativno u direktnoj aglutinaciji radi se Rh(D) antigen u IAT-u. Ako je rezultat pozitivan indicira se Rh(D) imunoprofilaksa i preporuča se kontrola testova imunizacije za šest mjeseci. Ako je rezultat Rh(D) antigena u IAT-u negativan ne indicira se Rh(D) imunoprofilaksa.<sup>(6)</sup>

### **3.4.3. Imunohematološko testiranje novorođenčadi i dojenčadi do četiri mjeseca starosti**

ABO antigeni i Rh(D) antigen određuje se iz uzorka venske krvi u laboratoriju za imunohematološko ispitivanje pomoću automatskog sustava Ortho AutoVue Innova u Ortho mikrokarticama. Rade se dva testa u dvije vrste mikrokartica. Prvi u Anti-A/ Anti-B/ anti-D Ortho BioVue System mikrokartici, a drugi u Anti-A/ Anti-B/ Anti-A,B/ Anti-D/ Anti-D/ Control Ortho BioVue System mikrokartici prema RU-OIH 04 Određivanje krvne grupe na automatskom sustavu Ortho AutoVue Innova.

Pozitivnim rezultatom se smatra svaka aglutinacija koja je očitana kao 3+ ili 4+. S druge strane, negativnim rezultatom se smatra odsutnost aglutinacije. Svaki drugi rezultat zahtijeva dodatno ispitivanje. Rezultati se mogu interpretirati samo onda ako je rezultat testiranja negativan u šestom mikrostupcu Anti-A/ Anti-B/ Anti-A,B/ Anti-D/ Anti-D/ Control Ortho BioVue System mikrokartice, u suprotnom rezultat testiranja se smatra neočekivanim i zahtijeva dodatno imunohematološko ispitivanje.

ABO antigeni i Rh(D) antigen može se odrediti i ručno iz uzorka venske krvi. I u ovom slučaju se rade dva testa. Prvi u Anti-A/ Anti-B/ Anti-A,B/ Anti-D/ Anti-D/ Control Ortho BioVue System mikrokartici, a drugi u epruveti s Anti-A (stanična linija BIRMA-1), Anti-B (stanična linija LB-2), Anti-A,B (stanične linije BIRMA-1, ES-4 i ES-15)(svi MonoGnost); Anti-D MG MonoGnost (stanične linije RUM-1 (IgM) i MS-26 (IgG)) prema RU-OIH 03 Određivanje krvne grupe ručnom metodom.

Rh(D) antigen se očitava makroskopski u epruveti, a pozitivna reakcija se interpretira:

- 4+ eritrociti aglutiniraju se u jedan aglutinat
- 3+ aglutinirani eritrociti formiraju 2-3 veća aglutinata
- 2+ aglutinirani eritrociti formiraju više manjih aglutinata uz po koji veći aglutinat, pozadina je bistra
- 1+ aglutinirani eritrociti formiraju više nježnih aglutinata, bez slobodnih eritrocita, pozadina je mutna-crvenkasta
- +/- uz nježne aglutinate vidljivi su slobodni eritrociti

Pozitivnim rezultatom smatra se svaka aglutinacija koja je očitana kao 2+, 3+ ili 4+. Negativnim rezultatom se smatra odsutnost aglutinacije. Svaki drugi rezultat se smatra neočekivanim i zahtijeva dodatno imunohematološko ispitivanje.

Svako određivanje ABO i Rh(D) antigena prati i ispitivanje direktnog antiglobulinskog testa. Indirektni antiglobulinski test izvodi se iznimno u nedostatku uzorka roditelje iz uzorka venske krvi uzetog na EDTA, samo kada postoji zahtjev za transfuzijsko liječenje. IAT se izvodi u Anti-IgG, C3d; polyspecific Ortho BioVue System mikrokartici ručnom metodom. Negativnim rezultatom se smatra odsutnost aglutinacije odnosno kada su svi eritrociti na dnu stupca.

Svaki drugi rezultat testiranja smatra se pozitivnim, neočekivanim rezultatom i zahtjeva dodatno ispitivanje. U toj situaciji obavezno se nastoji naručiti uzorak krvi majke (vacutainer sa i bez EDTA).<sup>(6)</sup>

#### **3.4.4. Ispitivanje ostalih eritrocitnih antigena, dojenčadi starije od četiri mjeseca**

Rh fenotip i Kell antigeni te drugi eritrocitni antigeni određuju se iz uzorka venske krvi u Anti-C/ Anti-E/ Anti-č/ Anti-e/ Anti-Kell/ Control Ortho BioVue System mikrokartici pomoću automatskog sustava Ortho BioVue Innova.

Drugi eritrocitni antigeni iz uzorka venske krvi određuju se prema uputama proizvođača reagensa, a prema RU-OIH 13 Određivanje eritrocitnih antigena ručnom metodom u epruveti ili u Neutral Ortho BioVue System ili Anti-IgG, C3d; polyspecific Ortho BioVue System mikrokartici ovisno o vrsti protutijela pomoću reagensa za određivanje eritrocitnih antigena uz obavezno korištenje odgovarajućih pozitivnih i negativnih kontrola.

Rh fenotip i Kell antigeni mogu se odrediti i ručnom metodom iz uzorka venske krvi u Anti-C/ Anti-E/ Anti-č/ Anti-e/ Anti-Kell/ Control Ortho BioVue System mikrokartici.

U interpretaciji Rh fenotipa i Kell antigena u mikrokartici pozitivnim rezultatom smatra se svaka aglutinacija koja je očitana kao 3+ ili 4+. Negativnim rezultatom se smatra odsutnost aglutinacije. Svaki drugi rezultat smatra se neočekivanim i zahtijeva dodatno imunoematološko ispitivanje. Rezultati se mogu interpretirati samo onda ako je rezultat testiranja negativan u šestom mikrostupcu Anti-C/ Anti-E/ Anti-č/ Anti-e/ Anti-Kell/ Control Ortho BioVue System mikrokartice, u suprotnom rezultat testiranja se smatra neočekivanim i zahtjeva dodatno imunoematološko ispitivanje.

U interpretaciji rezultata drugih eritrocitnih antigena pozitivnim rezultatom se smatra svaka aglutinacija koja je očitana kao 3+ ili 4+ u mikrometodi, odnosno 2+, 3+ ili 4+ u epruveti. Negativnim rezultatom se smatra odsutnost aglutinacije. Svaki drugi rezultat se smatra neočekivanim i zahtjeva dodatno imunoematološko ispitivanje.

U iznimnim situacijama i/ili ovisno o dijagnozi te mogućem dugotrajnom transfuzijskom liječenju, ispitivanje ostalih antieritrocitnih antigena može se izvoditi i u dojenčadi mlađe od četiri mjeseca.<sup>(6)</sup>

### **3.4.5. Testovi podudarnosti za novorođenče i dojenče**

Testovi podudarnosti za novorođenče i dojenče izvode se sa serumom ili plazmom pacijenta, u ovom slučaju novorođenčeta i dojenčeta, i eritrocitima davatelja u ID- Card LISS/ Coombs 6x AHG BIO-RAD ili iznimno u Anti-IgG, C3d; polyspecific Ortho BioVue System mikrokartici uz inkubaciju na 37° C u termostatu za inkubaciju u trajanju od 15 (DiaMed) ili 20 minuta (Ortho) ovisno o mikrometodi.

Testovi podudarnosti se iznimno izvode u Anti-IgG, C3d; polyspecific Ortho BioVUe System mikrokartici u slučaju transplacentarno prenesenih majčinih antieritrocitnih protutijela, a prije određivanja odsutnosti komplementarnih eritrocitnih antigena u eritrocitnom krvnom pripravku davatelja.

Dovoljno je samo jedanput napraviti test podudarnosti i ako je dobiveni rezultat negativan nema potrebe za ponavljanjem križne probe sa eritrocitima iste doze kod ponovnog transfuzijskog liječenja istim eritrocitnim krvnim pripravkom. Kod nastavka liječenja s drugim eritrocitnim krvnim pripravkom potrebno je ponovno samo jedanput napraviti test podudarnosti i ako je rezultat negativan nije potrebno ponavljati križnu probu s tim eritrocitima.

U interpretaciji rezultata testova podudarnosti negativnim rezultatom smatra se odsutnost aglutinacije kada su svi eritrociti na dnu stupca ili gela, a svaki drugi rezultat se smatra pozitivnim, neočekivanim rezultatom i zahtjeva dodatno imunohematološko ispitivanje. U ovakvoj situaciji nastoji se naručiti uzorak krvi majke (vacutainer sa i bez EDTA).<sup>(6)</sup>

### 3.5. Upozorenja u radu s mikrokarticama

Po završetku centrifugiranja obavezno pregledom prema svjetlu makroskopski pregledati mikrokarticu s obje strane.

Eritrociti novorođenčeta obloženi antieritrocitnim protutijelima oboljelog od hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta mogu se aglutinirati i s kontrolnim reagensom. Iz tog razloga rezultati određeni ovom metodom nisu pouzdani i ne mogu se interpretirati te zahtijevaju dodatno imunohematološko ispitivanje.

Određivanje ABO antigena u novorođenčeta može biti otežano uključujući lažno negativan rezultat zbog slabo razvijenih ABO antigena ili lažno pozitivan zbog prisutnosti Wartonove sluzi, ako je uzorak uzet iz pupčane vene. Zbog toga se u novorođenčeta ABO krvna grupa mora odrediti iz uzorka venske krvi uzetog na EDTA ili opranih eritrocita.

RhD antigen može biti blokiran u slučajevima teške hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta uzrokovane majčinim anti-Rh(D) antieritrocitnim protutijelima, što dovodi do lažno negativnog RhD rezultata. Zato je u slučaju izrazito pozitivnog direktnog antiglobulinskog testa u novorođenčeta, rezultat ovog testa nepouzdan, a određivanje RhD antigena treba odrediti dodatnim imunohematološkim ispitivanjima.

Imunohematološko ispitivanje dojenčadi od četiri mjeseca života do jedne godine starosti izvodi se na isti način kao i kod odraslih.

Djelatnik koji izvodi imunohematološke testove interpretira rezultate testiranja nakon što su oni izvedeni pomoću automatskog sustava te potvrđuje rezultate testiranja onih testova koji su sukladni. Nesukladni rezultati zahtijevaju prijavu neočekivanog rezultata liječniku koji je odgovoran za imunohematološko ispitivanje. Ti rezultati se potvrđuju zajedno s odgovornim liječnikom ili se testiranje ponavlja. Nakon što su svi rezultati potvrđeni automatski se prenose u e-Delphyn elektroničko-informatički sustav.

Rezultati testova koji su izvedeni ručnom tehnikom, kao što je slabi D antigen, DAT, Rh fenotip, eritrocitni antigeni, interpretiraju se zajedno s odgovornim liječnikom nakon čega se potvrđuju rezultati testiranja i upisuju u e-Delphyn i/ili protokol ispitivanja.<sup>(6)</sup>

### 3.6. Zapisi

Rezultate testiranja u e-Delphyn upisuje odgovorni djelatnik i/ili liječnik te je potrebno isprintati sljedeće:

- Listu uzoraka za laboratorij
- Radnu listu
- Validacijsku listu iz e-Delphyna
- Nalaze

Na listi uzoraka za laboratorij se nalaze imena i prezimena svih pacijenata i njihovi identifikacijski brojevi, MBO te zadani imunohematološki profili testova. Odgovorni liječnik provjerava točnost podataka i opseg testiranja.

Na radnoj listi se nalaze rezultati testova za sve pacijente. Odgovorni liječnik provjerava točnost rezultata nakon što vizualno pregleda rezultate testiranja u mikrokarticama. Djelatnik ručno upisuje rezultate testiranja koji su napravljeni ručnom metodom te odgovorni liječnik zajedno s djelatnikom koji je izvodio testiranja validira rezultate.

Na validacijskoj listi iz e-Delphyna nalazimo identifikacijske brojeve pacijenata i potvrđene rezultate svih testiranja.

I na samom kraju dolazimo do nalaza na kojima se nalazi ime i prezime pacijenta, MBO, datum rođenja, nalaz krvne grupe (ABO i RhD sustav), DAT-a, slabi D antigen, IAT-a, Rh fenotipa, ostalih eritrocitnih antigena. Nalaz se veže za uputnicu a kopija sa barcodom ostaje u CTM-OIH.

Završnu provjeru rada u imunohematološkom laboratoriju vrši odgovorni liječnik potpisujući listu uzoraka za laboratorij, nalaze, radne i validacijske liste.

Odgovorni djelatnik pečati nalaze na način da se na njima nalaze pečat liječnika i pečat Centra za transfuzijsku medicinu.<sup>(6)</sup>

## 4. RASPRAVA

21.10.2015. godine na Odjel za transfuzijsku medicinu primljena je 29-godišnja trudnica koja je došla na testiranje ABO/RhD krvne grupe u 12. tjednu trudnoće.

Uzet joj je uzorak venske krvi u epruvetu s EDTA antikoagulansom. Testiranjem je utvrđeno da je pacijentica krvne grupe O- (negativan), a indirektni antiglobulinski test joj je bio negativan što upućuje na to da u plazmi nisu prisutna antieritrocitna protutijela. Zbog rezultata pretraga pacijentica je naručena na kontrolu krvne grupe u 28. tjednu trudnoće.

24.02.2016. godine (28.tjedan trudnoće) pacijentica dolazi na kontrolu krvne grupe. Indirektni antiglobulinski test je i dalje bio negativan te je pacijentica naručena na kontrolu u 34.tjednu trudnoće.

06.04.2016. godine (34.tjedan trudnoće) indirektni antiglobulinski test je ostao nepromijenjen, u plazmi pacijentice nisu nađena antieritrocitna protutijela.

Porod je bio 30.05.2016. godine i prošao je bez komplikacija. Rodilji je ponovno napravljen indirektni antiglobulinski test koji je bio negativan i posljedično tome obvezna je primiti postpartalnu imunoprofilaksu hiperimunim anti D gama globulinom. U isto vrijeme je poslan i djetetov uzorak krvi iz pupkovine kako bi se utvrdila Rh(D) krvna grupa i status direktnog antiglobulinskog testa. Imunohematološkim testiranjem je utvrđeno da je dijete Rh(D)+ (pozitivan) te mu je direktni antiglobulinski test bio pozitivan (1/2+). Iz tog razloga preporučena je izrada krvne grupe djeteta radi procjene moguće ABO imunizacije.

U roku od 2 sata primljen je novi uzorak krvi djeteta kako bi se odredila ABO/RhD krvna grupa i direktni antiglobulinski test. Djetetu je određena krvna grupa A+ (pozitivan) i negativan direktni antiglobulinski test što znači da u plazmi djeteta nisu prisutna majčina protutijela i da nije došlo do ABO imunizacije.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Majka krvne grupe O koja rodi dijete A ili B krvne grupe može razviti antitijela na djetetove antigene te ona napadaju eritrocite djeteta koji se zbog toga raspadaju, dijete postaje slabokrvno i povećava mu se koncentracija bilirubina u krvi. Tu imunizaciju nije moguće unaprijed predvidjeti niti spriječiti u trudnoći, zato se svakom novorođenom djetetu treba odrediti krvna grupa i direktni antiglobulinski test da se spriječe ABO imunizacije.<sup>(10)</sup>

2. U slučaju miješanja Rh(D) - krvi trudnice sa Rh(D) + krvi djeteta dolazi do Rh(D) imunizacije koja se može spriječiti pravilnim kontroliranjem ABO/RhD krvne grupe trudnice. Ukoliko dođe do imunizacije u prvoj trudnoći, neće se stvoriti toliko protutijela da bi se razvila HBFN, ali ako je u sljedećim trudnoćama dijete Rh(D) + dolazi do sekundarnog imunološkog odgovora pri kojem se stvaraju IgG protutijela koja prelaze u djetetov krvotok i razvija se hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta. Da bi se spriječila ta fatalna bolest od velike je važnosti praćenje trudnice tijekom trudnoće i primjena Rh(D) imunoprofilakse kod Rh(D) - majke ukoliko joj je indirektni antiglobulinski test nakon poroda negativan.<sup>(10)</sup>



## 6. LITERATURA

1. Grgičević D, Vuk T. *Imunohematologija i transfuzijska medicina*. Zagreb: Medicinska naklada, 2000.
2. Anthea M, Hopkins J, McLaughlin CW, Johnson S, Quon Warner M, LaHart D, Wright JD. *Human Biology and Health*. New Jersey: Englewood Cliffs, 1993.
3. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. *A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins*. *Brit J Exp Path* 1945;26:255-66.
4. Rosen F, Geha R. *Case Studies in Immunology*. New York: Garland Science; 2004.
5. Berkow R, Beers MH, Fletcher AJ. *Msd medicinski priručnik za pacijente*. Split: Placebo d.o.o.; 2008.
6. Tyler V i sur. *Technical Manual*. USA: American Association of Blood Banks, Bethesda MA, 1999.
7. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Walter P, Raff M, Roberts K. *Molecular Biology of the Cell*. Routledge. New York: Garland Science; 2002.
8. *dbRBC - Blood Group Antigen Gene Mutation Database*. Preuzeto s: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Pristupljeno: lipanj, 2016.
9. Petrides M, Stack G, Maes LY. *Practical Guide to Transfusion Medicine*. Bethesda, Md: American Association of Blood Banks, 2007; 38-40.
10. Fleisher TA, Oliveira JB. *Functional and molecular evaluation of lymphocytes*. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 227-34.

11. Folds JD, Schmitz JL. *Clinical and laboratory assessment of immunity*. J Allergy Clin Immunol 2003; 111 (Supl 2): 702-11.
12. Rose NR, Hamilton RG, Detrick B. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington (DC): American Society for Microbiology, 2002.
13. Golubić-Čepulić B i sur. *Klinička transfuziologija, Prijetransfuzijska ispitivanja*. KBC Zagreb, 2001.

## 7. SAŽETAK

### Uvod

Na samom početku uvoda prikazane su važnije godine u razvoju transfuzijske medicine kao što je otkriće krvnih grupa, Rhesus faktora, Coombsovog testa itd. U nastavku rada slijedi definiranje eritrocitnih antigena, njihove građe i funkcije za ljudski organizam. Eritrocitna membrana novorođenčeta do šestog mjeseca života nije u potpunosti razvijena, posljedično tome tek nakon šest mjeseci možemo dokazati djetetova antieritrocitna protutijela u serumu.

Krvne grupe se nasljeđuju prema Mendelovom zakonu, a sintezu određuje jedan gen ili skupina usko povezanih homolognih gena. A i B aleli su kodominantni dok je O alel recesivan. Uz određivanje ABO krvne grupe radi se i određivanje Rh faktora te Coombsovog testa. Postoje dvije vrste Coombsovog testa, direktni i indirektni o kojima se detaljnije govori u poglavlju 3.2. Određivanje Rh faktora je posebno važno u trudnoći. Ako je majka Rh negativna, a dijete naslijedi Rh pozitivan faktor od oca postoji mogućnost razvoja hemolitičke bolesti fetusa i novorođenčeta te može doći do kobnih posljedica.

### Cilj

Cilj ovog rada je ukazati na važnost pravilnog izvođenja i interpretacije imunohematološkog testiranja neonatološke djece s ciljem sprječavanja ABO i Rh(D) imunizacija.

### Izvori podataka i metode

U svakom laboratoriju postoje pravila i protokoli kojih se treba držati prilikom izvođenja imunohematološkog testiranja. Kao uzorak se koristi puna venska krv uzeta u epruvetu sa antikoagulansom EDTA. Postoje točno propisani reagensi koji se trebaju koristiti uključujući mikrokartice, 0.9% fiziološku otopinu NaCl-a, reagensi za hemotest u epruveti i na pločici, reagens za otkrivanje slabog Rh(D) antigena, otopina niske ionske jakosti Bio-LISS, suspenzija eritrocita A1, B i O za eritrotest u epruveti, otopina Diluent 2 i testni eritrociti.

Uz odgovarajuće reagense trebaju se koristiti i odgovarajući instrumenti koji su prethodno validirani te odgovarajući pribor u koji spadaju epruvete, mikropipete, plastični nastavci za mikropipete te stalci.

### **Rasprava**

U raspravi je prikazan slučaj trudnice koja je O- krvne grupe, a nosi Rh(D) + dijete kojem je nakon poroda utvrđena A+ krvna grupa.

### **Zaključak**

Pravilno izvođenje i interpretacija imunohematološkog testiranja majke i novorođenčeta je od iznimne važnosti jer se sprječavaju ABO i Rh(D) imunizacije. Testiranja su obvezna za svaku trudnicu, a ovisno o Rh(D) krvnoj grupi slijede daljnje kontrole po kalendaru. Svaka trudnica se poziva na odgovornost kako bi se osigurala što kvalitetnija zdravstvena skrb za nju i dijete.

## **8. SUMMARY**

### **Introduction**

All years that are important for the development of the transfusion medicine such as: the development of blood types, Rhesus factor, Coombs test and so on have been given at the beginning of the introduction . The following text contains definitions of the erythrocyte antigens, their structures and functions in the human body. The erythrocyte membrane of a newborn isn't fully developed until the sixth month of life, so based on that the anti-erythrocyte antibodies can firstly be detected in the serum after six months of life. Inheritance of a certain blood type follows the Mendelian law of inheritance and it consists of synthesis of a certain gene or a group of homologous genes. Alleles A and B are co-dominant and the allele 0 is recessive. Rh factor analysis as well as Coombs tests are performed with the blood typing simultaneously. There are two types of a Coombs test, the direct and the indirect one which will be discussed later in the Chapter 3.2. Knowing your Rh factor is very important during pregnancy. If the mother is Rh negative and the child has inherited Rh positive factor from the father the fetus has a chance of developing a fatal hemolytic disease of the newborn.

### **Objective**

The objective of this assay is to highlight the importance of

### **Sources of information and methods**

There are certain rules and protocols that have to be followed in each laboratory when an immunohematology testing is being performed. Venous blood mixed with anticoagulant EDTA in a test tube is used as a sample. There is a prescribed list of reagents that should be used including: ortho biovue cassettes, 0.9 % saline solution of sodium chloride, reagents for hemotests for test tubes and plates, reagents for detection of weak Rh (D) antigens, low ionic strength Bio-LISS solution, Diluent 2 solution and test erythrocytes.

Recommended instruments, that have been previously validated, should be used in alignment with the correct reagents and with the correct laboratory equipment which consists of: test tubes, micropipettes ,micropipettes tips and holders.

**Discussion**

In the discussion a case of a pregnant woman with O- blood type carrying a Rh(D) + child who was diagnosed A+ blood type after birth is shown.

**Conclusion**

Correct handling and interpretation of immunohaematological testing of the mother and her newborn is vital in preventing ABO/Rh(D) immunisation. Every pregnant woman must be tested and further controls will depend on her Rh(D) blood type.

A sense of responsibility must be shown by every pregnant woman during her pregnancy in order to insure that she and her child get the best medical care possible.

## 9. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI:

**Ime i prezime:** Maja Tarabene

**Datum rođenja:** 19. listopada 1994. godine

**Mjesto rođenja:** Split, Republika Hrvatska

**Adresa stanovanja:** Kašteline 3, 21215 Kaštel Lukšić

**Kontakt:** 091/ 491-0094

**E-mail:** [maja.tarabene@gmail.com](mailto:maja.tarabene@gmail.com)

### OBRAZOVANJE:

2001. - 2009. Osnovna škola „Ostrog“, Kaštel Lukšić

2009. - 2013. Opća gimnazija „Ivan Lucić“, Trogir

2013. - 2016. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu- Medicinsko laboratorijska dijagnostika

### POSEBNA ZNANJA, VJEŠTINE I POHAĐANI SEMINARI:

1. Osposobljenost za rad na računalu
2. Znanje engleskog jezika
3. Položen vozački ispit B kategorije

### RADNO ISKUSTVO:

2015. Radila sam kao konobarica sezonski posao u caffe bar Mosquito

### **ISKUSTVA STEČENA NA STUDIJU:**

Sudjelovala sam kao vanjski suradnik pri Katedri za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju-Medicinskog fakulteta u Splitu, tijekom turnusa Farmaceutska mikrobiologija