

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA POLJANC

**POMEN DOLOČITVE TITRA PROTITELES PROTI ERITROCITOM V
TRANSFUZIJSKI MEDICINI**

**THE SIGNIFICANCE OF DETERMINING ANTIBODY TITRES AGAINST
ERYTHROCYTE IN TRANSFUSION MEDICINE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, na Centru za imunohematologijo, v laboratoriju za referenčne imunohematološke preiskave, pod mentorstvom izr. prof. dr. Primoža Rožmana, dr. med., spec. transf. med. in somentorja Matjaža Urbajsa, dr. med., spec. transf. med.

Za strokovno vodstvo, pomoč in nasvete se zahvaljujem mentorju, izr. prof. dr. Primožu Rožmanu, dr. med., spec. transf. med. in somentorju Matjažu Urbajsu, dr. med., spec. transf. med.

Iskreno se zahvaljujem Saši Herman, dipl. inž. lab. biom., za pomoč pri izvajanju analiz, prav tako tudi ostalemu osebju v laboratoriju za referenčne imunohematološke preiskave.

Hvala izr. prof. dr. Andreju Koširju, u. d. mat., za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Primoža Rožmana, dr. med., spec. transf. med. in somentorja Matjaža Urbajsa, dr. med., spec. transf. med.

Anja Poljanc

Ljubljana, april 2012

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Član diplomske komisije: doc. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	3
KAZALO SLIK	5
KAZALO TABEL	6
POVZETEK.....	7
ABSTRACT	8
SEZNAM OKRAJŠAV	10
1. UVOD	11
1. 1. Sistem ABO	11
1. 1. 1. Krvne skupine	11
1. 1. 2. Antigeni ABO	11
1. 1. 3. Podskupine ABO.....	13
1. 1. 4. Protitelesa sistema ABO	13
1. 1. 5. Vrste protiteles sistema ABO.....	14
1. 1. 5. 1. IgG	15
1. 1. 5. 2. IgM	15
1. 1. 5. 3. IgA	16
1. 1. 5. 4. IgE	17
1. 1. 5. 5. IgD	17
1. 2. Aglutinacija	17
1. 2. 1. Tehnike aglutinacijskih preiskav	18
1. 2. 1. 1. Aglutinacija v epruveti	18
1. 2. 1. 2. Gelska tehnika	19
1. 3. Titriranje eritocitnih protiteles.....	21
1. 4. Kdaj uporabljamo titriranje protiteles ABO	22
1. 4. 1. Pomen protiteles ABO pri presaditvi kostnega mozga.....	24
1. 4. 2. Pomen protiteles ABO pri presaditvi ledvice.....	25

1. 4. 3. Pomen protiteles ABO pri presaditvi jeter	26
1. 4. 4. Pomen protiteles ABO pri hemolitični bolezni novorojenčka	27
2. NAMEN	29
3. MATERIALI IN METODE	30
3. 1. REAGENTI	30
3. 2. PREISKOVANCI	31
3. 3. APARATURE IN PRIBOR	31
3. 4. EKSPERIMENTALNI DEL	32
3. 4. 1. Priprava titra protiteles preiskovanega seruma	32
3. 4. 2. Titer protiteles v epruveti	32
3. 4. 3. Titer protiteles na gelski kartici Liss/Coombs	32
3. 4. 4. Titer protiteles na gelski kartici NaCl	33
3. 5. STATISTIČNE METODE	33
4. REZULTATI	35
4. 1. Osnovne statistike	35
4. 2. Povezave med spolom in titri Pt ABO	36
4. 3. Povezave med starostjo in titri Pt ABO	37
4. 4. Povezave med tehnikami določanja titrov Pt ABO	37
4. 5. Povezave med titri	38
5. RAZPRAVA	39
6. SKLEP	40
7. LITERATURA	41
PRILOGE	43
Priloga 1: Rezultati določitve eritrocitnih protiteles v epruveti, NaCl gelski kartici in AHG gelski kartici.	43
Priloga 2: Grafični prikaz titrov za posamezno krvno skupino.	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba prekurzorskih verig tipa 1 in 2 ter imunodominantne strukture antigenov H, A in B.....	13
Slika 2: Imunoglobulin razreda G.....	15
Slika 3: Imunoglobulin razreda M.....	16
Slika 4: Stopnje jakosti aglutinacijske tehnike testiranja v epruveti po Marshu (1972).....	18
Slika 5: Fotografija prazne gelske kartice LISS/Coombs.....	19
Slika 6: Fotografija gelske kartice za določanje titrov z vzorci po končani reakciji in centrifugiranju.....	19
Slika 7: Fotografije kolon gelskih kartic z različnimistopnjami jakosti aglutinacije	20
Slika 8: Interpretacija rezultata aglutinacije pri določanju krvne skupine z gelsko metodo	21

KAZALO TABEL

Tabela I: Krvne skupine krvnoskupinskega sistema ABO	11
Tabela II: Izbira krvi za transfuzijo	23
Tabela III: Vrste presaditev glede na skladnost KS ABO prejemnika in dajalca organa ..	24
Tabela IV: Povprečja in standardni odkloni titrov PT ABO pri 180 preiskovancih	35
Tabela V: Povprečja titrov Pt ABO pri 180 preiskovancih	36
Tabela VI: Povezanost med spolom in titri Pt ABO pri 180 preiskovancih	36
Tabela VII: Povezanost med starostjo in titri Pt ABO pri 180 preiskovancih	37
Tabela VIII: Povezave med tehnikami določanja titrov Pt ABO	38
Tabela IX: Povezave med titri Pt ABO	38

POVZETEK

V plazmi človeka so navzoča naravna protitelesa sistema ABO proti tistim eritrocitnim antigenom, ki jih posameznik nima na eritrocitih. Oseba s krvno skupino A ima naravna protitelesa anti-B, oseba s krvno skupino B ima protitelesa anti-A, oseba s krvno skupino AB nima nobenih protiteles in oseba s krvno skupino O ima v plazmi protitelesa specifičnosti anti-A, anti-B in anti-A,B.

Vse celice v telesu imajo na površini določene antigene, ki omejujejo naključno transfuzijo krvi kot tudi presajanje organov. Uspeh pri presaditvi je odvisen od tkivne skladnosti, to je ujemanje antigenov darovalca in prejemnika organa. Zato je tudi za transplantacijsko dejavnost skladje krvnih skupin ABO izredno pomembno, saj lahko pri presaditvi čvrstega organa neskladnost v krvnih skupinah ABO med bolnikom in dajalcem povzroči akutno zavrnitveno reakcijo. Pri presaditvah krvotvornih matičnih celic so krvne skupine ABO pomembne za izbor krvnih komponent, ki jih bolnik potrebuje po presaditvi.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, katera tehnika določanja titra je najbolj zanesljiva. Primerjali smo tri metode, in sicer določitev titra protiteles s tehniko v epruveti, na gelski kartici NaCl in gelski kartici LISS/Coombs. Pri tem smo uporabili vzorce krvi zdravih krvodajalcev. Želeli smo tudi ugotoviti, ali se titri protiteles ABO pri osebah s posameznimi krvnimi skupinami razlikujejo ter ali starost in spol vplivata na titer protiteles.

Najnižje vrednosti titrov smo dobili s tehniko določitve protiteles v epruveti (povprečje titrov od 55,20 do 181,07), nekoliko višje vrednosti titrov so bile na gelski kartici NaCl (povprečje titrov od 56,17 do 232,73), na gelski kartici LISS/Coombs pa so bile vrednosti titrov najvišje (povprečje titrov od 117,27 do 1621,07). Za določanje eritrocitnih protiteles ABO je najprimernejša metoda na gelski kartici LISS/Coombs, saj je zaradi večje občutljivosti in specifičnosti primernejša za odkrivanje šibkih protiteles.

Ugotovili smo, da se titer anti-A nagiba k višjim vrednostim kot titer anti-B. Titer anti-A je pri ljudeh krvne skupine O višji kot pri ljudeh s krvno skupino B, titer anti-B je višji pri osebah krvne skupine O kot pri osebah krvne skupine A. Pri osebah krvne skupine O pa smo ugotovili, da med titroma anti-A in anti-B ni značilne razlike.

Na podlagi naših rezultatov lahko povzamemo, da s starostjo titer pada, spol pa ne vpliva na meritve.

ABSTRACT

In human plasma, natural antibodies of the ABO system against those erythrocyte antigens which cannot be found on individual's erythrocytes are present. A person with blood type A has a natural anti-B antibodies, a person with blood type B has anti-A antibodies, a person with blood type AB has no antibodies, and a person with blood type O has anti-A, anti- B and anti-A,B antibodies in the plasma.

All body cells have certain antigens on the surface, limiting random blood transfusion and organ transplantation. The success of transplantation depends on the tissue compatibility; i.e. the donor and recipient antigen matching. Therefore, the ABO blood groups compatibility is of its utmost importance for transplantation activities, since incompatibility in the ABO blood groups between donor and patients lead to acute rejection episodes when transplanting a solid organ. In transplantation of hematopoietic stem cells, ABO blood groups are important for the selection of blood components which the patient needs after a transplant.

The purpose of the diploma paper was to determine which technique of determining the titre is the most reliable. Three methods were compared: the determination of antibody titre with the technique in test tubes, NaCl gel card and LISS/Coombs gel card techniques. The blood samples from healthy blood donors were used. It was also to be determined whether the ABO antibody titres in individuals with different blood types differ, and whether age and gender affect the antibody titre.

The lowest values of the titres were obtained by the technique of determining the antibodies in the test tube (titres average from 55.20 to 181.07), slightly higher titre values were obtained on NaCl gel card (titres average from 56.17 to 232.73), and the LISS/Coombs gel card presented the highest titre values (titres average from 117.27 to 1621.07). For determining the ABO erythrocyte antibodies the preferred method is LISS/Coombs gel tab method, being more suitable for detecting the weak antibodies because of its greater sensitivity and specificity.

It has been found that the anti-A titre tends to higher levels than the anti-B titre. The anti-A titre is higher in people with blood group O than in people with blood group B, anti-B titre is higher in individuals with blood group O than in individuals with blood group A. In

individuals of blood group O, it has been found that the anti-A and anti-B titres do not show any significant differences.

Based on the results it can be concluded that the titre decreases with age and that the gender does not affect the measurements.

SEZNAM OKRAJŠAV

Ag	antigen
AHG	antihumani globulin
HBPN	hemolitična bolezen ploda in novorojenčka
HLA	človeški tkivni antigen (okr. angl. Human Leucocyte Antigens)
ICT	indirektni Coombsov test
IgA	imunoglobulin razreda A
IgE	imunoglobulin razreda E
IgD	imunoglobulin razreda D
IgG	imunoglobulin razreda G
IgM	imunoglobulin razreda M
KMC	krvotvorne matične celice
KS	krvna skupina
Pt	protitelo

1. UVOD

1. 1. Sistem ABO

1. 1. 1. Krvne skupine

Sistem ABO je prvi opisal dr. Karl Landsteiner leta 1900. Sodelavcem je vzel kri, ločil celice od plazme in jih nato mešal med seboj. Ugotovil je, da samo pri določenih kombinacijah pride do aglutinacije ali zlepljanja eritrocitov. Na podlagi teh ugotovitev je odkril tri krvne skupine, in sicer A, B in O. Leta 1902 sta njegova kolega Decastello in Sturli odkrila še četrto krvno skupino, in sicer AB. (1)

Določanje krvnih skupin je pomembno pri transfuziji krvi, ugotavljanju hemolitične bolezni novorojenčkov, v populacijski genetiki, sodni medicini ter pri transplantacijski dejavnosti. Pri presaditvi čvrstega organa neskladnost v krvnih skupinah ABO med dajalcem in prejemnikom lahko povzroči akutno zavrnitveno reakcijo. Za sam izbor dajalca pri presaditvi krvotvornih matičnih celic krvne skupine ABO niso pomembne, so pa pomembne pri izboru krvnih komponent, ki jih bolnik potrebuje po presaditvi. (2, 3)

Tabela I: Krvne skupine krvnoskupinskega sistema ABO

Krvna skupina	Antigeni na eritrocitih	Protitelesa v serumu	Porazdelitev v Sloveniji
A	A	anti-B	40%
B	B	anti-A	15%
AB	AB	/	7%
O	/	anti-A, anti-B	38%

1. 1. 2. Antigeni ABO

Antigen je vsaka snov, ki lahko vzbudi imunski odgovor. Antigeni AB(H) so izraženi na krvnih in nekaterih drugih celicah v telesu, v tkivih in telesnih tekočinah. Posamezniki imajo v serumu protitelesa, usmerjena proti odsotnim antigenom ABO, ki lahko povzročijo hiperakutno zavrnitev presadka z izraženimi tujimi antigeni A oz. B in hemolizo neskladnih tujih eritrocitov. Antigeni so vezani na lipide (glikosfingolipidi) in proteine

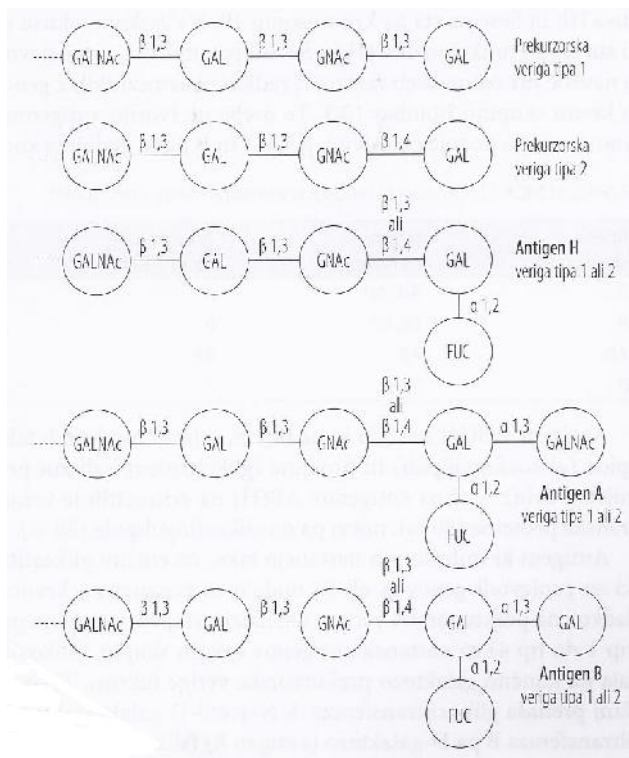
(glikoproteini) ali pa so prosti oligosaharidi (mleko, urin). Večina antigenov AB(H) na eritrocitih je vezanih na transmembranske proteine (80%), nekaj pa na glikosfingolipide (20%). (2, 4, 5)

Antigeni ABO nastanejo tako, da encimi glikoziltransferaze A oz. B dodajo sladkor na prekursorsko verigo. Obstajajo vsaj štiri različne prekursorske verige antigenov ABO (tip 1 do tip 4). Glikoziltransferaza H dodaja fukozo na končno galaktozo prekursorske verige, da nastane antigen H. Glikoziltransferaza A nanj prenaša N-acetil-D-galaktozamin (antigen A), glikoziltransferaza B pa D-galaktozo (antigen B) (Slika 1). (2)

Prisotnost antigenov A in B določajo geni treh ločenih lokusov ABO, Hh in Sese. Na kromosomu 9 se nahajajo poglavitni aleli ABO, na kromosomu 19 pa genska lokusa Hh in Sese. Na vsakem lokusu sta prisotna dva alela, ki sta lahko funkcionalna (H in Se) ali amorfnata oz. nedejavna (h in se). Alel H je prisoten pri večini oseb, razen pri redkih posameznikih z genotipom hh, ki imajo krvno skupino Bombay (0_h). Te osebe nimajo na eritrocitih antigenov AB(H). Gena A in B se dedujeta kodominantno, gen O pa je amorfen (nefunkcionalen) in se deduje recesivno. (2)

S testi aglutinacije ugotavljamo A in B antigene na eritrocitih. Pogosto dajo diagnostična protitelesa šibkejšo reakcijo z eritrociti novorojencev kot z eritrociti odraslih. Ob rojstvu antigeni A in B še niso popolnoma razviti, čeprav jih na eritrocitih 5 do 6 tednov starih zarodkov lahko zaznamo. Predvidoma jih ne zaznamo zato, ker se razvejane oligosaharidne strukture razvijejo postopoma. Izražanje antigena A in B je do 2-4 leta starosti popolno in ostane skozi življenje dokaj konstantno. (1, 4)

Skladnost antigenov in protiteles krvnoskupinskega sistema ABO je najpomembnejša pri transfuziji krvi. Krvnoskupinski sistem ABO je eden od štirih sistemov, ki ga opredeljujejo antigeni polisaharidne narave (ABO, P, Lewis in H), in edini, pri katerem so v serumu zdravih ljudi navzoča naravna protitelesa. (2)



Slika 1: Zgradba prekurzorskih verig tipa 1 in 2 ter imunodominantne strukture antigenov H, A in B (2)

1. 1. 3. Podskupine AB0

Za gene, ki določajo krvne skupine, je značilen polimorfizem (npr. A1 ter A2). Posledica so razlike v encimskih glikoziltransferazah, ki so produkt teh različnih genov. Encimi se v glavnem ločijo po kinetičnih lastnostih, izoelektrični točki in pH optimumu delovanja. Kot posledica je na eritrocitih različnih podskupin različno število molekul antigena, v praksi pa to opazimo kot podskupine krvnoskupinskega sistema. Število opisanih podskupin pri krvni skupini A (npr. A₂, A₃, A_m, A_x, A_{el}) je večje kot pri B (npr. B₃, B_x, B_m, B_{el}). (2)

1. 1. 4. Protitelesa sistema ABO

Vsaka oseba ima v plazmi naravna protitelesa proti tistim antigenom sistema ABO, ki jih na lastnih eritrocitih nima. Oseba s krvno skupino A ima naravna protitelesa anti-B, oseba s krvno skupino B protitelesa anti-A, oseba s krvno skupino O ima protitelesa anti-A in anti-B. Oseba s krvno skupino AB nima nobenih protiteles (glej Tabela I). Ta protitelesa nastanejo v prvih šestih mesecih po rojstvu. Najvišji nivo dosežejo v starosti 10 let, nato pa ta počasi pada. Naravna protitelesa so predvsem razreda IgM. Njihova primarna funkcija je

vezanje z antigenom. Ko antigen vdre v telo, sproži nastanek različnih poliklonskih protiteles, ki imajo različne afinitete do antigena in različne efektorske funkcije. Svoje efektorske funkcije posredujejo protitelesa šele, ko se vežejo z antigenom. (2, 4, 6, 9)

Količina oz. koncentracija aglutininov (protiteles) sistema ABO se precej razlikuje v serumih različnih oseb. Ponavadi jo izražamo s titrom protiteles. Na titer vpliva eritrocitni fenotip (npr.: A₁ ali A₂), koncentracija eritrocitov v končni zmesi, čas in temperatura inkubacije ter določitev koncentracije oz. končnega (ang. end point) titra protiteles sistema ABO. Običajno je variabilnost titra anti-A širša (od 8 do 2048) od titra anti-B (od 8 do 256). (7)

Primerjava titrov protiteles pri belcih je pokazala, da se titer anti-A nagiba k višjim vrednostim kot titer anti-B. Titer anti-A je pri ljudeh krvne skupine O višji kot pri ljudeh s krvno skupino B, titer anti-B pa je višji pri osebah krvne skupine O kot pri osebah krvne skupine A (Ichikawa 1959). Vrednosti titrov anti-A in anti-B so pri črncih običajno višje kot pri belcih. Titer anti-B je pri njih skoraj tako visok kot titer anti-A (Grundbacher 1976). Možno je, da so razlike v jakosti in hemolitični značilnosti protiteles ABO bolj odvisne od okoljskih dejavnikov kot od rase. Študija (darovalci so bili prebivalci Velike Britanije) ni uspela dokazati bistvene razlike med črnci, belci in Azijci (Redman et al. 1990). (7)

Protitelesa anti-A in anti-B so pri pacientih s hipogamaglobulinemijo pogosto prisotna v zelo nizkih koncentracijah, pri redkem Wiskott-Aldrich sindromu pa so celo odsotna. (7)

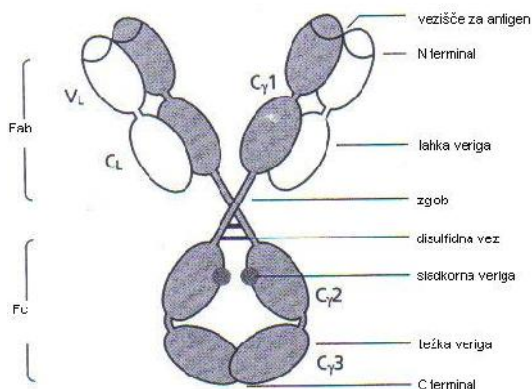
1. 1. 5. Vrste protiteles sistema ABO

Protitelesa ABO imenujemo imunoglobulini (okr. Ig). Imunoglobulini so beljakovine (glikoproteini), ki jih najdemo v krvi in drugih telesnih tekočinah vretenčarjev. Njihova naloga je imunska obramba, to je vezanje z antigenom ter posredovanje različnih bioloških učinkov. Osnovna zgradba vseh imunoglobulinov je podobna. Monomerne enote imajo simetrično strukturo v obliki črke Y. Sestavljene so iz dveh identičnih težkih polipeptidnih verig (γ , μ , α , ϵ ali δ) in dveh enakih lahkih polipeptidnih verig (κ ali λ), ki so med seboj povezane z disulfidnimi vezmi. Vsaka polipeptidna veriga je sestavljena iz več strukturnih delov (domen). Glede na tip težke verige razdelimo imunoglobuline v pet razredov oz. izotopov protiteles (IgA, IgD, IgG, IgE, IgM). (4, 6)

1. 1. 5. 1. IgG

Imunoglobulin G (IgG) je najpomembnejši in najobilnejši imunoglobulin pri človeku. Povprečna koncentracija IgG v serumu zdravega odraslega je 12 g/L (8-16 g/L) in predstavlja tri četrtine vseh imunoglobulinov. Koncentracija protiteles anti-A in anti-B razreda IgG pri osebah krvne skupine O je višja kot pri osebah krvne skupine A (anti-B) in krvne skupine B (anti-A). (4, 8) V tem razredu ločimo štiri podrazrede imunoglobulinov: IgG1, IgG2, IgG3 in IgG4. V serumu normalnega odraslega so v naslednjih koncentracijah (povprečne koncentracije): IgG1 6.63 g/L, IgG2 3.22 g/L, IgG3 0.58 g/L in IgG4 0.46 g/L. Podrazredi se med seboj razlikujejo po strukturi in funkciji. Število disulfidnih vezi je različno. IgG3 se od drugih podrazredov razlikuje v veliko daljšem zglobu. (1, 4, 7)

Protitelesa IgG nastajajo v sekundarnem imunskem odgovoru po naravni infekciji ali imunizaciji z virusi, bakterijami ali njihovimi produkti. Delež ABO protiteles razreda IgG močno poraste pri imunizaciji s krvnoskupinskimi substancami. Ta protitelesa so v krvi in tkivnih tekočinah približno enakomerno porazdeljena, življenjska doba le teh pa je od vseh imunoglobulinov najdaljša. IgG je edini imunoglobulin, ki prehaja skozi placento z matere na plod. Otroku daje zaščito pred okužbami v prvih tednih življenja, dokler otrok ne začne izdelovati lastnih protiteles. (6, 9)

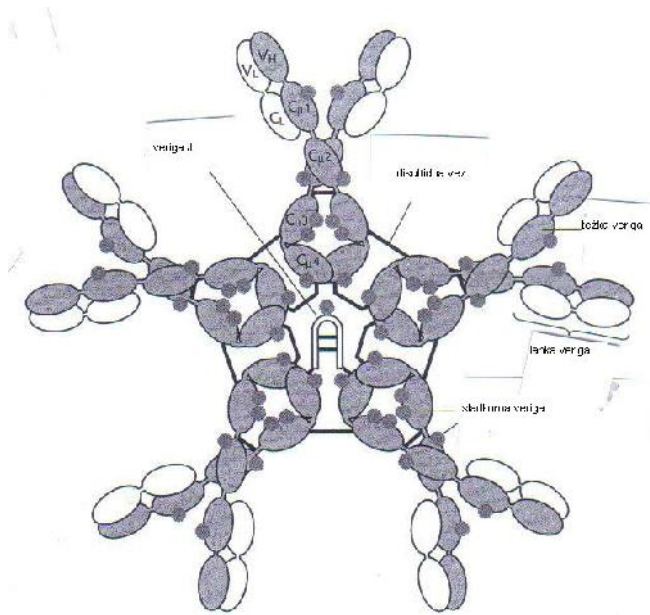


Slika 2: Imunoglobulin razreda G

1. 1. 5. 2. IgM

Imunoglobulin M (IgM) je pretežno intravaskularen, predstavlja 5 do 10% (0.5 – 2.0 g/L) vseh imunoglobulinov. Osebe s krvno skupino A in osebe s krvno skupino B imajo več protiteles ABO razreda IgM in manj protiteles IgG kot osebe krvne skupine O. (7)

Monomerne enote so med seboj povezane z disulfidnimi vezmi v pentamere, zaradi svoje velikosti se nahajajo izključno v serumu. IgM protitelesa se pojavijo v primarnem imunskem odgovoru že zgodaj med okužbo, pri nadaljnji izpostavljenosti pa se običajno pojavijo v manjšem obsegu. Skozi placento ta protitelesa ne prehajajo. Dokazovanje IgM protiteles v bolnikovem serumu indicira nedavno okužbo, IgM v novorojenčkovem serumu pa opozarja na znotraj maternično okužbo (npr. prirojene rdečke). Antigen sistema ABO je glede stalne navzočnosti protiteles razreda IgM posebnost našega imunskega sistema. (1, 4, 10)



Slika 3: Imunoglobulin razreda M

1. 1. 5. 3. IgA

Imunoglobulin A (IgA) je edini imunoglobulin, ki je prisoten v epitelnih izločkih. IgA je pomemben protivirusni obrambni mehanizem, saj preprečuje virusom vdiranje v celice. Skozi placento IgA ne prehaja. Novorojenček prejme IgA z materinim mlekom, kar mu omogoča zaščito pred črevesnimi okužbami. V serumu se nahaja kot monomer, dimer ali multimer in predstavlja približno 15% vseh imunoglobulinov (1.4 do 4.0 g/L). (4, 7)

1. 1. 5. 4. IgE

Imunoglobulin E (IgE) je poglavitni razred imunoglobulinov, ki posreduje anafilaktične reakcije. V serumu ga je izredno malo, približno 0.1 do 0.3 µg/mL. Pri okužbah s paraziti se raven IgE v serumu močno poviša, njegova koncentracija zraste na več kot 1000 µg/mL. IgE izločajo plazmatke v sluzničnih površinah črevesja in dihal, ki so blizu kraja, kjer lahko vstopijo paraziti. (4)

1. 1. 5. 5. IgD

Imunoglobulina D (IgD) je v primerjavi z drugimi imunoglobulini zelo malo v serumu, izraža se na površini limfocita B. Serumski IgD ima še nepojasnjeno vlogo. (4)

1. 2. Aglutinacija

Predtransfuzijske serološke preiskave temeljijo na reakciji med antigeni na eritrocitih in ustreznimi protitelesi. Reakcija protiteles z antigeni lahko povzroči različne opazne rezultate. V serologiji krvnih skupin sta najbolj pogosto opazovani reakciji aglutinacija in hemoliza, ki sta uporabni tako za določanje antigenov kot protiteles. Pojem aglutinacija v imunohematologiji uporabljamo za zlepljanje eritrocitov, ki imajo na svoji površini antigenske determinante, s specifičnimi protitelesi. Pri tem nastanejo makroskopsko vidni skupki – aglutinati. (1, 2, 11, 12)

Aglutinacija je reverzibilna kemična reakcija, ki poteka v dveh fazah. V prvi fazi, t.i. senzibilizaciji, poteče vezava protitelesa na antigen na membrani eritrocita. V drugi fazi pa pride do povezave med senzibiliziranimi eritrociti in posledično do zlepljenja sosednjih eritrocitov, ki predstavljajo aglutinacijo. Dejavniki, ki vplivajo na prvo fazo, so fizikalno-kemijske lastnosti protiteles, temperatura, ionska jakost in pH okolja, na drugo fazo pa vpliva tudi naboj eritrocita, oblika antigenov ter količina in razred protiteles (IgM, IgG). (1, 12)

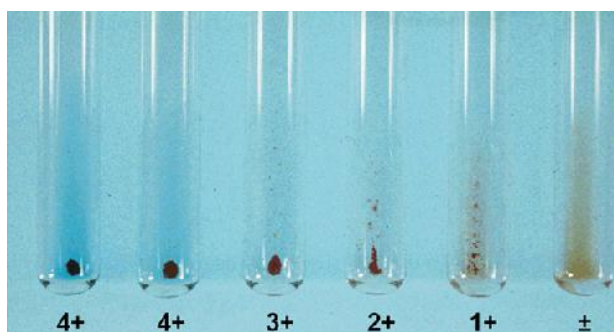
Večina krvnoskupinskih protiteles reagira v določenem temperaturnem območju. Protitelesa razreda IgM so reaktivnejša pri nižjih temperaturah (od 4°C do 27°C), medtem ko protitelesa razreda IgG bolje reagirajo pri 37°C. (1, 2)

Eritrociti so pri nevtralnem pH negativno nabiti, zato se odbijajo drug od drugega. To odbojnost imenujemo zeta-potencial. Zaradi svoje velikosti in pentamerne oblike protitelesa IgM brez težav premostijo razdaljo med eritrociti v raztopini (nastanek aglutinacije), medtem ko imajo protitelesa IgG pri premagovanju te razdalje težave (so manjša in bivalentna). Aglutinacijo s protitelesi IgG dosežemo z zmanjšanjem razdalje med eritrociti (s centrifugiranjem) ali z zmanjšanjem zeta-potenciala z različnimi dodatki, kot so albumin in encimi (bromeli, papain), ali s pomočjo antiglobulinskega seruma (t.i. antiglobulinski ali Coombsov test). (6, 12)

1. 2. 1. Tehnike aglutinacijskih preiskav

1. 2. 1. 1. Aglutinacija v epruveti

Hemoliza in aglutinacija predstavljata pri serološkem testiranju končno fazo reakcije med antigeni na eritrocitih in protitelesi. Pri testiranju v epruveti hemolizo ocenimo po obarvanosti supernatanta, s pretresanjem eritrocitov v epruveti pa ocenimo aglutinacijo. Pri tem moramo paziti, da ne stresamo premočno, kajti premočno stresanje lahko povzroči razpad aglutinotov in lažno negativno reakcijo. Epruveto držimo s prsti pod kotom tako, da ko pazljivo pretresemo, se eritrociti odlepijo od dna. Opazujemo, kako se eritrociti ločujejo od dna in aglutinata. Jakost aglutinacije ocenimo po resuspenziji vseh eritrocitov, najenostavneje 1+ do 4+ (Slika 4). Ocenjevanje končnega rezultata reakcije mora biti točno in dosledno. Pri tem si lahko pomagamo z viri svetlobe ali optičnimi pripomočki, kot je konkavno zrcalo. Pri ocenjevanju rezultatov mora vse osebe uporabljati enake kriterije. (13)

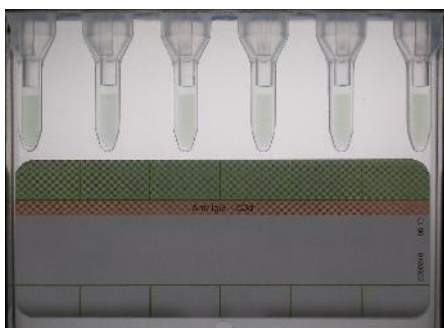


Slika 4: Stopnje jakosti aglutinacijske tehnike testiranja v epruveti po Marshu (1972)

1. 2. 1. 2. Gelska tehnika

Gelska tehnika je mikro aglutinacijska, kolonska, kromatografska (gelska filtracijska) metoda, pri kateri eritrocite filtriramo skozi gelsko kolono, ki vsebuje medij sephadex G-25 (komercialno ime za polisaharid dekstran, katerega molekule so zamrežene z epiklorhidrinom tako, da nastanejo pore določene velikosti), v katerem se ločijo izbrane eritrocitne populacije glede na velikost aglutinotov. Natančnost odčitavanja in interpretiranje končnega rezultata je ključnega pomena pri imunohematoloških preiskavah. V primerih, ko je reakcija šibka, je natančnost še posebej pomembna. (1, 11, 14)

Metoda se izvaja z uporabo gelskih kartic (Slika 5 prikazuje primer prazne gelske kartice, Slika 6 pa gelske kartice z vzorci krvi). To so plastične kartice, velike 7 x 5.3 cm, v katere je vdelenih šest mini epruvet, ki omogočajo hkratno izvedbo več testov. Mini epruveta je sestavljena iz reakcijske komore, ki se zoži v kolono, dolgo približno 15 mm in široko 2 mm. Napolnjena je z mešanico gela, pufra in reagenta. Odvisno od testa uporabimo bodisi nevtralni gel, ki ne vsebuje reagentov (reagenti so dodani na vrh gela), ali gel, ki vsebuje reagente (npr. antiglobulin ali protitelesa anti-A, B, D itd). Ko kartice centrifugiramo, gel deluje kot filter, ki ujame aglutinirane eritrocite. Gel z različnimi antiserumi lahko uporabljamo za tipizacijo celic, z gelom, ki vsebuje antihumani globulin, pa odkrivamo eritrocite, na katerih so vezana protitelesa razreda IgG. Odkrivanje protiteles z dodatkom reagenta AHG pogosto daje močnejše reakcije. Z njim poleg protiteles IgG odkrijemo tudi nekatera protitelesa, ki bi jih sicer spregledali. Zaradi večje občutljivosti gela so vrednosti titrov protiteles pri merjenju z gelsko metodo višje kot pri metodi v epruveti. (1, 6, 11, 15)

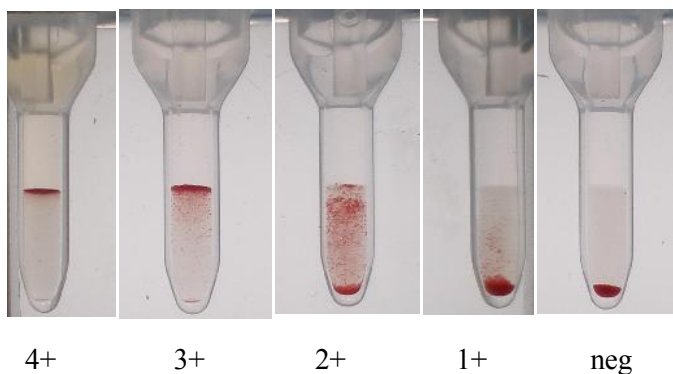


Slika 5: Fotografija prazne gelske kartice LISS/Coombs



Slika 6: Fotografija gelske kartice za določanje titrov z vzorci po končani reakciji in centrifugiranju

Običajno zgornji del kolone (komoro) uporabimo za eritrocite same ali za inkubacijo eritrocitov in seruma oz. plazme. V komori zmešamo vzorec preiskovanih eritrocitov z diagnostičnim reagentom. Po določenem času med vzorcem in reagentom reakcija poteče, delno poteče ali ne poteče. Glede na potek reakcije se eritrociti v koloni zlepijo v mrežo – aglutinat ali pa ostanejo nepovezani na dnu kolone. S centrifugiranjem gelskih kartic z vzorci ugotovimo, ali je reakcija potekla in v kolikšni meri je potekla. Med centrifugiranjem skozi gel najlažje potujejo posamični eritrociti, saj je specifična gostota gela manjša od specifične gostote krvnih celice, zato celice pristanejo na dnu (negativen rezultat). Celice, ki so se med inkubacijo povezale v mrežo oz. aglutinat, težje potujejo skozi gel, ostanejo na vrhu kolone (pozitiven rezultat). Celice, ki so se le delno zlepile, pa se glede na velikost strdkov porazdelijo po volumnu kolone (Slika 7). (1, 11)



Slika 7: Fotografije kolon gelskih kartic z različnimi stopnjami jakosti aglutinacije

Glede na porazdelitev aglutinativ po volumnu kolone ločimo:

- negativen rezultat pomeni popolno odsotnost aglutinacije (vse celice so na dnu kolone);
- 1+ aglutinacija eritrocitov v spodnji polovici kolone z nekaj neaglutiniranih eritrocitov na dnu kolone;
- 2+ aglutinacija eritrocitov skozi celotno dolžino kolone;
- 3+ aglutinacija eritrocitov v zgornji polovici kolone;
- 4+ najvišja stopnja jakosti aglutinacije (vse celice so na vrhu gela v koloni). (11, 15)

Interpretacija rezultatov poteka tako, da najprej ocenimo stopnjo jakosti aglutinacije v vsaki koloni z eno od petih stopenj. Končno interpretacijo preiskave ocenimo na podlagi kombinacije možnih rezultatov (Slika 8). (11, 16)



Slika 8: Interpretacija rezultata aglutinacije pri določanju krvne skupine z gelsko metodo

V prvih treh mini epruvetkah določamo krvno skupino ABO in RhD, v četrti mini epruveti negativno kontrolo, v peti in šesti pa reverzno določitev krvne skupine – določitev anti-A in anti-B protiteles v plazmi.

S fotografiranjem gelske kartice lahko rezultate preiskave fotodokumentiramo. Specialist transfuzijske medicine lahko na osnovi te slike določi interpretacijo preiskave, če je le ta primerne kvalitete in vsebuje dovolj informacij. Interpretacija preiskave z gelsko metodo je izvedljiva tudi na daljavo, saj je slike gelskih kartic mogoče preprosto prenašati v okviru telemedicine. (11)

Gelska metoda je primerna za večino laboratorijskih preiskav v serologiji krvnih skupin kot tudi za avtomatizirano izvedbo, saj uporablja majhno količino vzorcev, eritrocitov ni potrebno prati, manjša je nevarnost infekcije, je standardizirana in relativno lahko izvedljiva, občutljiva in ponovljiva, zagotavlja jasne in stabilne rezultate. Rezultate je mogoče fotodokumentirati in so enostavni za branje in interpretacijo. (12, 15)

1. 3. Titriranje eritocitnih protiteles

Titracija je semikvantitativna metoda, ki se uporablja za določanje koncentracije protiteles. Titer protiteles se določi s testiranjem serijskih dvojnih razredčin protiteles, katerim dodamo antigen in določimo zadnjo razredčino, ki še aglutinira z 1+. Rezultate lahko

izrazimo kot obratno vrednost končne razredčine seruma po formuli titer je 2^n . Titracijska vrednost zagotovi informacije o relativni koncentraciji prisotnih protiteles v serumu in njihovi afinitetni konstanti, hkrati pa tudi informacije o relativni jakosti izražanja antigenov na eritrocitih. (1, 4)

Na rezultate analize pri določanju titrov protiteles močno vplivajo tehnične spremenljivke, zato je potrebno uporabljati čim bolj enoten postopek. Pomembno je natančno pipetiranje. Priporočljivo je, da po vsaki razredčitvi menjamo nastavke na pipeti. Dosledno moramo upoštevati optimalni čas in temperaturo inkubacije ter čas in jakost centrifugiranja. Na rezultate vplivajo starost, fenotip in koncentracija testnih celic. Kadar titriramo serume različnih bolnikov (da primerjamo titre njihovih protiteles), za vse uporabljamo enake testne celice. Ko pa je serum potrebno testirati z različnimi vzorci, morajo biti vsi vzorci odvzeti in shranjeni na enak način, pred uporabo pa razredčeni na enako koncentracijo. Popolnoma ponovljive rezultate je dejansko nemogoče doseči. Primerjave so veljavne le takrat, ko vzorce testiramo sočasno. Pri prenatalnem testiranju za odkrivanje porasta koncentracije protiteles vzorce zamrznemo za kasnejšo primerjavo. Vsak nov vzorec je nato potrebno testirati vzporedno s prejšnjim vzorcem. Rezultati titrov so natančnejši, če uporabljamo večje volumne, kot pa če delamo z majhnimi volumni. Priprava razredčin s prenašanjem (opisano v točki 3. 4. 1.) daje bolj zanesljive rezultate kot priprava razredčine za posamezen titer. Potrebno količino seruma za vse načrtovane teste je potrebno predhodno preračunati, tako si lahko pripravimo zadostno količino za vsako redčitev. (1)

1. 4. Kdaj uporabljamo titriranje protiteles ABO

Titriranje protiteles ABO uporabljamo za oceno koncentracije aloimunskih protiteles pri nosečnici, na podlagi katere se zdravnik odloči, ali je potrebno opraviti bolj zapletene invazivne preiskave ploda. To tehniko uporabljamo tudi za določitev nepričakovanih eritocitnih protiteles z visokim titrom in nizko avidnostjo, t.j. skupnih lastnosti protiteles sistemov Knops in Chido/Rodgers, Cs in JMH. (1)

Krvne skupine ABO predstavljajo imunsko bariero pri transfuziji in transplantaciji. Uspešnost pri presaditvah tkiv in organov je odvisna od stopnje tkivne skladnosti med

darovalcem in prejemnikom. Poglavitni histokompatibilnostni kompleks (pri človeku HLA okr. angl. Human Leucocyte Antigens) je zaradi izrednega polimorfizma največja ovira pri transplantaciji tkiv in organov. V primeru, da se molekule HLA enega posameznika razlikujejo od molekul HLA drugega posameznika, so te za drugega posameznika imunogene. Večina nesorodnih posameznikov se med seboj razlikuje vsaj v delu molekul HLA. Popolna skladnost je le pri genetsko povsem identičnih osebkih (pri enojajčnih dvojčkih). Glede antigenov HLA je enakih tudi 25% sorojencev. Če bolniku presadimo tkivo nesorodnega dajalca, pride do imunskega odziva na tuje antigene HLA (tvorba specifičnih protiteles in specifičnih citotoksičnih celic). (2, 6, 17)

Pri transfuziji krvi glede na krvno skupino ABO praviloma izberemo kri iste krvne skupine ABO, Rh, K, kot jo ima prejemnik. V primeru, da bolnik nujno potrebuje kri, mi pa take krvi nimamo, so možne nekatere zamenjave (glej Tabelo II). Zamenjave v Rh sistemu so možne v izjemnih primerih, ko nimamo nobene druge možnosti (npr. možnost zamenjave ABO krvne skupine), transfuzija pa je nujna, damo RhD negativnemu prejemniku RhD pozitivno kri. (18)

Tabela II: Izbira krvi za transfuzijo

Prejemnik	Praviloma damo	Možna zamenjava
O	O	/
A	A	O
B	B	O
AB	AB	A ali B

Presaditve organov so glede na krvni skupini ABO dajalca in prejemnika lahko ABO identične, ABO skladne ali ABO neskladne (glej Tabelo III). Major skladje pomeni skladnost seruma prejemnika z antigeni dajalca. Je odločilno za preživetje prejemnika ter preživetje in delovanje presadka. Minor skladje pa pomeni skladnost seruma dajalca z antigeni prejemnika. Upoštevanje minor skladja ima pri izbiri organa manjši pomen. (5)

Tabela III: Vrste presaditev glede na skladnost KS ABO prejemnika in dajalca organa

Presaditve organa	Vrsta ABO neskladja	Opis	Možnosti KS
ABO identična	-	Dajalec in prejemnik imata isto KS ABO.	-
ABO skladna	Minor ABO neskladje	Serum dajalca vsebuje Pt proti Ag ABO prejemnika.	Dajalec O – prejemnik A, B ali AB; dajalec A oz. B – prejemnik AB
ABO neskladna	Major ABO neskladje	Serum prejemnika vsebuje Pt proti Ag ABO dajalca.	Dajalec A, B ali AB – prejemnik O
	Major in minor ABO neskladje	Serum prejemnika vsebuje Pt proti Ag ABO dajalca, serum dajalca vsebuje Pt proti Ag ABO prejemnika.	Dajalec A – prejemnik B oz. obratno

1. 4. 1. Pomen protiteles ABO pri presaditvi kostnega mozga

S presaditvijo krvotvornih matičnih celic (KMC) zdravijo številne bolezni. V zadnjih desetletjih se je ta način zdravljenja uveljavil kot najuspešnejši način poprej večinoma neozdravljivih bolezni, npr. bolezni krvotvornega tkiva (levkemije, limfomi, bolezni oslabljenega imunskega sistema in anemije). Uspešnost presaditve KMC je odvisna od narave bolezni, stadija bolezni, starosti in stanja bolnika ter tkivne skladnosti med darovalcem in prejemnikom. (1, 6) Prvo in najuspešnejšo presaditev kostnega mozga so izvedli med identičnima dvojčkoma. Razvoj tipizacije HLA je omogočil, da je mogoče najti alogenskega dajalca z identičnimi ali skoraj identičnimi antigeni HLA, kot jih ima prejemnik. (6)

Krvotvorne celice človeškega zarodka se pojavijo že v zarodku, starem 3 do 4 gestacijske tedne. Hematopoeza se preseli v fetalna jetra med 4. in 5. tednom gestacijske starosti, kjer se začne t.i. definitivna hematopoeza. V zarodku, starem med 10. in 15. tednov, preidejo krvotvorne celice iz jeter preko krvnega obtoka v kostni mozeg, vranico in timus.

Hematopoeza se po rojstvu postopoma omeji le na otrokov kostni mozeg. Pri odraslem zdravem človeku se KMC nahajajo v rdečem kostnem mozgu v prostorih med trabekulami spongioze kosti, kjer ležijo v mrežju opornega tkiva in žil. (19)

Transplantacija KMC je zahteven poseg, med katerim je potrebna podpora s komponentami iz krvi (koncentrirani eritrociti, trombociti in sveže zamrznjena plazma). Bolniki prvih 20 dni po presaditvi zaradi aplazije kostnega mozga niso sposobni tvoriti lastnih krvnih celic, zato potrebujejo transfuzijsko podporo. Vse, dokler presadek ne tvori zadostnega števila ustreznih celic, mora bolnik prejemati transfuzije komponent krvi, katerih količina je odvisna od agresivnosti kondicioniranja, števila presajenih KMC ter načina zbiranja KMC (kostni mozeg, periferne KMC, KMC iz popkovnične krvi). Za prejemnika je pravilni izbor krvnih komponent krvi v obdobju po transplantaciji zelo pomemben, saj neujemanje v krvnih skupinah med bolnikom in krvnimi komponentami lahko vpliva na izid zdravljenja. Bolniki prejemajo koncentrirane filtrirane eritrocite za vzdrževanje primerne ravni hemoglobina in s tem povezane oksigenacije tkiv. V povprečju je v desetih tednih po transplantaciji potrebnih 6 do 20 enot koncentriranih eritrocitov (odvisno od hitrosti vgnezditev presadka in njegovega delovanja). Vsake 2 do 4 dni bolniki prejemajo filtrirane trombocite z namenom preprečevanja in zdravljenja krvavitev. Določeno obdobje pred in po transplantaciji morajo biti vse komponente, razen sveže zamrznjene plazme, obsevane. (20)

1. 4. 2. Pomen protiteles ABO pri presaditvi ledvice

Pri presaditvah čvrstih organov je krvnoskupinski sistem ABO najpomembnejši transplantacijski antigenski sistem. Večina zgodnjih neuspehov presaditve ledvic je bila posledica hitre zavrnitvene reakcije zaradi ABO neskladja. (5, 21)

Med prejemnikom in darovalcem je potrebno upoštevati sorodnost glede krvnih skupin ABO. Prejemnik in darovalec morata biti skladna glede na krvno skupino ABO, ni pa nujno, da sta identična. To pomeni, da darovalčevo ledvico krvne skupine O lahko dobi prejemnik katerekoli krvne skupine. Prejemnik krvne skupine B pa lahko dobi ledvico darovalca krvne skupine B ali O, nikakor pa ne A ali AB. Če bi prišlo do neskladja pri presaditvi ledvice glede krvnih skupin ABO, bi prišlo do hitre zavrnitve presajene ledvice (hiperakutna zavrnitev).

Pri presaditvi ledvice živega darovalca je potrebno narediti preiskave glede tkivne skladnosti. Te preiskave vključujejo tipizacijo HLA za lokus A, B, C, DR, preizkus senzibilizacije na panelu ter navzkrižni preizkus med krvjo darovalca in prejemnika. Poleg skladnosti ABO sistema je pri živem darovalcu pogoj popolna ali vsaj polovična skladnost HLA antigenov in negativni navzkrižni preizkus. Navzkrižni preizkus ponovimo nekaj dni oz. neposredno pred presaditvijo.

Pri presaditvi ledvice umrlih darovalcev je ravno tako potrebna skladnost krvnih skupin ABO in negativni navzkrižni test. V imunološkem laboratoriju naredijo navzkrižne teste tistim potencialnim prejemnikom, ki imajo skladno krvno skupino. Med tistimi prejemniki, ki imajo skladno tako krvno skupino kot tudi negativni navzkrižni test, dežurni nefrolog izbere najustrežnejšega prejemnika glede na kritično stanje in stopnjo nujnosti presaditve. Če je na voljo več potencialnih prejemnikov, izberemo tistega, ki ima poleg skladne krvne skupine in negativnega navzkrižnega preiskusa najbolj sorodne antigene HLA. (21)

1. 4. 3. Pomen protiteles ABO pri presaditvi jeter

Presaditve jeter so lahko ABO identične, ABO skladne ali ABO neskladne. Presaditve jeter so večinoma ABO identične, ostale pa ABO skladne. Pri presaditvi ABO identičnih jeter ne more priti do zapletov zaradi ABO neskladja.

V nekaj dneh po presaditvi ABO skladnih jeter se lahko pri prejemniku razvije sindrom potujočih limfocitov (passenger lymphocyte syndrome) in pojavijo neskladna protitelesa anti-ABO v krvi bolnika, ki lahko povzročijo imunsko hemolizo bolnikovih eritrocitov. Ta protitelesa izvirajo iz dajalčevih limfocitov, prenesenih s presajenim organom. Krvno skupino ABO, RhD in indirektni antiglobulinski (Coombsov) test moramo določiti tako prejemniku kot tudi darovalcu jeter. S tem ugotovimo prisotnost nepričakovanih eritrocitnih protiteles zunaj sistema ABO. Za operativni poseg potrebujemo eritrocitne enote prejemnikove krvne skupine ABO ali krvne skupine ABO, ki je skladna z njegovim serumom. Da bi preprečili oz. omejili hemolitično anemijo po presaditvi ABO skladnih jeter, smejo bolniki prejemati le koncentrirane eritrocite, ki so ABO skladni s serumom bolnika in tudi dajalca jeter, vse dokler neskladna protitelesa ne izginejo. Bolniku določamo tudi titre neskladnih protiteles anti-ABO in direktni antiglobulinski (Coombsov) test. (5)

1. 4. 4. Pomen protiteles ABO pri hemolitični bolezni novorojenčka

Z imunohematološkimi preiskavami med nosečnostjo odkrijemo protitelesa, ki lahko povzročijo hemolitično bolezen ploda in novorojenčka (HBPN), napovemo razvoj HBPN ter preprečimo senzibilizacijo anti-D med nosečnostjo in po porodu. (18)

HBPN je posledica inkompatibilnosti med antigeni (eritrociti) ploda in plazmo (serumom) oz. protitelesi matere. Najpogosteje so za hudo obliko hemolitične bolezni odgovorna protitelesa anti-RhD. HBPN lahko povzročijo še številna druga protitelesa, npr. anti-ABO, anti-K, anti-c, anti-E in anti-C protitelesa. HBPN zaradi protiteles anti-D je danes redka, saj vse RhD negativne ženske dobijo sistematično predporodno in poporodno zaščito. Kadar je protitelo anti-E prisotno v kombinaciji s protitelesom anti-c, povzroči hujšo obliko hemolitične bolezni, kot pa če je prisotno samo protitelo anti-E. Tudi protitelesa anti-K pogosto povzročajo hudo obliko hemolitične bolezni. Anemijo povzroči supresija eritropoeze s protitelesi anti-K, zato titri protiteles anti-K niso dobri kazalci hemolitične bolezni. (4, 22)

Neskladje med materino in otrokovo krvno skupino RhD (mati RhD negativna, otrok RhD pozitiven) se pojavi pri eni od desetih nosečnosti. Pri večini nosečnosti plodovi eritrociti vstopijo v materin obtok. V začetku nosečnosti je vstopanje plodovih eritrocitov le neznatno, proti koncu nosečnosti pa postane posteljica bolj prepustna, takrat lahko kri Rh pozitivnega ploda preide v materino kri. Zaradi neujemanja antigenov RhD se v materini krvi pričnejo tvoriti anti-D protitelesa. (4, 17)

V 2% vseh rojstev povzroči HBPN neskladnost v krvnoskupinskem sistemu ABO. Skoraj v vseh primerih ABO HBPN ima ženska krvna skupina O, otrok pa krvna skupina A ali B. Huda oblika HBPN se razvije pri enem od 3000-ih rojstev, blaga pa pri enem od 150-ih rojstev. V periferni krvi novorojenčka dokažemo številne sferocite. V manj kot 5% primerih je potrebna fototerapija, izmenjalna transfuzija pa le v nekaterih primerih. Ponavadi se že v prvi nosečnosti razvije ABO HBPN, klinična slika pa v naslednjih nosečnostih ni hujša, tako kot je to pri RhD HBPN. (22)

Do 12. tedna nosečnosti je potrebno vsaki nosečnici določiti krvno skupino ABO, RhD in Kell ter ugotoviti navzočnost eritrocitnih aloprotiteles (ICT – indirektni Coombsov test). Nosečnicam, ki so RhD negativne, je potrebno testiranje ICT ponoviti v 28. tednu nosečnosti. RhD negativnim nosečnicam, katerim niso bila dokazana protitelesa anti-D, vbrizgamo zaščitni odmerek imunoglobulina anti-D. Takoj po porodu vsem novorojenčkom, katerih matere so RhD negativne, ponovno naredimo ICT, določimo krvno skupino ABO in RhD ter direktni Coombsov test (DCT). Vsem RhD negativnim neimuniziranim materam, ki so rodile RhD pozitivnega otroka, pa po porodu ponovno vbrizgamo zaščitni odmerek Ig anti-D. (22)

2. NAMEN

Naš namen je ugotoviti: a) kolikšen je povprečni titer protiteles ABO pri zdravih osebah in kakšne so razlike v titrih posameznih krvnih skupin O, A in B,

b) ali se metode titriranja v epruveti in na gelski kartici razlikujejo med seboj in katera od njih je najbolj občutljiva in uporabna za določanje titrov,

c) kako na titer protiteles vplivata spol in starost.

Načrt: a) Povprečni titer protiteles ABO bomo določili v epruveti, na gelski kartici NaCl in gelski kartici AHG.

b) Primerjali bomo titriranje v epruveti s titriranjem na gelski kartici NaCl in gelski kartici AHG.

c) Kako na titer protiteles vplivata spol in starost, bomo ugotovili s statističnimi metodami.

Pričakujemo: a) Da bosta titra anti-A in anti-B krvne skupine O višja od titra anti-B krvne skupine A in anti-A krvne skupine B.

b) Pričakovana vrednost titra protiteles ABO v epruveti bo manjša kot na gelski kartici NaCl, vrednost obeh titrov protiteles ABO bo manjša od titrov, titriranih na gelski kartici AHG.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. REAGENTI

- fiziološka raztopina (0,9% NaCl);
- ID-Diluent 2 (je prilagojena raztopina z nizko jonsko jakostjo, ki se uporablja za pripravo 3-5% suspenzije eritrocitov za določitev krvne skupine, prav tako za 0,8% suspenzijo dajalčevih eritrocitov za navzkrižni preizkus, avtokontrolo in direktni antihumani globulinski test preiskovanca, krvno skupino novorojenčka in pripravo testnih celic v laboratoriju);
- ID-DiaCell AB0 A₁ in B so komercialni standardni eritrociti krvne skupine A₁ in B, ki se uporabljajo za določanje anti-A₁ in anti-B izoaglutininov (izoaglutinin (naravno prisotna protitelesa anti-A, anti-B, anti-AB) so hladna reaktivna protitelesa, ki najbolje reagirajo pri 4°C, vendar so reaktivna tudi pri sobni temperaturi in lahko reagirajo pri 37°C; vsebuje mešanico IgM in IgG; največji delež spada v razred IgM; vsi reagenti testnih celic so človeškega izvora v blagem 0,8% (+/- 0,1%) in 3-5% suspenzijskem mediju);
- Seraclone Anti-A₁ (AB04) (Monoklonski antiserum, ki se uporablja za razlikovanje celic skupine A1 in skupine A2);
- gelske kartice LISS/Coombs (vsebuje gel z AHG reagentom (Anti-IgG + C3d));
- gelske kartice NaCl (vsebuje gel s fiziološko raztopino).

Zaradi velike količine reagenta ID-Diacell ABO A₁ in B, ki bi ga porabili pri analizi, smo si pripravili eritrocite vzorcev krvodajalcev, katerim smo predhodno določili reaktivnost. Za delo smo uporabili eritrocite krvodajalcev krvnih skupin A₁ in B, kateri so s preiskovano plazmo dajali enako reaktivnost kot komercialni standardni eritrociti ID-Diacell ABO A₁ in B. To pa smo naredili po naslednjem postopku:

- pripravimo si vzorce določenih krvnih skupin krvodajalcev (krvna skupina A ali krvna skupina B), če je potrebno, jih centrifugiramo;
- iz vsakega vzorca določene krvne skupine (v našem primeru smo jih vzeli 10) naredimo 0,8% suspenzijo eritrocitov (10 µL eritrocitov in 1000 µL Diluent 2);

- v vdolbinice na NaCl gelski kartici nakapljamo po 50 μL 0,8% vsake suspenzije eritrocitov krvodajalcev in 50 μL plazme vzorca krvne skupine O;
- gelsko kartico inkubiramo na sobni temperaturi 10 minut, nato centrifugiramo 10 minut pri 1000 obratih/minuto;
- odčitamo dobljene rezultate, v nadaljevanju uporabimo eritrocite krvodajalcev, ki s preiskovano plazmo dajejo podobne reaktivnosti kot komercialni standardni eritrociti ID-Diacell ABO A1 in B (3+/4+).

3. 2. PREISKOVANCI

Kot biološke vzorce smo uporabili vensko kri zdravih krvodajalcev, odvzeto v epruveto z antikoagulantom K_3EDTA . Uporabili smo 180 vzorcev zdravih krvodajalcev, in sicer: 60 krvodajalcev krvne skupine O, od tega je bilo 31 moških in 29 žensk, 60 krvodajalcev krvne skupine A, od tega je bilo 37 moških in 23 žensk, in 60 krvodajalcev krvne skupine B, od tega je bilo 38 moških in 22 žensk. Starost moških je bila od 21 do 62 let, starost žensk pa od 19 do 62 let. Za omenjene vzorce je bil predhodno že izdan izvid predtransfuzijskega testiranja, mi smo vzorcem določili še titer eritrocitnih protiteles, zato dovoljenje etične komisije ni bilo potrebno.

3. 3. APARATURE IN PRIBOR

- droben laboratorijski material: avtomatske pipete, nastavki za pipete, plastične epruvete, stojalo za epruvete in gelske kartice, gelske kartice, kapalke;
- centrifuga za epruvete (ID-DiaCent-12);
- centrifuga za gelske kartice (ID-Centrifuge 24S);
- inkubator (ID-Incubator 37II);
- električni stresalnik (vortex);
- vodna kopel (37°C).

3. 4. EKSPERIMENTALNI DEL

3. 4. 1. Priprava titra protiteles preiskovanega seruma

- V stojalo postavimo 10 epruвет in jih označimo s števkami od 1 do 10.
- V prvo epruветo odpipetiramo 500 μL preiskovanega seruma.
- V epruветe od 1 do 10 dodamo po 500 μL fiziološke raztopine.
- Vsebino prve epruветe premešamo na električnem stresalniku.
- Iz prve epruветe prenesemo 500 μL raztopine v drugo epruветo in premešamo vsebino na stresalniku.
- Iz druge epruветe prenesemo 500 μL raztopine v tretjo epruветo ter premešamo vsebino.
- S prenašanjem nadaljujemo do desete epruветe, iz katere nato odstranimo 500 μL vsebine in jo shranimo za eventualno nadaljevanje titriranja.

3. 4. 2. Titer protiteles v epruветi

- Pripravimo titer protiteles v 10-ih epruветah (po metodi 3. 4. 1.).
- Pripravimo si stojalo s steklenimi epruветami in jih označimo s števkami od 1 do 10. Prvo epruветo označimo tudi s številko vzorca.
- Iz epruвет s pripravljenimi razredčinami plazme prenesemo po 100 μL razredčine v steklene epruветe. Po vsakem prenosu obvezno menjamo nastavke pipete.
- V vsako epruветo dodamo po 50 μL 2-5% suspenzije eritrocitov z ustreznimi antigeni.
- Inkubiramo 30 minut v vodni kopeli pri 37°C.
- Po končani inkubaciji vsebino epruветe 3x operemo s fiziološko raztopino.
- V vsako epruветo dodamo po 2 kaplji AHG (antihumani glubulin) (Coombsov test) in centrifugiramo 20 sekund pri 2000-3000 obratov/minuto.

3. 4. 3. Titer protiteles na gelski kartici Liss/Coombs

- Pripravimo titer protiteles v 10-ih epruветah (po metodi 3. 4. 1.).
- Pripravimo si gelsko kartico, na katero napišemo titre (1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64, ...).

- V vsako vdolbinico na gelski kartici nakapljamo po 50 μL 0,8% suspenzije eritrocitov z ustreznimi antigeni.
- Dodamo po 50 μL razredčine iz epruвет s pripravljenimi razredčinami plazme.
- Inkubiramo 10 minut v inkubatorju pri 37°C.
- Po končani inkubaciji kartice centrifugiramo 10 minut pri 1000 obratov/minuto.

3. 4. 4. Titer protiteles na gelski kartici NaCl

- Pripravimo titer protiteles v 10-ih epruветah (po metodi 3. 4. 1.).
- Pripravimo si gelsko kartico, na katero napišemo titre (1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64, ...).
- V vsako vdolbinico na gelski kartici nakapljamo po 50 μL 0,8% suspenzije eritrocitov z ustreznimi antigeni.
- Dodamo po 50 μL razredčine iz epruвет s pripravljenimi razredčinami plazme.
- Inkubiramo 10 minut na sobni temperaturi.
- Po končani inkubaciji kartice centrifugiramo 10 minut pri 1000 obratov/minuto.

3. 5. STATISTIČNE METODE

Pri testiranju hipotez smo uporabili najmočnejše teste. Ker pogoji najmočnejšega testa za ničelno hipotezo $H_0 = [\text{med meritvami ni razlik}]$ niso izpolnjeni (meritve niso normalno porazdeljene), uporabimo šibkejša neparometrična ekvivalentna testa Mann-Whitney U test za neodvisne vzorce in test znakov (ang. Sign test) za odvisne vzorce. Pri vseh testih smo uporabili stopnjo tveganja $\alpha = 0,05$. V primeru normalne porazdelitve vzorcev bi uporabili parametričen test, in sicer t-test.

V okviru preverjanja kvalitete statističnega vzorca smo preverili povezanost med spolom in starostjo ter vsemi tremi spremenljivkami. V primerih, ko taka povezanost obstaja, so dokazani rezultati testiranja hipotez morda povzročeni s spolom in starostjo in s tem interpretacija rezultatov morda ne drži.

Za ugotovitev povezave med spolom in titri protiteles ABO smo uporabili Mann-Whitney U test, ravno tako za povezavo med titri protiteles ABO, Spearmanov koeficient korelacije pa za prikaz korelacije med starostjo in titri protiteles ABO. Pri iskanju povezav med tehnikami določanja titrov protiteles ABO smo uporabili Sign test.

4. REZULTATI

Rezultati analiz imajo nepravilno distribucijo (razvidno iz grafov v Prilogi 2), zato smo pri statistični obdelavi podatkov uporabili neparametrične teste (Mann-Whitney U test, Spearmanov koeficient korelacije rangov, Sign test).

4. 1. Osnovne statistike

V Tabeli IV so prikazane osnovne statistike, in sicer povprečje titrov Pt ABO ter standardni odkloni vseh vzorcev. Pri osebah KS O je povprečje titrov anti-A v epruveti 155,75, na gelski kartici NaCl 232,73 in na gelski kartici AHG 1621,07, povprečje titrov anti-B pa je v epruveti 181,07, na gelski kartici NaCl 201,20 ter na gelski kartici AHG 967,47. Pri osebah s KS B je povprečna vrednost titrov anti-A v epruveti 55,03, na gelski kartici NaCl 59,30 in na gelski kartici AHG 181,30. Pri osebah s KS A je povprečna vrednost titrov anti-B v epruveti 55,20, na gelski kartici NaCl 56,17 ter na gelski kartici AHG 117,27.

Pri osebah s KS O je standardni odklon titra anti-A v epruveti 162,21, na gelski kartici NaCl 322,47 in na gelski kartici AHG 3115,30, standardni odklon titra anti-B je v epruveti 189,53, na gelski kartici NaCl 292,53 ter na gelski kartici AHG 2352,59. Pri osebah s KS B je standardni odklon titra anti-A v epruveti 50,99, na gelski kartici NaCl 72,81 in na gelski kartici AHG 287,35. Pri osebah s KS A je standardni odklon titra anti-B v epruveti 49,35, na gelski kartici NaCl 53,57 ter na gelski kartici AHG 110,98.

Tabela IV: Povprečja in standardni odkloni titrov Pt ABO pri 180 preiskovancih

Krvna skupina / vrsta Pt	Epruveta		Gel. k. NaCl		Gel. k. AHG	
	Povp.	St. odkl.	Povp.	St. odkl.	Povp.	St. odkl.
O / anti-A (n=60)	155,75	162,21	232,73	322,47	1621,07	3115,30
O / anti-B (n=60)	181,07	189,53	201,20	292,53	967,47	2352,59
B / anti-A (n=60)	55,03	50,99	59,30	72,81	181,30	287,35
A / anti-B (n=60)	55,20	49,35	56,17	53,57	117,27	110,98

4. 2. Povezave med spolom in titri Pt ABO

Tabela V prikazuje povprečne vrednosti titrov Pt ABO moških in žensk v epruveti, gelski kartici NaCl in gelski kartici AHG.

Tabela V: Povprečja titrov Pt ABO pri 180 preiskovancih

Krvna skupina / vrsta Pt	Epruveta		Gel. k. NaCl		Gel. k. AHG	
	moški	ženske	moški	ženske	moški	ženske
O / anti-A (M=31, Ž=29)	115,10	199,21	244,52	220,14	1574,71	1670,62
O / anti-B (M=31, Ž=29)	116,65	249,93	173,16	231,17	945,03	991,45
B / anti-A (M=38, Ž=22)	46,16	70,36	44,47	84,91	132,90	264,91
A / anti-B (M=37, Ž=23)	44,54	72,35	43,73	76,17	96,97	149,91

Tabela VI prikazuje rezultate povezanosti med spolom in titri. Uporabili smo Mann-Whitney U test.

Tabela VI: Povezanost med spolom in titri Pt ABO pri 180 preiskovancih

Krvna skupina / vrsta Pt	Spol		p- vrednost		
	Ž	M	epruveta	gel. k. NaCl	gel. k. AHG
O / anti-A	29	31	0,098	0,417	0,782
O / anti-B	29	31	0,002	0,033	0,059
B / anti-A	22	38	0,091	0,067	0,230
A / anti-B	23	37	0,047	0,080	0,211

Rezultat testiranja je p-vrednost, ki omogoča interpretacijo ničelne hipoteze glede na stopnjo tveganja $\alpha = 0,05$. Ničelna hipoteza je $H_0 = [\text{med spoloma ni razlike}]$. V primeru, da je p-vrednost $\geq \alpha$, H_0 sprejmemo, če pa je p-vrednost $\leq \alpha$, H_0 zavrnamo.

P-vrednosti kažejo, da obstaja značilna povezava med spoloma in titri Pt ABO v epruveti in na gel. k. NaCl za KS O titer anti-B ter v epruveti za KS A titer anti-B, pri ostalih meritvah pa spol ne vpliva na meritve.

4. 3. Povezave med starostjo in titri Pt ABO

Tabela VII prikazuje korelacije med starostjo in titri Pt ABO. Uporabili smo Spearmanov koeficient korelacije rangov.

Tabela VII: Povezanost med starostjo in titri Pt ABO pri 180 preiskovancih

Krvna skupina / vrsta Pt	Starost		Korelacija		
	Povp.	St. odkl.	Epruveta	gel. k. NaCl	gel. k. AHG
O / anti-A	40,28	11,60	-0,185	-0,276	-0,081
O / anti-B	40,28	11,60	0,093	-0,112	-0,006
B / anti-A	38,12	10,88	-0,220	-0,262	-0,186
A / anti-B	38,02	11,02	-0,261	-0,245	-0,232

Korelacije, ki so pri izbrani stopnji tveganja značilno različne od 0, smo označili z rdečo barvo. Predznak + pomeni, da vrednost titra s starostjo narašča, predznak – pa, da pada. Testiranja ničelne hipoteze o ničelnosti korelacij kažejo, da so vse tri korelacije za epruveto, gel. k. NaCl in gel. k. AHG neznačilno različne od 0, razen pri osebah s KS O titer anti-A in osebah s KS B titer anti-A opazimo, da sta korelaciji med starostjo in gelsko kartico NaCl značilno različni od 0, razlika pa je tudi med starostjo in epruveto pri osebah s KS A titer anti-B.

4. 4. Povezave med tehnikami določanja titrov Pt ABO

Pri iskanju povezav med tehnikami določanja titrov Pt ABO smo uporabili Sign test.

Tabela VIII: Povezave med tehnikami določanja titrov Pt ABO

Krvna skupina / vrsta Pt	Povp. epr.	p-vred. (epr.-NaCl)	Povp. NaCl	p-vred. (NaCl-AHG)	Povp. AHG	p-vred. (epr.-AHG)
O / anti-A	155,75	0,005	232,73	0,000	1621,07	0,000
O / anti-B	181,07	0,569	201,20	0,000	967,47	0,000
B / anti-A	55,03	0,345	59,30	0,000	181,30	0,000
A / anti-B	55,20	0,584	56,17	0,000	117,27	0,000

Tabela VIII prikazuje p-vrednosti, ki kažejo, da so vrednosti meritev značilno različne, razen za razlike med epruveto - gel. k. NaCl pri KS O titer anti-B, KS B titer anti-A ter KS A titer anti-B (tedaj je $p > \alpha = 0,05$, torej neznačilna razlika).

4. 5. Povezave med titri

Pri iskanju povezav med titri Pt ABO smo uporabili neparametrični Mann-Whitney U test.

Tabela IX: Povezave med titri Pt ABO

KS, vrsta Pt / KS, vrsta Pt	p-vrednost		
	Epruveta	Gel. k. NaCl	Gel. k. AHG
O, anti-A / O, anti-B	0,222	0,689	0,151
O, anti-A / B, anti-A	<0,001	<0,001	<0,001
O, anti-B / A, anti-B	<0,001	<0,001	<0,001

Tabela IX prikazuje p-vrednosti, ki kažejo, da pri osebah KS O med titroma anti-A in anti-B ni razlik, vrednosti med titrom anti-A KS O in titrom anti-A KS B so značilno različne, prav tako je razlika med titrom anti-B KS O in titrom anti-B KS A.

5. RAZPRAVA

Rezultati analiz imajo nepravilno distribucijo (razvidno iz grafov v Prilogi 2), zato smo pri statistični obdelavi podatkov uporabili neparametrične teste.

Pri osebah KS O je povprečje titrov anti-A v epruveti 155,75, na gelski kartici NaCl 232,73 in na gelski kartici AHG 1621,07, povprečje titrov anti-B pa je v epruveti 181,07, na gelski kartici NaCl 201,20 ter na gelski kartici AHG 967,47. Pri osebah s KS B je povprečna vrednost titrov anti-A v epruveti 55,03, na gelski kartici NaCl 59,30 in na gelski kartici AHG 181,30. Pri osebah s KS A je povprečna vrednost titrov anti-B v epruveti 55,20, na gelski kartici NaCl 56,17 ter na gelski kartici AHG 117,27.

Iz literature je znano, da se titer anti-A nagiba k višjim vrednostim kot titer anti-B. Titer anti-A je pri ljudeh krvne skupine O višji kot pri ljudeh s krvno skupino B, titer anti-B pa je višji pri osebah krvne skupine O kot pri osebah krvne skupine A. (7) Naši rezultati potrjujejo navedbe iz literature, pri osebah krvne skupine O pa to ne moremo zagotovo trditi, saj je statistična obdelava pokazala (razvidno iz Tabele IX), da med titroma anti-A in anti-B ni značilne razlike.

Primerjali smo titer protiteles ABO v epruveti, na gelski kartici NaCl ter gelski kartici AHG in ugotovili, da so vrednosti titrov protiteles ABO najnižje v epruveti, nekoliko višje na gelski kartici NaCl, najvišje pa na gelski kartici AHG (razvidno iz Tabele IV). Metodi titriranja v epruveti in na gelski kartici NaCl imata neznačilno razliko (razvidno iz statistične obdelave podatkov v Tabeli VIII), medtem ko se titriranje v epruveti in na gelski kartici AHG značilno razlikuje, prav tako tudi titriranje na gelski kartici NaCl in gelski kartici AHG.

Pri testiranju povezav med spoloma in titri smo ugotovili, da spol ne vpliva na meritve, izjema je le titer anti-B pri osebah s krvno skupino O (titriranje v epruveti in na gelski kartici NaCl) in titer anti-B pri osebah krvne skupine A (titriranje v epruveti) (razvidno iz Tabele VI), pri katerih obstaja značilna povezava. S starostjo titer protiteles ABO pada, večje odstopanje titrov protiteles ABO je zaznati le pri titru anti-A oseb krvne skupine O in titer anti-A oseb krvne skupine B (titriranje na gelski kartici NaCl) ter pri titru anti-B oseb krvne skupine A (titriranje v epruveti) (razvidno iz Tabele VII).

6. SKLEP

V transfuzijski medicini je določitev titra protiteles ABO pomembno v času nosečnosti, pri transplantaciji organov in transfuziji krvi. Zato je pomembno katere metode določitve titra protiteles ABO uporabimo. Mi smo s primerjavo treh različnih metod določanja titra eritrocitnih protiteles ugotovili, da je v transfuzijski medicini za spremljanje dinamike protiteles ABO najprimernejša gelska tehnika na gelski kartici LISS/Coombs. Zaradi večje občutljivosti in specifičnosti je primernejša za odkrivanje šibkih protiteles ABO. Poleg tega je primernejša tudi zaradi porabe manjše količine vzorcev in enostavnejšega odčitavanja rezultatov.

7. LITERATURA

1. Brecher M. E: Technical Manual. 13th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1999.
2. Kotnik V. et al.: Imunološki priročnik. Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 2010: 40-1, 115-6, 157-8.
3. Urbajs M, Cukljati M: Krvne skupine in transfuzija krvi. Vita, 2009: 10-1.
4. Vozelj M: Imunologija. 1. izd., DZS, Ljubljana, 1996.
5. Maček M: Zdravljenje s krvjo v gastroenterologiji in hepatologiji. Zbornik predavanj 7. podiplomskega seminarja Zdravljenje s krvjo, 2005: 85-90.
6. Vozelj M: Temelji imunologije. 1. izd., DZS, Ljubljana, 2000: 47-74, 477-97.
7. Mollison P. L, Engelfried C. P, Contreras M: Blood transfusion in clinical medicine. Tenth Edition, 1997, blackwell Science Ltd., Oxford, England.
8. Lindberg L, Johansson S, Liu J, Grufman P, Holgersson J: Transfusion Volume 51, march 2011: 494-502.
9. Rožman P: Prispevek k proučevanju seroloških lastnosti reagentov za določanje krvnih skupin ABO. Magistrsko delo na Medicinski fakulteti, 1991: 17-8.
10. http://en.wikipedia.org/wiki/Immunoglobulin_M
(Dostop 15. 2. 2011.)
11. Meža M: Samodejna interpretacija rezultatov predtransfuzijskih testiranj na slikah gelskih kartic. Doktorska disertacija na Fakulteti za elektrotehniko, 2007: 10-1, 14.

12. Stopar P: Avtomatizacija aglutinacijskih imunohematoloških preiskav. Diplomsko delo na visokošolskem strokovnem programu laboratorijske biomedicine na Fakulteti za farmacijo, 2006: 9-10, 13.

13. Potočnik M: Določanje skladne krvi za transfuzijo. Učno gradivo pri predmetu Transfuziologija, 2008.

14. <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm357/g25.pdf>

(Dostop 27. 3. 2012.)

15. <http://www.medscape.com/viewarticle/509092>

(Dostop 15. 12. 2010.)

16. Breskvar M, Bricl I, Rožman P, Meža M, Tasič J: Uvedba telekonzultacij v transfuzijsko službo. Zdravniški vestnik, 2008: 177-82.

17. <http://vedez.dzs.si/dokumenti/dokument.asp?id=579>

(Dostop 9. 12. 2010.)

18. Učno gradivo pri predmetu transfuziologija, 2008.

19. Domanovič D: Pomen želatinaze B (metaloproteinaze-9) za zbiranje krvotvornih matičnih celic. Tečaj transfuzijske medicine, 2008.

20. http://www.ztm.si/sl/storitve/zdravljenje_s_krvjo/

(Dostop 16. 2. 2011.)

21. Drinovec J: Organizacijski vidiki presaditve ledvic. Zdrav. Obzor. 1988; 22: 133-9.

22. Bricl I: Zdravljenje novorojenčkov in otrok. Zbornik predavanj 5. podiplomskega seminarja Zdravljenje s krvjo, 2002: 67-9.

PRILOGE

Priloga 1: Rezultati določitve eritrocitnih protiteles v epruveti, NaCl gelski kartici in AHG gelski kartici.

Krvna skupina O, titer anti-A (moški)

Št. Vzorca	Spol	Starost	titer epruveta	titer gel.k.NaCl	titer gel.k.AHG
1	M	21	64	512	1024
2	M	22	64	256	512
3	M	23	256	32	128
4	M	26	32	16	128
5	M	27	32	128	256
6	M	27	128	256	256
7	M	28	64	128	2048
8	M	28	128	128	512
9	M	30	128	128	1024
10	M	31	512	1024	4096
11	M	31	64	64	64
12	M	32	128	256	1024
13	M	36	4	4	8
14	M	38	256	256	2048
15	M	40	16	16	16
16	M	41	128	64	512
17	M	43	128	512	4096
18	M	44	128	256	2048
19	M	45	128	256	4096
20	M	45	32	64	512
21	M	46	128	256	2048
22	M	47	256	512	2048
23	M	47	32	128	512
24	M	52	64	128	2048
25	M	54	512	2048	16384
26	M	56	32	32	128
27	M	57	8	8	64
28	M	59	4	8	8
29	M	59	64	64	1024
30	M	59	32	32	128
31	M	62	16	8	16

Krvna skupina O, titer anti-A (ženske)

Št. Vzorca	Spol	Starost	titer epruveta	titer gel.k.NaCl	titer gel.k.AHG
1	Ž	23	128	256	1024
2	Ž	24	256	512	1024
3	Ž	26	128	256	1024
4	Ž	26	256	256	512
5	Ž	26	64	512	4096
6	Ž	26	256	256	2048
7	Ž	32	256	256	2048
8	Ž	32	16	32	64
9	Ž	33	128	128	256
10	Ž	34	64	64	128
11	Ž	35	64	64	256
12	Ž	36	32	32	256
13	Ž	38	512	128	1024
14	Ž	39	256	256	256
15	Ž	41	512	1024	8192
16	Ž	41	16	64	256
17	Ž	45	32	32	64
18	Ž	45	256	128	2048
19	Ž	46	64	128	512
20	Ž	46	512	512	1024
21	Ž	47	32	32	64
22	Ž	49	32	32	128
23	Ž	49	64	64	256
24	Ž	50	512	256	1024
25	Ž	51	512	256	2048
26	Ž	51	32	64	256
27	Ž	53	256	512	16384
28	Ž	55	513	256	2048
29	Ž	62	16	16	128

Krvna skupina O, titer anti-B (moški)

Št. Vzorca	Spol	Starost	titer epruveta	titer gel.k.NaCl	titer gel.k.AHG
1	M	21	32	32	128
2	M	22	16	32	128
3	M	23	64	64	256
4	M	26	32	16	32
5	M	27	128	256	512
6	M	27	128	128	256
7	M	28	128	128	1024
8	M	28	64	64	128
9	M	30	32	32	128
10	M	31	256	256	512
11	M	31	128	256	512
12	M	32	64	128	512
13	M	36	32	32	128
14	M	38	64	64	256
15	M	40	32	32	128
16	M	41	512	2048	16384
17	M	43	128	64	128
18	M	44	128	128	512
19	M	45	64	64	256
20	M	45	64	64	256
21	M	46	128	256	2048
22	M	47	128	128	256
23	M	47	128	128	256
24	M	52	32	64	1024
25	M	54	512	512	2048
26	M	56	128	128	512
27	M	57	64	32	64
28	M	59	256	128	128
29	M	59	64	32	256
30	M	59	64	64	512
31	M	62	16	8	16

Krvna skupina O, titer anti-B (ženske)

Št. Vzorca	Spol	Starost	titer epruveta	titer gel.k.NaCl	titer gel.k.AHG
1	Ž	23	64	256	512
2	Ž	24	128	256	512
3	Ž	26	256	512	1024
4	Ž	26	128	512	2048
5	Ž	26	64	64	512
6	Ž	26	512	512	1024
7	Ž	32	256	64	128
8	Ž	32	128	128	256
9	Ž	33	512	256	512
10	Ž	34	512	256	512
11	Ž	35	64	64	256
12	Ž	36	128	128	512
13	Ž	38	512	256	512
14	Ž	39	256	128	512
15	Ž	41	256	512	4096
16	Ž	41	16	16	16
17	Ž	45	512	128	256
18	Ž	45	64	64	1024
19	Ž	46	64	32	32
20	Ž	46	1024	512	1024
21	Ž	47	128	32	32
22	Ž	49	256	512	1024
23	Ž	49	128	64	512
24	Ž	50	128	512	8192
25	Ž	51	512	512	1024
26	Ž	51	64	64	256
27	Ž	53	256	256	2048
28	Ž	55	256	64	256
29	Ž	62	64	32	128

Krvna skupina A, titer anti-B (moški)

Št. Vzorca	Spol	Starost	titer epruveta	titer gel.k.NaCl	titer gel.k.AHG
1	M	22	64	32	64
2	M	23	128	128	256
3	M	24	16	16	32
4	M	24	64	64	256
5	M	25	128	128	256
6	M	25	16	16	32
7	M	26	8	16	32
8	M	29	4	8	16
9	M	30	128	128	256
10	M	31	128	128	256
11	M	31	16	16	16
12	M	31	64	32	64
13	M	33	32	16	16
14	M	34	16	32	64
15	M	35	64	64	64
16	M	36	128	128	256
17	M	38	64	32	128
18	M	38	16	16	64
19	M	38	32	32	128
20	M	38	8	16	32
21	M	40	16	8	16
22	M	41	32	64	256
23	M	42	4	2	4
24	M	44	16	32	128
25	M	44	64	32	64
26	M	45	64	128	256
27	M	48	16	16	64
28	M	50	16	8	32
29	M	52	64	32	128
30	M	52	64	64	64
31	M	53	32	16	32
32	M	54	8	16	16
33	M	54	16	32	32
34	M	56	32	32	32
35	M	57	32	16	32
36	M	58	16	8	16
37	M	59	32	64	128

Krvna skupina A, titer anti-B (ženske)

Št. Vzorca	Spol	Starost	titer epruveta	titer gel.k.NaCl	titer gel.k.AHG
1	Ž	19	64	64	128
2	Ž	19	128	128	256
3	Ž	22	64	64	128
4	Ž	23	128	128	256
5	Ž	23	8	8	16
6	Ž	23	32	32	32
7	Ž	27	128	128	256
8	Ž	28	64	128	256
9	Ž	28	64	32	64
10	Ž	31	256	256	512
11	Ž	34	128	128	256
12	Ž	35	16	16	32
13	Ž	35	16	8	16
14	Ž	37	8	8	8
15	Ž	39	64	128	256
16	Ž	42	128	128	256
17	Ž	44	128	128	256
18	Ž	44	32	16	16
19	Ž	47	64	128	256
20	Ž	49	64	32	64
21	Ž	51	32	16	32
22	Ž	60	16	16	32
23	Ž	61	32	32	64

Krvna skupina B - titer anti-A (moški)

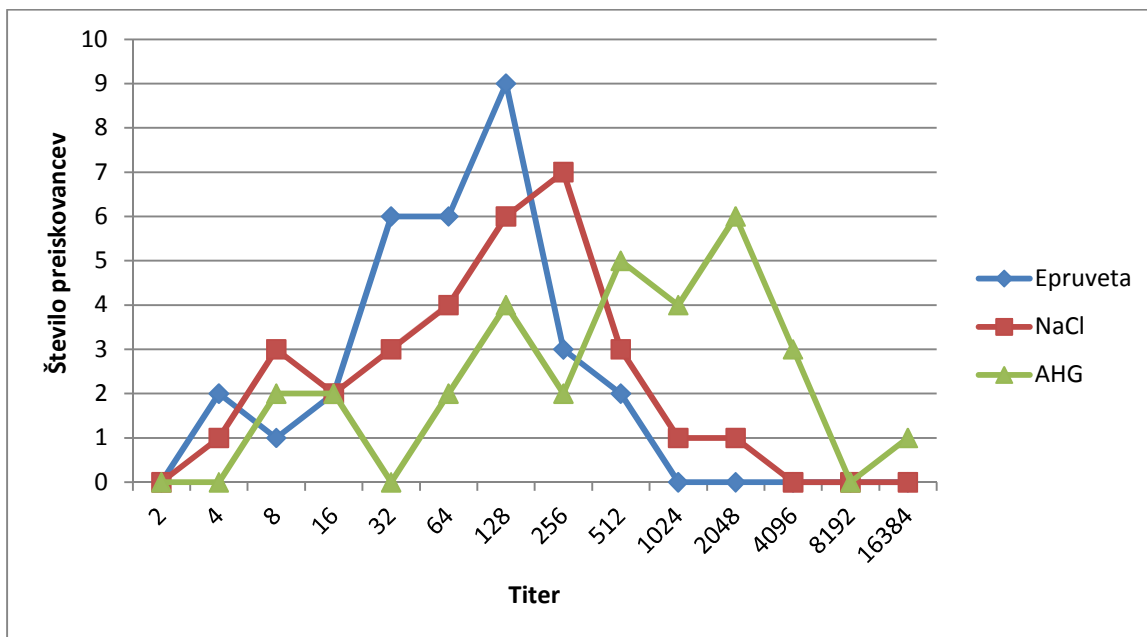
Št. Vzorca	Spol	Starost	titer epruveta	titer gel.k.NaCl	titer gel.k.AHG
1	M	21	64	128	256
2	M	23	64	64	256
3	M	23	16	16	64
4	M	24	32	32	64
5	M	24	64	32	32
6	M	28	32	64	128
7	M	28	16	16	32
8	M	28	32	16	32
9	M	30	32	64	128
10	M	30	8	8	16
11	M	31	128	128	512
12	M	32	16	16	64
13	M	32	32	32	32
14	M	32	64	32	128
15	M	33	16	8	32
16	M	35	16	8	64
17	M	36	64	64	128
18	M	38	128	128	512
19	M	39	32	32	64
20	M	40	128	128	256
21	M	40	8	4	16
22	M	40	16	8	16
23	M	41	64	64	256
24	M	43	128	64	128
25	M	43	128	128	512
26	M	43	64	32	64
27	M	43	64	64	256
28	M	45	16	32	128
29	M	45	16	32	128
30	M	49	64	64	256
31	M	50	32	16	64
32	M	50	32	32	64
33	M	52	8	4	8
34	M	56	16	16	16
35	M	56	2	2	2
36	M	58	64	64	256
37	M	58	16	16	16
38	M	59	32	32	64

Krvna skupina B - titer anti-A (ženske)

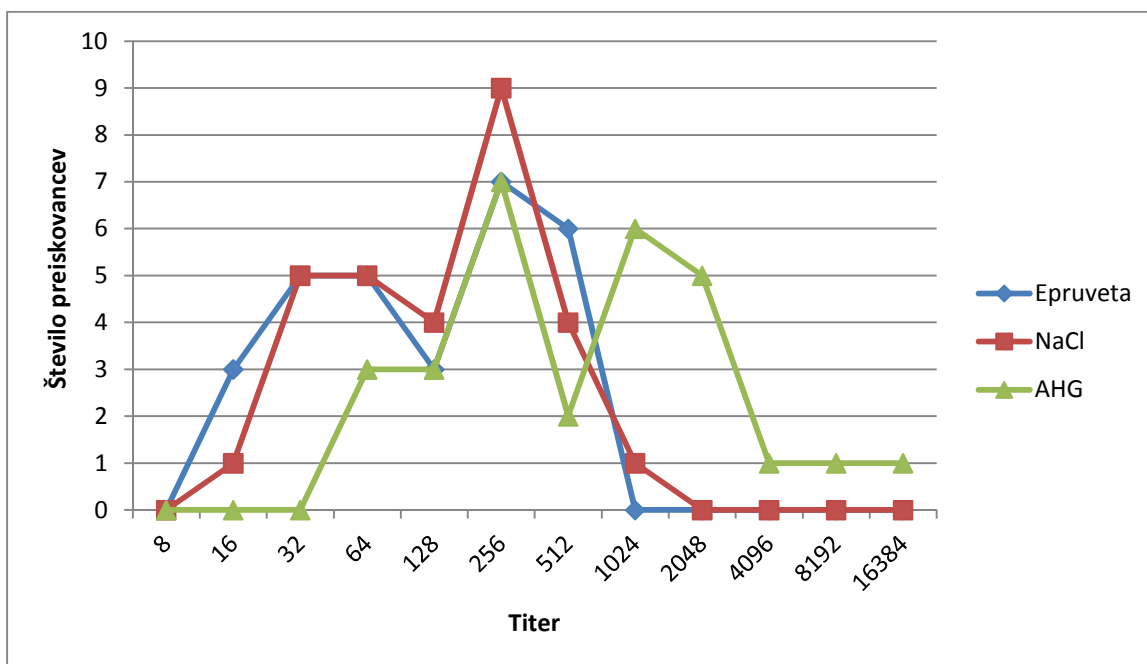
Št. Vzorca	Spol	Starost	titer epruveta	titer gel.k.NaCl	titer gel.k.AHG
1	Ž	21	256	128	512
2	Ž	21	128	128	256
3	Ž	23	64	128	64
4	Ž	25	64	64	256
5	Ž	25	16	8	16
6	Ž	26	64	128	256
7	Ž	26	32	32	128
8	Ž	31	64	32	64
9	Ž	32	32	64	128
10	Ž	34	64	128	256
11	Ž	37	64	64	128
12	Ž	38	64	64	256
13	Ž	40	256	512	2048
14	Ž	41	64	64	64
15	Ž	44	32	16	16
16	Ž	45	64	64	512
17	Ž	47	4	4	4
18	Ž	48	16	8	16
19	Ž	51	64	128	512
20	Ž	51	64	64	256
21	Ž	51	64	32	64
22	Ž	52	8	8	16

Priloga 2: Grafični prikaz titrov za posamezno krvno skupino.

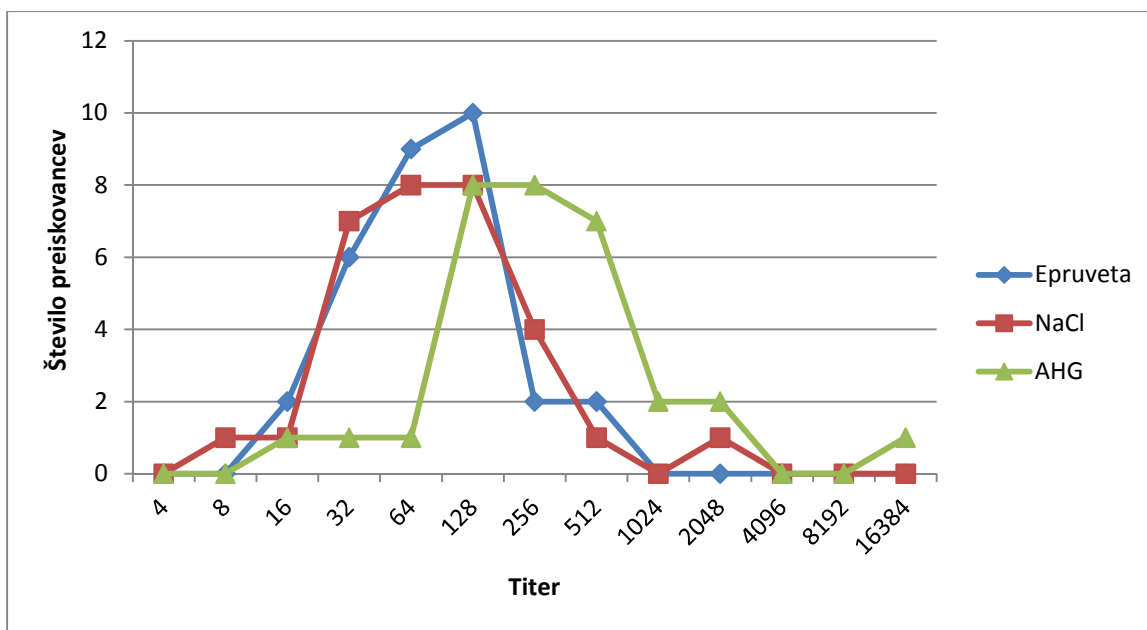
Krvna skupina O – titer anti-A (moški)



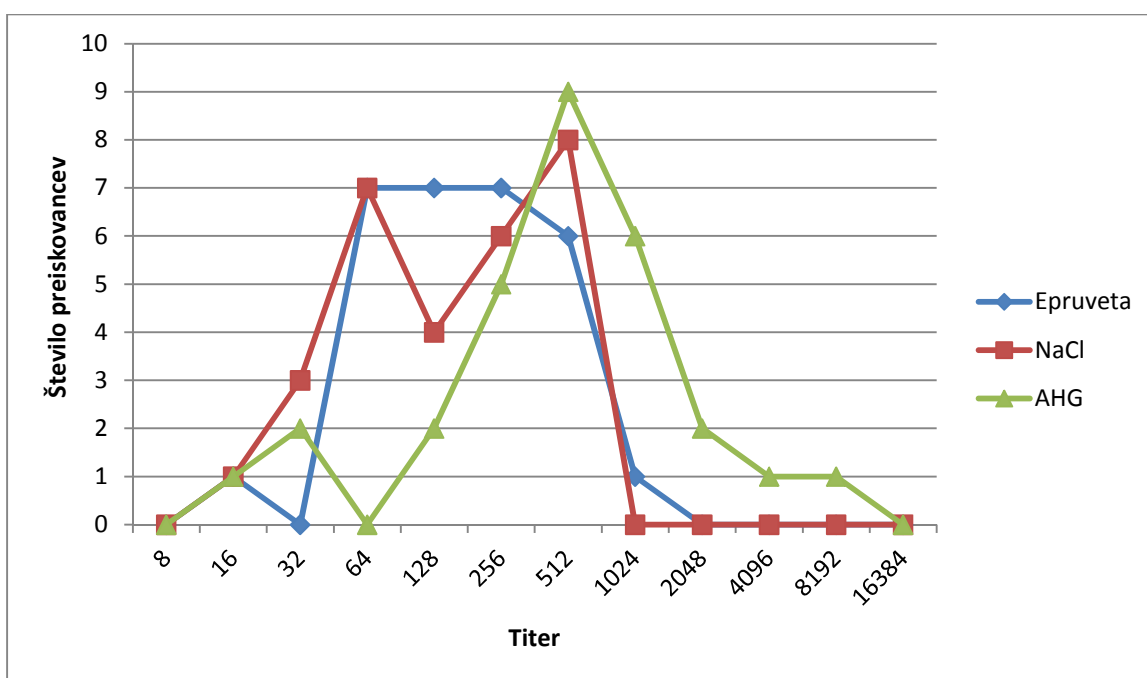
Krvna skupina O – titer anti-A (ženske)



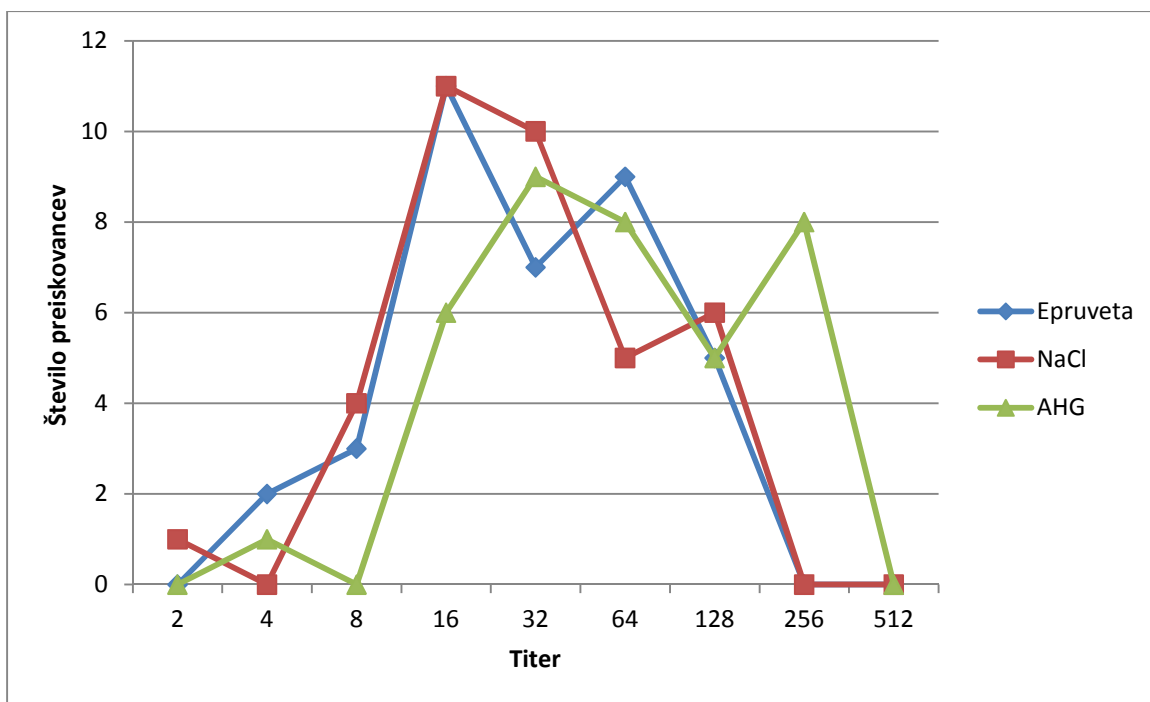
Krvna skupina O – titer anti-B (moški)



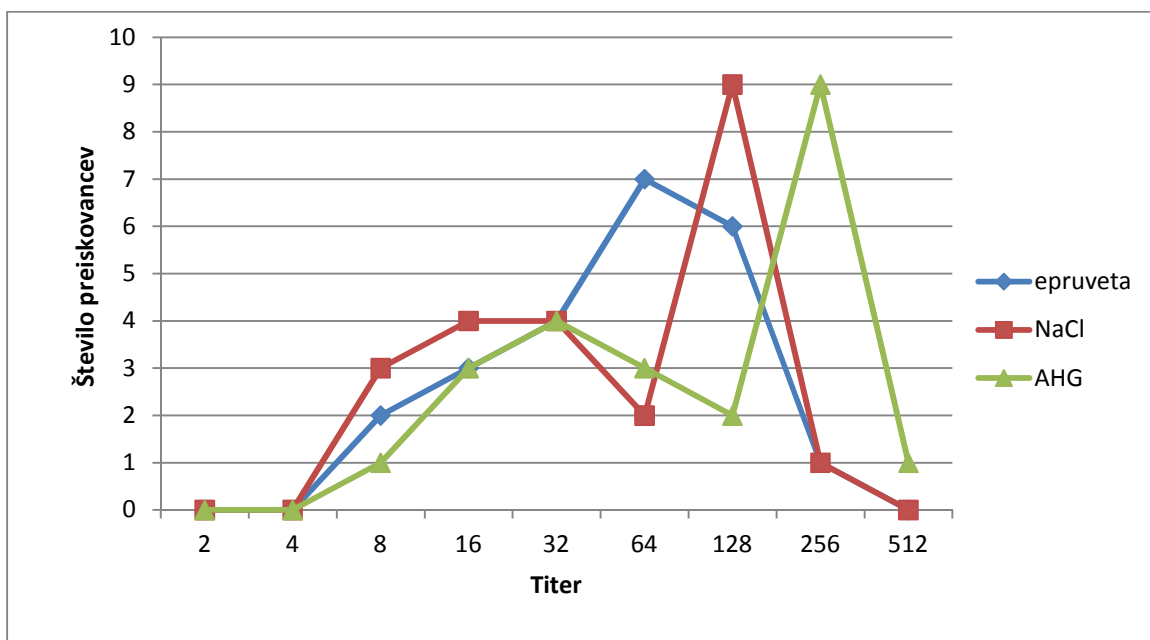
Krvna skupina O – titer anti-B (ženske)



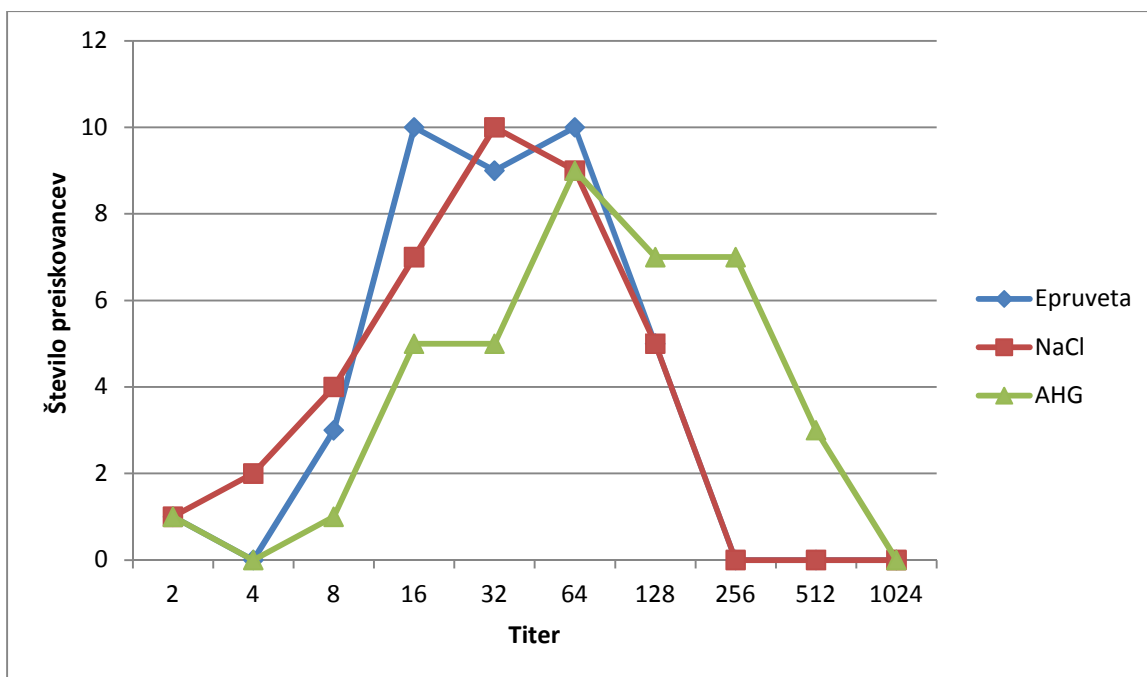
Krvna skupina A – titer anti-B (moški)



Krvna skupina A – titer anti-B (ženske)



Krvna skupina B – titer anti-A (moški)



Krvna skupina B – titer anti-B (ženske)

