

Specifičnost i frekvencija aloprotutijela na eritrocitne antigene u rutinskoj prijetransfuzijskoj obradi

Topić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Dental Medicine and Health Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:243:663025>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**

Repository / Repozitorij:

[Faculty of Dental Medicine and Health Osijek
Repository](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET ZA DENTALNU MEDICINU I ZDRAVSTVO

OSIJEK

Diplomski sveučilišni studij Sestrinstvo

Martina Topić

**Specifičnost i frekvencija aloprotutijela na
eritrocitne antigene u rutinskoj
prijetransfuzijskoj obradi**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET ZA DENTALNU MEDICINU I ZDRAVSTVO

OSIJEK

Diplomski sveučilišni studij Sestrinstvo

Martina Topić

**Specifičnost i frekvencija aloprotutijela na
eritrocitne antigene u rutinskoj
prijetransfuzijskoj obradi**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Rad je ostvaren na Odjelu za transfuzijsku medicinu u Općoj županijskoj bolnici Vinkovci.

Mentor rada: doc. dr. sc. Hrvoje Brkić.

Komentor rada: doc. dr. sc. Štefica Mikšić.

Rad ima četrdeset i četiri (44) lista, dvadeset i tri (23) tablice i četiri (4) slike.

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo.

Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti.

Znanstvena grana: 3.02.31 sestrinstvo.

Zahvala

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Hrvoju Brkiću i komentoru doc. dr. sc. Štefci Mikšić na mentorstvu, savjetima i pomoći tijekom izrade ovoga diplomskog rada.

Neizmjereno se zahvaljujem Nikolini Brkić, dr. med., s Odjela za transfuzijsku medicinu, OŽB Vinkovci, na znanju, strpljivosti i ogromnoj pomoći tijekom pisanja diplomskoga rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, a posebno Marku na podršci, razumijevanju i ljubavi tijekom školovanja. Njima posvećujem ovaj rad.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Krv i krvni sastojci	1
1.2. Eritrocitne krvne grupe.....	2
1.2.1. ABO i Rh sustav krvnih grupa	2
1.2.2. Ostali klinički značajni sustavi eritrocitnih antigena	3
1.3. Imunizacija i antieritrocitna protutijela	3
1.4. Rutinska imunohematološka obrada pacijenta i trudnica.....	4
1.5. Poslijetransfuzijska reakcija.....	5
1.6. Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta	6
2. CILJ	8
3. MATERIJAL I METODE	9
3.1. Ustroj studije	9
3.2. Materijal istraživanja.....	9
3.3. Metode.....	9
3.4. Statističke metode	13
4. REZULTATI	14
5. RASPRAVA	28
6. ZAKLJUČAK	31
7. SAŽETAK	32
8. SUMMARY	33
9. LITERATURA	34
10. ŽIVOTOPIS	37

POPIS KRATICA

AHG – Antihumani gamaglobulin

Anti-C – antitijelo na antigen C

Anti-c – antitijelo na antigen c

Anti-CROV – antitijelo na antigen CROV

Anti-Cw – antitijelo na antigen Cw

Anti-D – antitijelo na antigen D

Anti-E – antitijelo na antigen E

Anti-e – antitijelo na antigen e

Anti-Fy a – antitijelo na antigen Duffy a

Anti-Fy b – antitijelo na antigen Duffy b

Anti-Jk a – antitijelo na antigen Kidd a

Anti-K – antitijelo na antigen Kell

Anti-Le a – antitijelo na antigen Lewis a

Anti-Le b – antitijelo na antigen Lewis b

Anti-M – antitijelo na antigen M

Anti-P – antitijelo na antigen P

Anti-S – antitijelo na antigen S

DAT – Direktni antiglobulinski test

HBFN – Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta

HBN - Hemolitička bolest novorođenčeta

IAT – Indirektni antiglobulinski test

IgG – Imunoglobulin G

IgM – Imunoglobulin M

PTHR – Poslijetransfuzijska hemolitička reakcija

PTR – Poslijetransfuzijska reakcija

1. UVOD

U područje rada transfuzijske medicine pripada promidžba dobrovoljnoga davalaštva krvi, prikupljanje krvi od dobrovoljnih darivatelja krvi, testiranje krvi na zarazne bolesti, proizvodnja krvnih pripravaka te kontrola primjene krvnih pripravaka pacijentima (1).

Počeci su transfuzijske medicine zabilježeni još u najranijemu razdoblju povijesti čovječanstva kada je krv smatrana svetom, a još su stari Egipćani prije više od 2 500 godina bolesnike liječili puštanjem krvi. Početkom suvremene transfuzijske medicine smatra se 1900. godina kada je Landsteiner otkrio postojanje izohemaglutinina i antigena iz ABO sustava eritrocitnih antigena. Antigeni Rh sustava otkriveni su 1939. i 1940. godine. Coombs, Mourant i Race 1945. godine uveli su antiglobulinski test (Coombsov test). Uz ova otkrića dolazi i do mnoštva drugih, od toga kako se nasljeđuju krvne grupe do otkrića natrijeva citrata koji sprječava zgrušavanje krvi, a razvoj se transfuzijske medicine nije zaustavio ni do danas (2).

U Republici je Hrvatskoj 1923. godine u Ginekološkoj klinici Medicinskoga fakulteta u Zagrebu dokumentirana prva transfuzija krvi bez prethodnoga određivanja krvne grupe. U istoj je klinici 1926. godine primijenjena prva transfuzija krvi, uz prethodno određivanje krvne grupe primatelja i davatelja, a do 1938. godine transfundirano je 362 pacijenta (2).

1.1. Krv i krvni sastojci

Osnovne su funkcije krvi održavanje hemostaze, prijenos hranjivih i metaboličkih sastojaka te obrana od patogena. Volumen krvi ovisi o čovjekovoj tjelesnoj masi te iznosi oko 7 % ukupne mase. Kod muškaraca volumen krvi iznosi oko 70 ml/kg, a kod žena oko 63 ml/kg. Volumen plazme iznosi oko 40 ml/kg tjelesne težine (3).

Stanice su koje se nalaze u krvi eritrociti, leukociti i trombociti. U eritrocitima se nalazi hemoglobin koji je prijenosnik kisika i ugljičnoga dioksida. Životni je vijek eritrocita oko 120 dana (4). Trombociti su krvne pločice koje sudjeluju u primarnoj hemostazi tvoreći trombocitni ugrušak pri krvarenju, nemaju jezgru te u krvi ostaju 9 – 12 dana (3). Leukociti su sve stanice s jezgrom u perifernoj krvi i imaju funkciju obrane od zaraznih čimbenika ili drugih stanica koje nisu dio organizma (4).

Plazma je tekući dio krvi koji se sastoji od vode, ugljikohidrata, soli, masti te više od 300 različitih proteina. Najvažniji su proteini u plazmi albumini, imunoglobulini, fibrinogen, faktori

zgrušavanja i transferin. Albumin je najzastupljeniji protein plazme (više od 50 %). Imunoglobulini su drugi najzastupljeniji proteini plazme (18 – 23 %) (3).

1.2. Eritrocitne krvne grupe

Eritrocitni su antigeni, najbitniji antigeni u prijetransfuzijskoj imunohematološkoj obradi. Nasljeđuju se kodominantno prema Mendeljevim zakonima. Svrstani su u sustave krvnih grupa, skupine ili serije. Skup antigena, čiji su geni na jednom lokusu, čini sustav. U skupine su svrstani antigeni koji nisu dovoljno istraženi, ali su slični na biokemijskoj, serološkoj i genetičkoj razini. Antigeni koji su visoko učestali ili su prisutni kod vrlo maloga broja ljudi, a nemaju aloantigen koji bi im bio sličan, svrstani su u serije (2). Do danas je poznato preko 650 antigena koji su svrstani u 43 krvnogrupna sustava (5).

1.2.1. ABO i Rh sustav krvnih grupa

ABO je sustav prvi otkriven i najvažniji sustav eritrocitnih antigena. Za nastanak antigena iz ABO sustava značajna su dva sustava gena ABO i Hh. H gen kodira enzim koji modificira prekursor antigena i omogućuje vezanje drugih šećera. Gen je O afunkcionalan što znači da ne nastaje enzim koji će modificirati antigen H. Gen za krvnu grupu A kodira enzim koji će dodati N-acetilgalaktozamin na H antigen, dok gen za krvnu grupu B kodira enzim koji prenosi D-galaktoza na H antigen (1). Ako su prisutni i A i B gen, nastat će enzimi koji prenose i N-acetilgalaktozamin i D-galaktozau na H antigen. Protutijela su kod krvne grupe A i B prirodna IgM razreda, dok su kod krvne grupe O prirodna, uglavnom IgG razreda. Protutijela na antigene iz ABO sustava uzrokuju intravaskularnu hemolizu i hemolitičku bolest novorođenčeta (HBN) (3).

Učestalost pojedine krvne grupe iz ABO sustava ovisi o populaciji koja se analizira (6). U Republici je Hrvatskoj oko 42 % stanovništva krvne grupa A, 34 % stanovništva ima krvnu grupu O, 17 % krvnu grupu B te samo 7 % stanovništva ima krvnu grupu AB (2).

Rh je sustav drugi najvažniji sustav eritrocitnih antigena (2). Danas je poznato 55 antigena koji pripadaju ovome sustavu, ali u rutinskome je radu značajno pet antigena (C, c, D, E, e) (5).

D antigen imaju RhD pozitivne osobe kojih je oko 85 % u ukupnoj populaciji, dok je oko 15 % osoba RhD negativno. Protutijela iz ovoga sustava nastaju kontaktom sa stranim eritrocitnim antigenom te ih se kod osoba koje nisu transfundirane ili nisu bile trudne gotovo nikada ne

pronalazi. Protutijela su na antigene iz Rh sustava gotovo uvijek IgG razreda i uzrokuju ekstravaskularnu hemolizu (2). Također, uzrokuju poslijetransfuzijsku hemolitičku reakciju (PTHR) te se Rh imunizacija smatra jednom od ozbiljnijih komplikacija trudnoće (7).

1.2.2. Ostali klinički značajni sustavi eritrocitnih antigena

Ostali su klinički značajni sustavi Kell, Duffy, Kidd, Lewis, MNS (2).

Kell (K) je treći najznačajniji sustav krvnih grupa zbog svoje imunogeničnosti. Nakon primjene jednoga pripravka K pozitivnih eritrocita, oko 5 % pacijenata će razviti Kell protutijela koja su IgG razreda te uzrokuju PTHR i hemolitičku bolest fetusa i novorođenčeta HBFN(1).

Duffy (Fy) je sustav klinički značajan jer isto uzrokuje klinički značajne HBFN i PTHR, protutijela su IgG razreda, a nastaju imunizacijom nakon izlaganja antigenu transfuzijom ili trudnoćom (1).

Kidd (Jk) su protutijela IgG razreda i mogu uzrokovati HBFN te česte i burne PTHR (1).

Lewis (Le) su protutijela IgM razreda i ne uzrokuju HBN, ali mogu uzrokovati aktivaciju komplementa te uzrokovati PTHR (1).

MNS (MNSs) sustav čini veliki broj antigena. Anti-M i anti-N protutijela najčešće su IgM razreda te su klinički značajna kada njihov temperaturni raspon dolazi do temperature tijela, rijetko vežu komplement, a anti-M protutijela mogu biti i IgG razreda. Anti-S i anti-s protutijela najčešće su imuna te uzrokuju teži oblik HBFN kao i PTHR (1).

1.3. Imunizacija i antieritrocitna protutijela

Protutijela su imunoglobulini (Ig) koji nastaju nakon kontakta imunološkoga sustava s nepoznatim antigenima, a stvaraju ih limfociti B, odnosno plazma-stanice te su nositelji humoralne imunosti. Sva protutijela pripadaju jednom od pet imunoglobulinskih razreda: IgA, IgD, IgE, IgG ili IgM. Kod IgG protutijela razlikuju se podrazredi IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (8).

U procesu imunizacije razlikuju se primarni i sekundarni imunološki odgovor (8). Primarni se odgovor događa u trenutku prvoga susreta s nepoznatim antigenom kada počinje stvaranje protutijela IgM razreda. U drugoj fazi dolazi do stvaranja IgG protutijela. Kod idućega kontakta s

istim antigenom zbog memorijskih limfocita dolazi do bržega odgovora obilježenoga velikim porastom protutijela IgG razreda (9).

Klinički su značajna protutijela koja reagiraju na temperaturi višoj od 30 °C, odnosno na temperaturi tijela. Aloprotutijela nastaju u kontaktu sa stranim antigenima, a protutijela koja reagiraju na vlastite antigene nazivaju se autoantitijelima, a iregularna se antieritrocitna protutijela otkrivaju indirektnim antiglobulinskim testom (IAT) ili indirektnim Coombs testom (2).

IgM protutijela nastaju imunizacijom antigena iz okoliša, ne prolaze kroz posteljicu djeteta te postaju klinički značajna samo kada aktiviraju komplement. Najbolje reagiraju na temperaturi od + 4 °C do + 20 °C te ih se naziva još i hladnim protutijelima. Kod čovjeka uzrokuju intravaskularnu hemolizu, a antieritrocitna protutijela IgM specifičnosti su anti-A, anti-B, anti-AB, anti-Le a, anti-P (1).

IgG protutijela nastaju imunizacijom u trudnoći ili nakon transfuzije nekompatibilnom dozom eritrocita. Njihova pojavnost ovisi o količini i imunogenosti antigena te genetskoj predispoziciji pacijenta za odgovor imunološkoga sustava. IgG protutijela najbolje reagiraju na 37 °C te ih se naziva još i toplim protutijelima, a uzrokuju ekstravaskularnu hemolizu. Komplement mogu i ne moraju aktivirati, a zbog svoje veličine, mogu prelaziti u posteljicu djeteta te uzrokuju HBFN. Najvažnija su antieritrocitna protutijela IgG specifičnosti anti-Rh, anti-Kell, anti-Duffy, anti-Kidd (3).

1.4. Rutinska imunohematološka obrada pacijenta i trudnica

Imunohematološka obrada započinje i završava točnom identifikacijom pacijenta ili trudnice. Značajan je uzrok štetnih učinaka transfuzije greška kod identifikacije pacijenta čime se može dovesti do netočnoga određivanja krvne grupe i primjene inkompatibilnoga krvnog pripravka. U rutinskoj imunohematološkoj obradi određuju se ABO i Rh krvna grupa, IAT, direktni antiglobulinski test (DAT) te križna proba.

ABO krvna grupa određuje se hemotestom odnosno ispitivanjem prisutnosti A, B ili AB antigena na eritrocitu te eritrottestom, odnosno ispitivanjem prisutnosti anti-A i/ili anti-B protutijela u plazmi/serumu čovjeka. Kod novorođenčadi i djece do šest mjeseci starosti krvna grupa se određuje samo hemotestom, jer protutijela nisu još razvijena, a u plazmi se djeteta mogu

detektirati majčina protutijela. Također, kod imunodeficientnih pacijenata moguća je slabija ekspresija izohemaglutinina (3). Uz ABO, određuje se i Rh krvna grupa.

IAT ispituje postoji li neočekivano protutijelo na eritrocitne antigene u plazmi/serumu pacijenta te je najosjetljiviji test u dokazivanju protutijela. Ispitivanje IAT-a obvezno je kod bolesnika prije transfuzije, u trudnoći, kod dobrovoljnih darivatelja krvi. Prepoznavanjem imuniziranoga pacijenta otklanja se opasnost od PTHR-a, a najčešći je uzrok PTHR-a upravo prisutnost protutijela. Nakon otkrivanja pozitivnoga IAT-a, potrebno je odrediti kliničku značajnost protutijela (temperaturni optimum i specifičnost) te se potom može odabrati kompatibilan krvni pripravak (3).

DAT ispituje postoji li vezano protutijelo ili komplement na eritrocitima pacijenta/trudnice. Kako bi dokazali protutijelo vezano na eritrocite, eritrocite je potrebno oprati tri do šest puta u fiziološkoj otopini radi uklanjanja nevezanih protutijela i eventualno nečistoća koje bi mogle praviti smetnje pri očitavanju rezultata (10). IgG protutijela i/ili C3 komponente komplemента vezane na eritrocite dokazuju se polispecifičnim antihumanim globulinom (AHG). DAT se izvodi rutinski kod novorođenčadi te kod HBN-a, poslijetransfuzijske hemolitičke reakcije (PTR) i autoimune hemolitičke anemije (2).

Imunohematološko ispitivanje određivanja ABO i Rh krvne grupe te IAT-a rutinski se provodi prije transfuzijskog liječenja pacijenata i kod svake trudnice između 10. i 12. tjedna trudnoće. Kod svake RhD negativne trudnice, ukoliko je IAT ranije bio negativan, preporuča se ponoviti testiranje u 28. tjednu trudnoće (2).

Ukoliko je kod trudnice pozitivan IAT, određuje se specifičnost protutijela, klasa, temperaturni optimum i titar (količina) protutijela. Ako je protutijelo klinički značajno, svaka četiri tjedna preporuča se ponoviti imunohematološku obradu, a po potrebi i češće. Kliničkom obradom i nadzorom ginekolog procjenjuje i prevenira mogući razvoj HBFN-a (7). Nakon poroda određuje se ABO i Rh krvna grupa majke i djeteta te se provjerava IAT majke, dok se kod djeteta izvodi DAT. Ukoliko je DAT pozitivan, potrebno je napraviti titar DAT-a te po mogućnosti eluciju i identifikaciju protutijela u eluatu (2).

Križna je proba imunohematološko ispitivanje između eritrocita davatelja i plazme pacijenta, a s kojom se ispituje kompatibilnost krvnoga pripravka i pacijenta. Test se izvodi metodom IAT-a u

mikrokarticama, a rezultat križne probe mora biti negativan, što znači da se u plazmi pacijenta ne nalaze protutijela koja reagiraju na eritrocitne antigene darivatelja. Rezultat može biti lažno negativan kada je titar protutijela prenizak ili ukoliko laboratorijski test nije dovoljno osjetljiv. Ukoliko se pacijentu ne može naći odgovarajući koncentrat eritrocita i sve su križne probe pozitivne, tada kliničar procjenjuje je li transfuzija neophodna te koja će se doza krvi izdati (2).

U hitnim stanjima kada je pacijent vitalno ugrožen, izvodi se tzv. skraćena križna proba u kojoj se ispituje samo podudarnost ABO sustava (2).

1.5. Poslijetransfuzijska reakcija

PTR je svaka neželjena reakcija koja se javi tijekom ili nakon transfuzije, a postoji sumnja da je vezana uz transfuziju krvnoga pripravka. Javljaju se u 1 – 3 % bolesnika koji su primili krvni pripravak (3). Moguće PTR mogu biti imunološke (hemolitičke) i neimunološke reakcije. U nehemolitičke se reakcije ubrajaju preopterećenje kardiovaskularnoga sustava, hiperkalijemija, prijenos virusa (hepatitisa, HIV-a itd.), sifilisa, protozoa (npr. malarije) ili drugih uzročnika za koje se ne provodi rutinsko testiranje (2).

Akutna PTHR nastaje tijekom ili do 24 sata nakon transfuzije. Može se očitovati kao dispneja, tahikardija, tresavica, bol u leđima, temperatura, DIK, hipotenzija, smanjena diureza ili anurija. U laboratorijskim je nalazima smanjena razina hemoglobina, povišen bilirubin i LDH, prisutna sferocitoza i hemoglobinurija (11).

Odgodena PTHR može se pojaviti 1 – 28 dana nakon transfuzije kao neočekivani pad razine hemoglobina, ikterus i taman urin. U laboratorijskim je nalazima smanjena razina hemoglobina, povišen bilirubin i LDH, prisutna sferocitoza te je u urinu prisutan urinobilinogen (1).

1.6. Hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta

HBFN nastaje kao posljedica razgradnje eritrocita protutijelima koja su prošla kroz posteljicu (2). Tijekom trudnoće, žena se može imunizirati na eritrocitne antigene djeteta koje je dijete naslijedilo od oca. U prvoj trudnoći rizik imunizacije povezan je s invazivnim zahvatima kao što je amniocenteza ili punkcija pupkovine. U trećem tromjesečju događa se fetomaternalno krvarenje. Žene koje su tijekom života primale eritrocitne krvne pripravke također mogu biti imunizirane na strani eritrocitni antigen (12).

HBFN se može prezentirati kao umjerena anemija, fetalni hidrops ili intrauterina smrt. Kod novorođenčeta se imunohematološkom obradom dobije pozitivan DAT, a najčešća su protutijela koja uzrokuju HBFN anti-D, anti-c, anti-E, anti-Kell, anti-C (2).

Prevenција HBFN kod RhD negativnih trudnica koje nisu već imunizirane, provodi se primjenom 250 – 300 µg hiperimunog Rh gamaglobulina 24 – 72 sata nakon poroda ili svakog mogućeg senzibilizirajućega događaja tijekom trudnoće (7).

2. CILJ

Ciljevi su rada:

- ispitati koliki je udio pozitivnih IAT-a u rutinskome testiranju
- ispitati specifičnost i frekvenciju aloprotutijela na eritrocitne antigene u rutinskoj prijetransfuzijskoj obradi
- ispitati frekvenciju i specifičnost pojedinih aloprotutijela ovisno o dobi i spolu
- ispitati postoji li razlika u udjelu pozitivnoga IAT-a ovisno o dobi i spolu
- ispitati postoji li razlika u frekvenciji pojedinoga protutijela ovisno o ABO i Rh sustavu
- ispitati frekvenciju i specifičnost pojedinih aloprotutijela ovisno o anamnestičkim podacima
- ispitati postoji li povezanost pojedinoga protutijela s dobi, spolom ili anamnestičkim podacima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno po principu presječne studije iz povijesnih podataka (13).

3.2. Materijal istraživanja

Materijale istraživanja čine podatci dostupni iz povijesnih podataka Odjela za transfuzijsku medicinu u Općoj županijskoj bolnici Vinkovci. Podatci koji su korišteni za izradu istraživanja, prikupljeni su u razdoblju od siječnja 2016. do prosinca 2020. godine. Kriteriji su uključivanja svi pacijenti s pozitivnim IAT-om, dok su kriteriji isključenja svi pacijenti s pozitivnim DAT-om. Iz dostupne medicinske dokumentacije preuzeti su podatci o spolu, dobi, ABO i Rh krvnoj grupi te anamnestičkim podatcima (transfuzije, prethodne trudnoće) pacijenata.

3.3. Metode

Uzorci za izvođenje IAT-a uzorkovani su u epruvetu s ljubičastim čepom s antikoagulantnom etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA). Metode imunohematoloških ispitivanja, odnosno IAT-a, provedene su automatskim analizatorom Wadiana (Grifols, Španjolska) te ručnom metodom s ID-Card LISS/Coombs mikrokarticama (BioRad, SAD).

Materijali potrebni za izvođenje IAT-a putem analizatora Wadiana, Grifols:

- mikrokartice DG Gel Coombs (AHG mikrokartice)
- 0,8 % testni eritrociti Serascan Diana 2/2P
- Diluent DG Gel Sol
- DG Fluid A i DG Fluid B
- svježa plazma pacijenta.

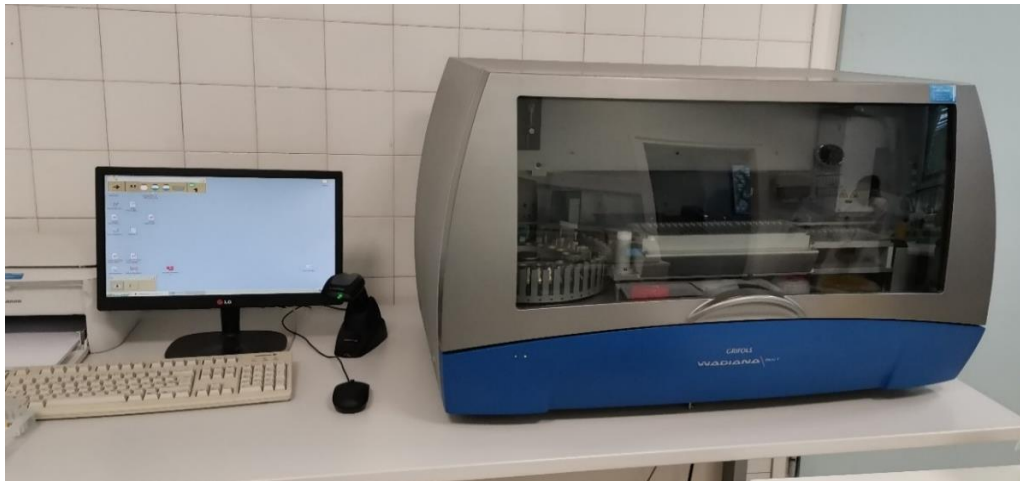
Izvođenje IAT-a analizatorom Wadiana, Grifols:

- analizator ukapa 50 μ L testnih eritrocita
- zatim ukapa 25 μ L plazme pacijenta
- potom stavlja mikrokarticu u inkubator na 15 minuta, 37 °C
- centrifugira karticu 10 minuta.

Analizator rezultat očitava kao negativan (0) ili pozitivan (+/-, 1 +, 2 +, 3 +, 4 +).

Jačina se reakcije kod pozitivnoga IAT-a očitava kao:

- 1 + aglutinacija eritrocita u donjoj polovici mikrostupca
- 2 + eritrociti raspršeni po mikrostupcu
- 3 + eritrociti raspršeni u gornjoj polovici mikrostupca
- 4 + čvrsti sloj eritrocita kao traka na površini gela mikrokartice.



Slika 1. Analizator Wadiana, Grifols (fotografirala autorica)

Mikrostupci ID-kartice LISS/Coombs sadrže polispecifični AHG te se koriste kod pretraživanja protutijela i u njihovoj identifikaciji.

Materijali potrebni za izvođenje IAT-a ručnom metodom pomoću mikrokartica:

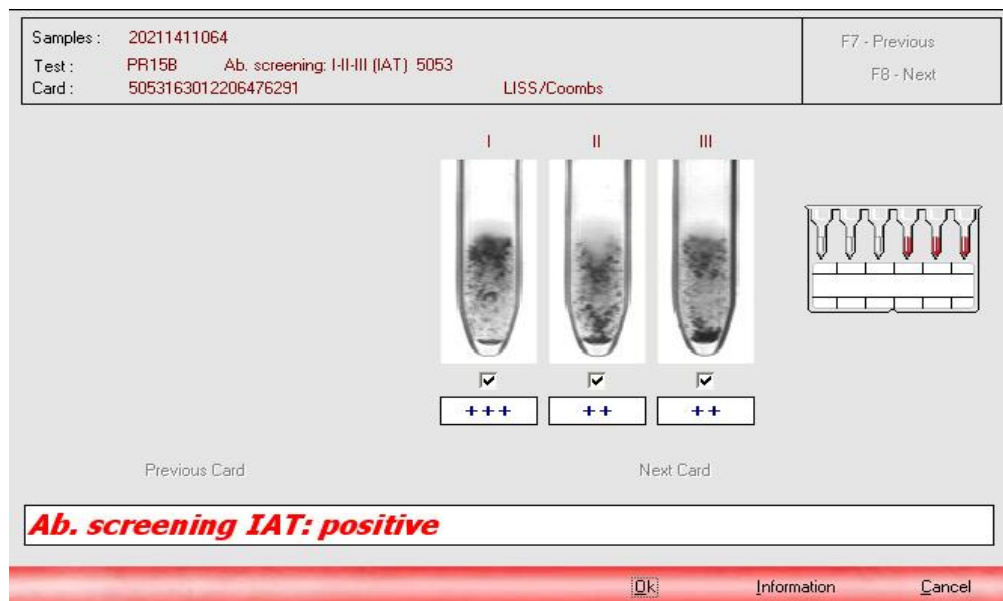
- mikrokartice ID Card LISS/Coombs
- 0,8 % testni eritrociti ID-DiaCell I-II, ID-DiaCell I-II-III, ID-DiaPanel
- DiaMed inkubator (37 °C)
- DiaMed centrifuga
- mikropipete od 25 μ L i 50 μ L
- svježa plazma pacijenta.

Izvođenje testa:

- mikropipetom ukapati 50 μ L 0,8 % ID-DiaCell I-II (dvostanični panel) testne eritrocite u mikrostupce
- u iste mikrostupce mikropipetom ukapati 25 μ L plazme pacijenta
- inkubirati 15 minuta na 37 °C
- centrifugirati 10 minuta.

Mikrokartice se očitavaju pomoću čitača Banjo ID-reader te pod povećalom na bijeloj podlozi. Ukoliko je izostala pozitivna reakcija (vidljiv kompaktni talog stanica na dnu mikrostupca), IAT se proglašava negativnim. Ukoliko je prisutna pozitivna reakciju (stvoreni sloj stanica na površini gela ili raspršene stanice kroz gel), rezultat se proglašava pozitivnim te se nastavlja imunohematološko ispitivanje.

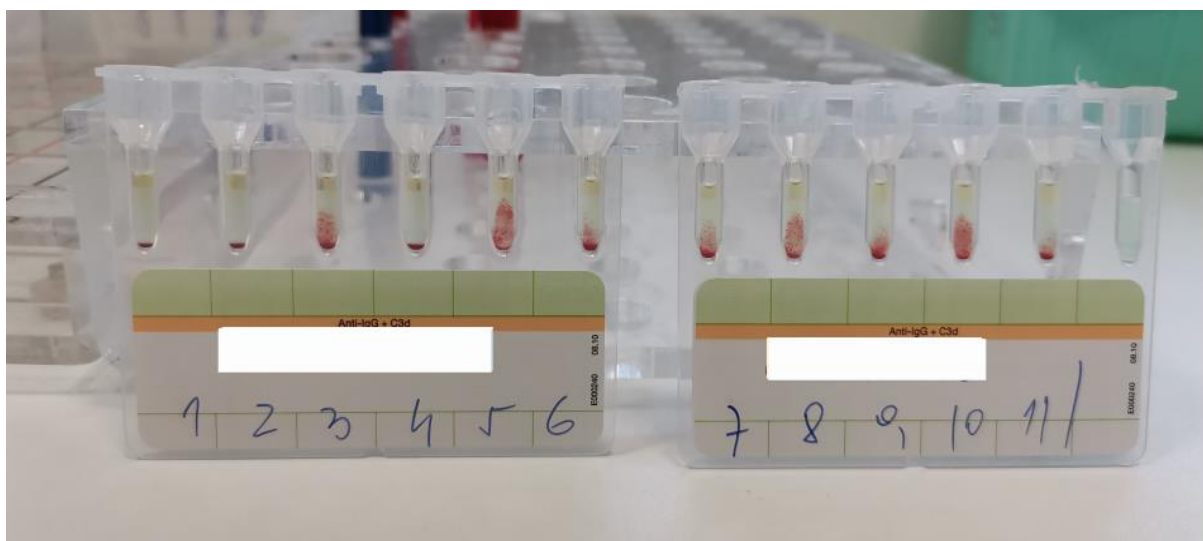
Daljnje se ispitivanje provodi jednakim postupnikom, ali koristeći 0,8 % eritrocite ID-DiaCell I-II-III (trostanični panel), ID-DiaPanel (jedanaestostanični panel). Nakon ukapavanja testnih eritrocita i plazme pacijenta, mikrokartice se inkubiraju 15 minuta na 37 °C te se centrifugiraju kroz 10 minuta. Zatim se mikrokartice očitavaju te se pomoću panela pretražuju i identificiraju protutijela.



Slika 2. Očitavanje mikrokartice pomoću Banjo ID-readera (fotografirala autorica)



Slika 3. Prikaz negativnoga trostaničnog panela (fotografirala autorica)



Slika 4. Prikaz pozitivnoga jedanaestostaničnog panela (fotografirala autorica)

3.4. Statističke metode

U provedenom su istraživanju kategorijalni podatci prikazani apsolutnim i relativnim frekvencijama. Normalnost je raspodjele varijabli testirana Shapiro-Wilk testom. Testiranje je značajnosti razlika između varijabli učinjeno χ^2 testom. Za interpretaciju su statističke značajnosti razlika sve P vrijednosti prikazane s oba kraja raspodjele. Unaprijed određena granična razina značajnosti postavljena je na $P = 0,05$. Za testiranje je povezanosti između određenih varijabli korišten Spearmanov koeficijent povezanosti. Statistička je obrada podataka provedena pomoću programa SPSS Statistics 23 (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

4. REZULTATI

U istraživanju su analizirani podatci testiranja krvnih grupa 238 pacijenata medijalne dobi 62 godine, najmlađi je pacijent imao tri godine, a najstariji 95 godina. Od ukupno testiranih krvnih grupa u vremenskome razdoblju od pet godina, bilo je ukupno 238 (0,86 %) pozitivnih IAT-a.

U tablici 1 prikazan je broj pozitivnih IAT-a u odnosu na ukupan broj testiranih krvnih grupa u razdoblju 2016. – 2020. godine.

Tablica 1. Udio pozitivnih IAT-a u odnosu na ukupan broj testiranih krvnih grupa kroz razdoblje od pet godina

Godina testiranja	Broj ukupno testiranih KG	Pozitivan IAT (%)
2016.	5 595	41 (0,73)
2017.	5 533	42 (0,76)
2018.	5 202	48 (0,92)
2019.	5 843	57 (0,98)
2020.	5 053	50 (0,99)
Ukupno	27 626	238 (0,86)

U tablici 2 prikazani su udjeli pozitivnih IAT-a ovisno o spolu, dobi i podacima odakle je pacijent upućen na testiranje krvne grupe (ambulantno ili odjelno).

Tablica 2. Raspodjela sudionika prema osnovnim obilježjima

	Osnovna obilježja	N (%)
Spol	Muškarci	71 (29,8)
	Žene	167 (70,2)
Dobne skupne	0 – 15	9 (3,8)
	16 – 30	12 (5)
	31 – 50	45 (19)
	51 – 70	90 (37,8)
	71 – 95	82 (34,4)
Odjeli	Vanjski pacijenti	98 (41,2)
	Interni odjel	42 (17,6)
	Opća kirurgija	33 (13,9)
	Traumatologija	25 (10,5)
	Ginekologija	9 (3,8)
	Jedinica intenzivnog liječenja	6 (2,5)
	Urologija	6 (2,5)
	Ortopedija	5 (2,1)
	Objedinjeni hitni bolnički prijem	4 (1,7)
	Kirurška ambulanta	3 (1,3)
	Rodilište	2 (0,8)
	Infektologija	2 (0,8)
	Pedijatrija	1 (0,4)
	Hemodijaliza	1 (0,4)
	Neurologija	1 (0,4)

Od ukupnoga su broja pacijenata s pozitivnim IAT-om 70 % žene. Prema dobnim je skupinama najviše pacijenata u dobnoj skupini 51 – 70 godina, a većina je pacijenata s pozitivnim IAT-om u trenutku testiranja hospitalizirana, od toga najviše njih na Internome odjelu.

U promatranome je vremenskom razdoblju najčešće potvrđeno protutijelo anti-D, frekvencije ostalih protutijela prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Frekvencija pojedinoga protutijela prema specifičnosti u promatranome vremenskom razdoblju

	Protutijelo	Frekvencija (%)
Vrsta protutijela	Anti-D	75 (28,6)
	Anti-E	45 (17,2)
	Anti-K	40 (15,3)
	Anti-M	27 (10,3)
	Nespecifična protutijela	23 (8,8)
	Anti-C	17 (6,5)
	Anti-c	7 (2,7)
	Anti-Le a	6 (2,3)
	Anti-Jk a	6 (2,3)
	Anti-Cw	4 (1,5)
	Anti-Fy a	4 (1,5)
	Anti-S	3 (1,1)
	Anti-Fy b	1 (0,4)
	Anti-Le b	1 (0,4)
	Anti-CROV	1 (0,4)
	Anti-e	1 (0,4)
	Anti-P	1 (0,4)
	Ukupno	262 (100)

Kod 24 pacijenta utvrđena je prisutnost dva protutijela (tablica 4).

Tablica 4. Udio sudionika u ovisnosti o utvrđenome jednom ili dva protutijela

Broj protutijela	Frekvencija (%)
Dva protutijela	24 (10,1)
Jedno protutijelo	214 (89,9)
Ukupno	238 (100)

U promatranome razdoblju opaženo je da je 2019. godine bilo nešto više muškaraca s pozitivnim IAT-om u odnosu na ostale godine (tablica 5).

Tablica 5. Udio muškaraca s pozitivnim IAT-om prema razdoblju testiranja

Spol	Godina zaprimanja uzorka	Frekvencija (%)
Muškarci	2016.	8 (11,3)
	2017.	12 (16,9)
	2018.	12 (16,9)
	2019.	25 (35,2)
	2020.	14 (19,7)
	Ukupno	71 (100)

U promatranome razdoblju opaženo je da je 2018. i 2020. godine bilo nešto više žena s pozitivnim IAT-om u odnosu na ostale godine (tablica 6).

Tablica 6. Udio žena s pozitivnim IAT-om prema razdoblju testiranja

Spol	Godina zaprimanja uzorka	Frekvencija (%)
Žensko	2016.	33 (19,8)
	2017.	30 (18,0)
	2018.	36 (21,6)
	2019.	32 (19,2)
	2020.	36 (21,6)
	Ukupno	167 (100)

Na ukupnome je broju pacijenata, i kod muškaraca i žena, najčešće potvrđeno protutijelo anti-D. Ostala su protutijela s obzirom na spol prikazana u tablici 7.

Tablica 7. Frekvencija pojedinoga protutijela s obzirom na spol

Spol	Protutijelo	Frekvencija (%)
Muškarci	Anti-D	21 (25,9)
	Anti-E	17 (21,0)
	Anti-K	10 (12,3)
	Anti-M	9 (11,1)
	Nespecifična protutijela	9 (11,1)
	Anti-C	6 (7,4)
	Anti-Cw	2 (2,5)
	Anti-Le a	2 (2,5)
	Anti-c	1 (1,2)
	Anti-Jk a	1 (1,2)
	Anti-Fy a	1 (1,2)
	Anti-S	1 (1,2)
	Anti-Fy b	1 (1,2)
Žene	Anti-D	54 (29,8)
	Anti-K	30 (16,6)
	Anti-E	28 (15,5)
	Anti-M	18 (9,9)
	Nespecifična protutijela	14 (7,7)
	Anti-C	11 (6,1)
	Anti-c	6 (3,3)
	Anti-Jk a	5 (2,8)
	Anti-Le a	4 (2,2)
	Anti-Fy a	3 (1,7)
	Anti-Cw	2 (1,1)
	Anti-S	2 (1,1)
	Anti-CROV	1 (0,6)
Anti-P	1 (0,6)	
Anti-e	1 (0,6)	
Anti-Le b	1 (0,6)	

U dobnoj je skupini 0 – 15 godina najčešće potvrđeno protutijelo anti-M (tablica 8).

Tablica 8. Frekvencija pojedinoga protutijela u dobnoj skupini 0 – 15

	Protutijelo	Frekvencija (%)
Vrsta protutijela	Anti-M	5 (55,6)
	Nespecifična protutijela	2 (22,2)
	Anti-c	1 (11,1)
	Anti-P	1 (11,1)

U dobnoj je skupini 16 – 30 godina najčešće potvrđeno protutijelo anti-M (tablica 9).

Tablica 9. Frekvencija pojedinoga protutijela u dobnoj skupini 16 – 30

	Protutijelo	Frekvencija (%)
Vrsta protutijela	Anti-M	4 (30,8)
	Nespecifična protutijela	3 (23,1)
	Anti-E	3 (23,1)
	Anti-D	1 (7,7)
	Anti-S	1 (7,7)
	Anti-Le a	1 (7,7)

U dobnj je skupini 31 – 50 godina najčešće protutijelo anti-E (tablica 10).

Tablica 10. Frekvencija pojedinoga protutijela u dobnj skupini 31 – 50

	Protutijelo	Frekvencija (%)
Vrsta protutijela	Anti-E	13 (27,1)
	Anti-D	9 (18,8)
	Anti-M	6 (12,5)
	Nespecifična protutijela	4 (8,3)
	Anti-K	4 (8,3)
	Anti-c	3 (6,3)
	Anti-Jk a	2 (4,2)
	Anti-Le a	2 (4,2)
	Anti-C	1 (2,1)
	Anti-Le b	1 (2,1)
	Anti-Cw	1 (2,1)
	Anti-e	1 (2,1)
	Anti-S	1 (2,1)

U dobnj je skupini 51 – 70 godina najčešće potvrđeno protutijelo anti-D (tablica 11).

Tablica 11. Frekvencija pojedinoga protutijela u dobnj skupini 51 – 70

	Protutijelo	Frekvencija (%)
Vrsta protutijela	Anti-D	28 (26,9)
	Anti-K	19 (18,3)
	Anti-E	17 (16,3)
	Anti-M	9 (8,7)
	Nespecifična protutijela	8 (7,7)
	Anti-C	8 (7,7)
	Anti-Fy a	3 (2,9)
	Anti-Le a	3 (2,9)
	Anti-Jk a	3 (2,9)
	Anti-Cw	2 (1,9)
	Anti-c	2 (1,9)
	Anti-Fy b	1 (1,0)
	Anti-CROV	1 (1,0)

U dobnoj je skupini 71 – 95 godina najčešće potvrđeno protutijelo anti-D (tablica 12).

Tablica 12. Frekvencija pojedinoga protutijela u dobnoj skupini 71– 95

	Protutijelo	Frekvencija (%)
Vrsta protutijela	Anti-D	37 (42,0)
	Anti-K	17 (19,3)
	Anti-E	12 (13,6)
	Anti-C	8 (9,1)
	Nespecifična protutijela	6 (6,8)
	Anti-M	3 (3,4)
	Anti-Cw	1 (1,1)
	Anti-Jk a	1 (1,1)
	Anti-S	1 (1,1)
	Anti-c	1 (1,1)
	Anti-Fy a	1 (1,1)

Analizom je opisana značajna razlika u specifičnosti protutijela ovisno o dobnoj skupini pacijenta ($\chi^2 = 75,392$, uz $df = 56$ i $P = 0,04$), što je prikazano u tablici 13.

Tablica 13. Testiranje značajnosti razlika po vrsti protutijela s obzirom na pripadanje određenoj dobnoj skupini i spolu

	χ^2	df	P
Spol	7,137	14	0,92
Dobne skupine	75,392	56	0,04

* χ^2 test

Prema ABO sustavu krvnih grupa pozitivan IAT najčešće je dokazan kod krvne grupe A s frekvencijom 37,4 % (tablica 14).

Tablica 14. Raspodjela pozitivnih IAT-a prema ABO sustavu krvnih grupa

	ABO krvna grupa	Frekvencija (%)
ABO sustav	A	89 (37,4)
	B	48 (20,2)
	AB	19 (8,0)
	O	82 (34,5)
	Ukupno	238 (100)

Kod pacijenata A, AB i O krvne grupe najčešće je potvrđeno protutijelo anti-D, dok je kod pacijenata s krvnog grupom B, anti-E. Raspodjela je ostalih protutijela s obzirom na ABO sustav krvnih grupa prikazana u tablici 15.

Tablica 15. Udio pojedine vrste protutijela s obzirom na krvnu grupu ABO sustava

ABO krvna grupa	Protutijelo	Frekvencija (%)
A	Anti-D	28 (29,5)
	Anti-E	17 (17,9)
	Anti-K	14 (14,7)
	Anti-M	10 (10,5)
	Nespecifična protutijela	8 (8,4)
	Anti-C	5 (5,3)
	Anti-c	3 (3,2)
	Anti-Jk a	3 (3,2)
	Anti-Cw	2 (2,1)
	Anti-S	2 (2,1)
	Anti-Le a	2 (2,1)
B	Anti-CROV	1 (1,1)
	Anti-E	12 (22,6)
	Anti-K	10 (18,9)
	Anti-D	10 (18,9)
	Anti-M	6 (11,3)
	Nespecifična protutijela	4 (7,5)
	Anti-C	2 (3,7)
	Anti-Fy b	1 (1,9)
	Anti-c	1 (1,9)
	Anti-Cw	1 (1,9)
	Anti-S	1 (1,9)
	Anti-Fy a	1 (1,9)
	Anti-e	1 (1,9)
	Anti-P	1 (1,9)
Anti-Jk a	1 (1,9)	
Anti-Le a	1 (1,9)	
AB	Anti-D	11 (45,8)
	Anti-E	4 (16,7)
	Anti-K	2 (8,3)
	Anti-C	2 (8,3)
	Nespecifična protutijela	2 (8,3)
	Anti-Le b	1 (4,2)
	Anti-Fy a	1 (4,2)
	Anti-c	1 (4,2)
O	Anti-D	26 (28,9)
	Anti-K	14 (15,6)
	Anti-E	12 (13,3)
	Anti-M	11 (12,2)
	Nespecifična protutijela	9 (10,0)
	Anti-C	8 (8,9)
	Anti-Le a	3 (3,3)
	Anti-c	2 (2,2)
	Anti-Jk a	2 (2,2)
	Anti-Fy a	2 (2,2)
	Anti-Cw	1 (1,1)

Prema Rh je sustavu pozitivan IAT imalo 61,3 % RhD pozitivnih pacijenata (tablica 16).

Tablica 16. Raspodjela pozitivnih IAT-a prema Rh sustavu krvnih grupa

	Rh krvna grupa	Frekvencija (%)
Rh sustav	RhD pozitivan	146 (61,3)
	RhD negativan	92 (38,7)
	Ukupno	238 (100)

Kod RhD je pozitivnih pacijenata najčešće protutijelo anti-E, dok je kod RhD negativnih anti-D. Raspodjela je ostalih protutijela s obzirom na RhD antigen prikazana u tablici 17.

Tablica 17. Udio pojedine vrste protutijela s obzirom RhD antigen pacijenta

RhD antigen	Protutijelo	Frekvencija (%)
RhD pozitivan	Anti-E	42 (27)
	Anti-K	35 (22,4)
	Anti-M	24 (15,4)
	Nespecifična protutijela	20 (12,8)
	Anti-c	7 (4,5)
	Anti-Le a	5 (3,2)
	Anti-C	4 (2,6)
	Anti-Cw	4 (2,6)
	Anti-Jk a	4 (2,6)
	Anti-Fy a	4 (2,6)
	Anti-S	2 (1,3)
	Anti-Le b	1 (0,6)
	Anti-Fy b	1 (0,6)
	Anti-CROV	1 (0,6)
	Anti-P	1 (0,6)
	Anti-e	1 (0,6)
RhD negativan	Anti-D	75 (70,8)
	Anti-C	13 (12,3)
	Anti-K	5 (4,7)
	Nespecifična protutijela	3 (2,8)
	Anti-E	3 (2,8)
	Anti-M	3 (2,8)
	Anti-Jk a	2 (1,9)
Anti-S	1 (0,9)	
	Anti-Le a	1 (0,9)

Analizom je anamnestičkih podataka o primanju transfuzije, 61,9 % muškaraca i 32,9 % žena dalo podatak da su tijekom života primali krv. Ostatak je anamnestičkih podataka prikazan u tablici 18 i tablici 19.

Tablica 18. Prikaz broja prethodno transfundiranih sudionika istraživanja

	Anamneza	Frekvencija (%)
Transfuzija	Prethodno transfundiran	99 (41,6)
	Nije transfundiran	83 (34,9)
	Podatak nije poznat	56 (23,5)
	Ukupno	238 (100)

Tablica 19. Prikaz broja prethodno transfundiranih sudionika istraživanja s obzirom na spol

Spol	Anamneza	Frekvencije (%)
Muško	Prethodno transfundiran	44 (61,9)
	Nije transfundiran	12 (16,9)
	Podatak nije poznat	15 (21,1)
	Ukupno	71 (100)
Žensko	Prethodno transfundiran	55 (32,9)
	Nije transfundiran	71 (42,5)
	Podatak nije poznat	41 (24,6)
	Ukupno	167 (100)

U tablici 20 prikazani su anamnestički podatci žena s pozitivnim IAT-om.

Tablica 20. Udio imuniziranih ženskih sudionika koje su bile trudne ili prethodno transfundirane

Anamneza	N (%)
Trudnoća	63 (37,7)
Prethodno transfundirana	5 (3)
Trudnoća i prethodno transfundirana	50 (30)
Nije trudna i nije prethodno transfundirana	8 (4,8)
Podatci nepoznati	41 (24,5)
Ukupno	167 (100)

Razlika u stvaranju određene vrste protutijela s obzirom na podatak o prethodnoj transfuziji krvi, statistički je značajna ($\chi^2 = 48,657$, $df = 28$, $P < 0,05$) (tablica 21).

Tablica 21. Testiranje značajnosti razlika u vrsti protutijela s obzirom na prethodnu transfuziju ili trudnoću kod ženskih sudionika istraživanja

Anamneza	χ^2	df	P
Trudnoća	19,099	24	0,74
Prethodna transfuzija	48,657	28	0,01

* χ^2 test

U tablici 22 prikazani su koeficijenti korelacije pojedinih varijabli s pojavom određenoga protutijela. Opisana je značajna pozitivna povezanost određenoga protutijela s prethodnom transfuzijom ($\rho = 0,132$), dok za ostale varijable nije dobivena značajna povezanost.

Tablica 22. Korelacije pojedinih varijabli s vrstom protutijela

Anamneza	Udio određene vrste protutijela (ρ)
Prehodna transfuzija	0,132
Trudnoća	0,045
Abortus	0,007
AB0	0,035
Rh	0,068

Od ukupnoga broja pozitivnih IAT-a, 18 je žena u trenutku testiranja bilo trudno. Protutijela koja su dokazana kod ovih trudnica prikazana su u tablici 23.

Tablica 23. Udio sudionica koje su trenutno trudne iz ukupnoga udjela i prikaz vrsta protutijela prema učestalosti pojavljivanja

	Protutijelo kod trudnice	N (%)
Vrsta protutijela	Anti-M	5 (27,8)
	Nespecifična protutijela	4 (22,2)
	Anti-D	3 (16,7)
	Anti-Le a	2 (11,1)
	Anti-K	1 (5,6)
	Anti-E	1 (5,6)
	Anti-c	1 (5,6)
	Anti-S	1 (5,6)

5. RASPRAVA

U ovome je radu ispitivan udio i specifičnost protutijela na eritrocitne antigene u rutinskoj prijetransfuzijskoj obradi tijekom petogodišnjega razdoblja. U sestrinskoj je praksi ovo područje važno zbog pravovremenoga otkrivanja protutijela koja bi mogla ugroziti pacijenta tijekom transfundiranja krvnih pripravaka koji bi doveli do PTHR-a. Također, ono je važno zbog praćenja trudnica i prevencije HBFN uzrokovane protutijelima majke te je za medicinsku sestru nužno poznavanje tehnike izvođenja testova kako bi se izbjegli lažno negativni rezultati.

Istraživanje koje su proveli Erikstein i sur. u Norveškoj, a koje je provedeno u svrhu otkrivanja učestalosti i specifičnosti antieritrocitnih protutijela, pokazalo je na uzorku od 55 462 osobe, kako je 0,73 % imalo pozitivan IAT (14). Prema Karafinu i sur., u SAD-u na uzorku od dva milijuna osoba, 0,77 % ih je bilo IAT pozitivno (15). Prema Reyhanehu i sur., u Iranu je na uzorku od 3 092 pacijenta, njih 1 % imalo pozitivan IAT (16). U ovome je istraživanju na uzorku od 27 626 pacijenata 0,86 % IAT pozitivno, što je slično rezultatima iz dostupne literature.

Uspoređujući pozitivan IAT prema spolu, Mo i sur. proveli su istraživanje u Kini koje je pokazalo kako je 30,5 % muškaraca i 69,5 % žena bilo IAT pozitivno, što je usporedivo s podacima ovoga istraživanja (17). Istraživanje koje su proveli Reyhaneh i sur. također je pokazalo veću prevalenciju IAT pozitivnih žena (67 %) u odnosu na muškarce (16). Zaman i sur. među ispitanicima u Indiji dobili su rezultate kako je 64 % žena IAT pozitivno te je dokazana statistički značajna razlika pojave antieritrocitnih protutijela između muškaraca i žena ($P < 0,05$) (18).

Karafin i sur. proveli su istraživanje 2018. godine na uzorku od 6 597 osoba. Promatrajući dob ispitanika zamijećeno je da je među starijim dobnim skupinama veći udio pacijenata imuniziranih na eritrocitne antigene. Naime, u dobnoj je skupini do 10 godina 5,8 % djece imalo pozitivan IAT, u skupini 20 – 30 godina 7,2 %, u skupini 51 – 70 godina 40 % te u skupini starijih od 81 godine 21,6 %. Veći udio imuniziranih pacijenata u starijim dobnim skupinama vjerojatno je posljedica transfuzijskoga liječenja te su rezultati usporedivi s rezultatima ovoga istraživanja jer je 72 % ispitanika starijih od 51 godinu imunizirano. U istome je istraživanju najmanje osoba u dobnoj skupini do 30 godina, dok je najviše IAT pozitivnih osoba u dobnoj skupini 51 – 70 godina. Kod 22,9 % ispitanika identificirana su dva protutijela, što je u odnosu na ovo istraživanje (10,1 %) veći udio, iako je uzorak manji (19).

Prema ranije navedenom istraživanju Mo i sur., analiziran je udio pozitivnoga IAT-a ovisno o ABO sustavu krvne grupe pacijenata te su zaključili da je najveći udio pacijenata krvne grupe O (46 %), zatim B (27 %), A (22 %) te AB (5 %) (17). Prema Torunu i sur., u Turskoj je najčešće pozitivan IAT dokazan kod krvne grupe A (45 %), O (31 %), B (17 %) te AB (7 %) (20). Prema ovim se podacima može zaključiti kako učestalost pozitivnoga IAT-a, prema ABO krvnim grupama, odgovara zastupljenosti ABO eritrocitnih antigena s obzirom na populaciju koja se promatra.

Nadalje, prema Torunu i sur., na uzorku je od 48 750 ispitanika u Turskoj, njih 88 % bilo RhD pozitivno, dok je 12 % bilo RhD negativno (20). Također, prema Enko i sur., među pacijentima je ispitivanima u Austriji 84,5 % bilo RhD pozitivno, dok je 15,5 % RhD negativno (21). Uspoređujući ove podatke s podacima dobivenima u ovome istraživanju, rezultati su usporedivi te odgovaraju zastupljenosti Rh D antigena u populaciji koji je prisutan kod 85 % osoba.

Promatrajući ukupnu frekvenciju pojedinoga protutijela prema specifičnosti, istraživanje koje su proveli Valle Neto i sur. na politransfundiranim pacijentima u Brazilu, identificiralo je anti-E protutijelo (53 %) kao najčešće. Slijede ga anti-C i anti-K (21 %) (22). Prema Torunu i sur., u Turskoj je najčešće identificirano protutijelo također anti-E (62 %), zatim anti-C (43 %) te anti-D (42 %) (20). Prema Eriksteinu i sur., u Norveškoj je također identificirano anti-E protutijelo kao najčešće (20 %), anti-M (18 %), anti-K (10 %), anti-D (9 %) (14). Uspoređujući rezultate vidljivo je kako su protutijela iz Rh sustava najčešća (anti-E, anti-C, anti-D), što potvrđuje kako su Rh antigeni klinički jako značajni. U ovome je istraživanju anti-D protutijelo (29 %) ukupno najčešće identificirano te je najčešće u dobnim skupinama 51 – 95 godina. Ono se može obrazložiti manjkom RhD negativnih eritrocitnih krvnih pripravaka pri čemu se starijim pacijentima iz vitalnih razloga primjenjuju RhD pozitivni koncentracije eritrocita. Također, kao klinički značajni antigeni u istraživanjima pokazali su se K i M s visokom frekvencijom anti-K i anti-M protutijelima.

S obzirom na spol, prema Reyhanehu i sur., u Iranu je najčešće dokazano protutijelo među muškom populacijom anti-K (33 %), dok je kod žena anti-E (27 %) (16). U ovome je istraživanju kod oba spola najčešće protutijelo anti-D.

Prema Karafinu i sur., 2018. godine, u SAD-u od ukupnoga broja pacijenata s pozitivnim IAT-om, njih 58 % navodi kako je prethodno transfundirano (19). U ovome istraživanju, prema

anamnestičkim podacima koji su bili dostupni, prethodno je transfundirano 42 % pacijenata dok kod 23 % taj podatak nije poznat. Nadalje, prema Karafinu i sur., 2019. godine, pokazalo se kako je s obzirom na anamnestičke podatke o prethodnim transfuzijama, podatak o prethodnoj transfuziji statistički značajan te je snažan faktor rizika za razvoj protutijela (15).

U SAD-u, Karafin i sur. uzimali su podatke o ranijim trudnoćama među ženama te je razlika u stvaranju protutijela s obzirom na prethodne trudnoće statistički značajna. Rezultati su u skladu sa spoznajom da je trudnoća jedan od faktora rizika za stvaranje protutijela (15). U ovome se istraživanju nije dobila statistička značajnost s obzirom na prethodne trudnoće, ali je dobivena statistička značajnost s obzirom na prethodne transfuzije.

Praćenje je trudnica s pozitivnim IAT-om iznimno bitno radi praćenja mogućega razvoja HBFN-a. Istraživanje koje su proveli Moinuddin i sur. u SAD-u uključivalo je 440 trudnica s pozitivnim IAT-om. Klinički značajna protutijela identificirana su kod 34 trudnice, dok je kod 372 žene identificirano anti-D protutijelo kao posljedica primjene hiperimunoga Rh gamaglobulina. Ostala su identificirana protutijela anti-E (39 %), anti-K (21 %), anti-M (18 %) (23). Prema Eriksteinu i sur., u Norveškoj su najčešće identificirana protutijela kod trudnica anti-M (21 %), anti-D (19 %), anti-Le a (19 %) (14). Istraživanje koje je proveo Kahar u Indiji među 1 960 trudnica, 20 je imalo pozitivan IAT, anti-D (96 %), anti-c (2 %), anti-H (2 %) pri čemu je potrebno naglasiti kako u Indiji IAT nije rutinski test u trudnoći (24). U ovome istraživanju ispitivani su uzorci 18 trudnica i najčešće je identificirano protutijelo anti-M, zatim nespecifična protutijela te anti-D prisutan kod tri trudnice (16,7 %). Rezultati su istraživanja dosta različiti, ali može se zaključiti kako je anti-M kao prirodno protutijelo češće u razvijenijim krajevima svijeta te kako je u našim prostorima prevencija RhD imunizacije učinkovita.

Sánchez-Durán i sur. 2019. godine objavili su rezultate petnaestogodišnjega istraživanja provedenoga u Španjolskoj. Istraživanje je provedeno među trudnicama s pozitivnim IAT-om od kojih je 259 imalo klinički značajna protutijela, od toga anti-D (53 %), anti-K (19 %). Četiri su trudnoće završile u prvom trimestru, šest trudnoća do 18. tjedna gestacije, tri su trudnoće završile intrauterinom smrću fetusa. Kod 45 fetusa primijenjena je intrauterina transfuzija (87 % anti-D) (25). Ovi rezultati ukazuju na važnost redovnoga praćenja IAT-a u svakoj trudnoći, pravovremenoga davanja hiperimunoga Rh gamaglobulina RhD negativnim trudnicama te kako aloprotutijela kod trudnica mogu uzrokovati ozbiljne oblike HBFN.

6. ZAKLJUČAK

Iz provedenoga istraživanja proizlaze sljedeći zaključci:

- Frekvencija IAT pozitivnih pacijenata iznosi 0,86 % u rutinskome prijetransfuzijskom ispitivanju.
- Najčešće je potvrđeno protutijelo anti-D.
- U dobnoj je skupini do 30 godina najčešće potvrđeno protutijelo anti-M. U dobnoj je skupini 31 – 50 godina anti-E, dok je u dobnoj skupini 51 – 95 godina anti-D. Razlike u frekvenciji i specifičnosti protutijela ovisno o spolu nisu uočene. Kod oba su spola najčešća protutijela anti-D, anti-E, anti-K, anti-M te u ukupnome udjelu, ona čine više od polovine.
- Postoji statistički značajna razlika u frekvenciji i specifičnosti protutijela ovisno o dobi, dok se razlika ovisno o spolu ne uočava. Najveći se broj pacijenata s pozitivnim IAT-om nalazi u dobnoj skupini 51 – 70 godine i 71 – 95 godina te u ukupnome udjelu te dobne skupine čine 72 % ispitanika.
- Prema ABO je sustavu krvnih grupa anti-D protutijelo najčešće potvrđeno kod krvne grupe A, AB i O, dok je kod krvne grupe B anti-E. Prema Rh je sustavu, anti D protutijelo potvrđeno kod 71 % RhD negativnih pacijenata.
- Analizom je anamnestičkih podataka najčešće protutijelo kod žena koje su bile trudne anti-M, a kod pacijenata koji su bili transfundirani anti-D.
- Analizom je dobiveno da postoji povezanost anti-D protutijela s dobnim skupinama 51 – 95 godina, dok se povezanost određenoga protutijela sa spolom nije dobila. Prema anamnestičkim se podacima anti-D, anti-K i anti-E protutijela mogu povezati s prethodnim transfuzijama, dok se anti-M protutijelo može povezati s prethodnim trudnoćama.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati specifičnost i frekvenciju aloprotutijela na eritrocitne antigene u rutinskoj prijetransfuzijskoj obradi.

Nacrt studije: Presječna studija iz povijesnih podataka.

Materijal i metode: Materijale istraživanja čine podatci dostupni iz povijesnih podataka Odjela za transfuzijsku medicinu u Općoj županijskoj bolnici Vinkovci. Podatci su korišteni za izradu istraživanja i prikupljeni su u razdoblju od siječnja 2016. do prosinca 2020. godine. Metode imunohematoloških ispitivanja provedene su automatskim analizatorom Wadiana, Grifols te ručnom metodom s ID-Card LISS/Coombs mikrokarticama.

Rezultati: Od ukupno 27 626 testiranih krvnih grupa, 238 je imalo pozitivan IAT (0,86 %), od toga je 70,2 % ispitanika bilo ženskoga spola. Najmanji je udio pacijenata u dobnim skupinama do 30 godina među kojima je najčešće protutijelo anti-M. Najveći je udio pacijenata u dobnim skupinama 50 – 95 godina među kojima je anti-D najčešće protutijelo. Anti-D protutijelo je najčešće potvrđeno kod krvne grupe A, AB i O te kod 71 % RhD negativnih pacijenata. Anti-M dokazan je kod 27,8 % trudnica. Protutijela su s najčešćom frekvencijom anti-D (28,6 %), anti-E (17,2 %), anti-K (15,3 %), anti-M (10,3 %).

Zaključak: Frekvencija je aloprotutijela u rutinskoj prijetransfuzijskoj obradi oko 1 %, a najčešće je potvrđeno protutijelo anti-D. Razlike u frekvenciji i specifičnosti protutijela ovisno o spolu nisu uočene, dok ovisno o dobi postoji statistički značajna razlika. Postoji povezanost anti-D protutijela s dobnim skupinama 51 – 95 godina. Prema anamnestičkim podacima anti-D, anti-K i anti-E protutijela mogu se povezati s prethodnim transfuzijama, dok se anti-M protutijelo može povezati s prethodnim trudnoćama.

Ključne riječi: aloprotutijelo; eritrocitni antigen; indirektni antiglobulinski test.

8. SUMMARY

Frequency and specificity of red blood cells alloantibodies in routine pretransfusion processing

Objectives: Examine the specificity and frequency of alloantibodies against erythrocyte antigens in routine pretransfusion testing.

Study Design: Cross-sectional study based on historical data.

Material and Methods: The materials of this research are the data available from the Department of Transfusion Medicine's historical data, General County Hospital Vinkovci. The data used for this research were collected in the period between January 2016 and December 2020. The methods of immunohematological tests were conducted with Wadiana, Grifols analyzer and by manual method using ID-Card LISS/Coombs microcards.

Results: Of the total 27 626 tested blood types, 238 had positive IAT result (0,86 %), of which 70,2 % were of female gender. The smallest share of patients is in the age group of up to 30 years of age, among which the most common antibody is anti-M. The largest share of patients is in the age groups of 50 to 95 years of age, among which the anti-D antibody is the most common. Anti-D antibody is most commonly confirmed in bloodtype A, AB and O, and in 71 % of RhD negative patients. Anti-M is confirmed in 27,8 % of pregnant women. Antibodies with the most common frequency are anti-D (28,6 %), anti-E (17,2 %), anti-K (15,3 %), anti-M (10,3 %).

Conclusion: Alloantibody frequency in routine pretransfusion testing is around 1 %, and the most common confirmed antibody is anti-D. The differences in frequency and specificity of antibodies depending on gender were not detected, while depending on age there is a statistically significant difference. There is an interconnection between anti-D antibody and age groups of 50 to 95 years of age. According to anamnestic data, anti-D, anti-K and anti-E antibodies can be linked with previous transfusions, while anti-M antibody can be linked with previous pregnancies.

Key words: alloantibody; erythrocyte antigen; indirect antiglobulin test.

9. LITERATURA

1. Grgičević D. Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2006.
2. Balen S. Osnove transfuzijske medicine. 2. izd. Osijek: Medicinski fakultet Osijek; 2014.
3. Grgičević D, Vuk T. Imunohematologija i transfuzijska medicina. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2000.
4. Guyton AC. Fiziologija čovjeka i mehanizam bolesti. 5. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 1995.
5. ISBT. Table of blood group systems 2021. Dostupno na adresi: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Table_of_blood_group_systems_v._9.0_03-FEB-2021.pdf. Datum pristupa: 20.04.2021.
6. Jukić I, Bingulac-Popović J, Samardžija M, Lampalo M, Hećimović A, Đogić V, et al. Raspodjela glavnih alela sustava ABO krvnih grupa u hrvatskoj populaciji. *Acta medica Croat.* 2018;71(4):235–40.
7. Matijević R, Knežević M. Novije spoznaje u dijagnostici, liječenju i prevenciji rh imunizacije. *Gynaecol Perinatol.* 2009;18(2):66–71.
8. Volner Z, Batinić D, i suradnici. Opća medicinska mikrobiologija i imunologija. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
9. Abbas AK, Pillai SP, Lichtman AH. Osnovna imunologija - Funkcionisanje i poremećaji imunskog sistema. Data Status, Beograd; 2016.
10. Theis SR, Hashmi MF. Coombs Test - StatPearls - NCBI Bookshelf. StatPearls Publishing - NCBI Bookshelf. 2019. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547707/>. Datum pristupa: 11.04.2021.
11. Azik FM, Bozkaya IO, Özkasap S. Hemolytic transfusion reactions. Vol. 9, *Guncel Pediatri.* StatPearls Publishing; 2011. p. 127–32.
12. Hendrickson JE, Delaney M. Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn: Modern Practice and Future Investigations. Vol. 30, *Transfusion Medicine Reviews.* W.B.

- Saunders; 2016. p. 159–64.
13. Sindik J. Osnove istraživačkog rada u sestriinstvu. Sveučilište u Dubrovniku; 2014.
 14. Erikstein BS, Hagen KG, Hervig T. RBC alloantibody prevalence and specificity in a Western Norwegian tertiary hospital. *Transfus Med.* 2019 Jun;29(3):169–78.
 15. Karafin MS, Tan S, Tormey CA, Spencer BR, Hauser RG, Norris PJ, et al. Prevalence and risk factors for RBC alloantibodies in blood donors in the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study-III (REDS-III). *Transfusion.* 2019;59(1):217–25.
 16. Reyhaneh K, Ahmad G, Gharib K, Vida V, Raheleh K, Mehdi TN. Frequency & specificity of RBC alloantibodies in patients due for surgery in Iran. *Indian J Med Res.* 2013 Aug;138:252–6.
 17. Mo Z, Li H, Huang L, Jiao W. Prevalence and specificity of RBC alloantibodies in the general hospitalised population in Guangxi. *Transfus Med.* 2015;25(5):313–9.
 18. Zaman S, Chaurasia R, Chatterjee K, Thapliyal RM. Prevalence and specificity of RBC alloantibodies in Indian patients attending a tertiary care hospital. *Adv Hematol.* 2014;2014.
 19. Karafin MS, Westlake M, Hauser RG, Tormey CA, Norris PJ, Roubinian NH, et al. Risk factors for red blood cell alloimmunization in the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS-III) database. *Br J Haematol.* 2018;181(5):672–81.
 20. Torun Y, Kaynar L, Karakukcu C, Yay M, Ergul A, Turanoglu C, et al. Phenotype frequencies of blood group systems and alloantibodies to red blood cells in blood transfusion recipients in Kayseri (Turkey). *J Turgut Ozal Med Cent.* 2017;(December):1.
 21. Enko D, Habres C, Wallner F, Mayr B, Halwachs-Baumann G. Frequencies and Specificities of “Enzyme-Only” Detected Erythrocyte Alloantibodies in Patients Hospitalized in Austria: Is an Enzyme Test Required for Routine Red Blood Cell Antibody Screening? *J Blood Transfus.* 2014;2014:1–5.
 22. Valle Neto OG, Alves VM, Pereira G de A, Moraes-Souza H, Martins PRJ. Clinical and epidemiological profile of alloimmunized and autoimmunized multi-transfused patients

- against red blood cell antigens in a blood center of Minas Gerais. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2018;40(2):107–11.
23. Moinuddin I, Fletcher C, Millward P. Prevalence and specificity of clinically significant red cell alloantibodies in pregnant women-a study from a tertiary care hospital in Southeast Michigan. *J Blood Med.* 2019;10:283–9.
24. Kahar M. Frequency of Red Cell Alloantibodies in Pregnant Females of Navsari District: An Experience that Favours Inclusion of Screening for Irregular Erythrocyte Antibody in Routine Antenatal Testing Profile. *J Obstet Gynecol India.* 2018 Aug 1;68(4):300–5.
25. Sánchez-Durán MÁ, Higuera MT, Halajdian-Madrid C, Avilés García M, Bernabeu-García A, Maiz N, et al. Management and outcome of pregnancies in women with red cell isoimmunization: A 15-year observational study from a tertiary care university hospital. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2019 Oct 15;19(1).