

**Pozitivan direktni antiglobulinski test kod dobrovoljnog davaoca krvi – prikaz slučaja**

Kulić Đ. Andrijana, Libek I. Vesna, Strugar M. Ana,  
Nada M. Ranković

Služba za transfuziju krvi, Kliničko-bolnički centar  
Zemun-Beograd

**Apstrakt**

Direktni antiglobulinski test (Coombs-ov test) je test kojim se otkriva prisutnost antitela ili komponenti komplementa na eritrocitnoj membrani. Nalaz pozitivnog DAT-a kod doborovoljnih davalaca krvi je izuzetno retka pojava. Cilj našeg prikaza slučaja je bio da pokažemo da pozitivan DAT kod doborovoljnog davaoca krvi može biti uzrok smetnji tokom izvođenja testa kompatibilnosti (interreakcija), kod bolesnika sa multiplim eritrocitnim aloantitelima. Za izvođenje DAT-a koristili smo polispecifičan i monospecifične AHG test reagensi anti-IgG, anti-C3d (Seraclone®) za metodu u epruveti, a za metod u gelu ID Liss/Coombs kartice anti-IgG+C3d (DiaMed®). Tokom izvođenja testa kompatibilnosti, za hematološku bolesnicu sa prisutnim anti-K i anti-E iregularnim antitelima u serumu, sa fenotipiziranom jedinicom krvi dobijen je pozitivan rezultat na sobnoj temperaturi i u indirektnom antiglobulinskom testu. Daljim ispitivanjem testirani su eritrociti davaoca u direktnom antiglobulinskom testu. Metodom u epruveti sa polispecifičnim AHG test reagensom rezultat je bio pozitivan, a metodom u gelu sa Liss/Coombs karticama rezultat je bio negativan. Zbog diskrepancije u testiranju, DAT je izveden i sa monospecifičnim AHG reagensima. Samo sa anti-C3d monospecifičnim AHG reagensom metodom u epruveti eritrociti davaoca su imali pozitivan rezultat. Dobrovoljni davalac krvi je muškarac star 61 godinu koji boluje od hipertenzije i u terapiji koristi lek iz grupe ACE inhibitora. Rezultati krvne slike i biohemije nisu uklizivali na postojanje hemoliznog procesa. Etiologija i posledice ovog fenomena kod zdrave populacije još uvek nisu dovoljno ispitane, što zahteva obimnija i detaljnija istraživanja. Shodno tome, kod smetnji prilikom odabira jedinica krvi za primaoca treba imati u vidu i postojanje ovog fenomena.

**Ključne reči:** dobrovoljni davalac krvi, direktni antiglobulinski test, imunohematološka testiranja

**Positive direct antiglobulin test in voluntary blood donors - a case report**

Kulic Dj. Andrijana, Libek I. Vesna, Strugar M. Ana,  
Rankovic M. Nada

Department of Blood Transfusion, Clinical Hospital Center Zemun-Belgrade, Serbia

**Abstract**

Direct antiglobulin test (Coombs test) is used for the detection of antibodies or complement components on the red cell membrane. The result of a positive DAT in voluntary blood donors is extremely rare. The aim of our case studies was to demonstrate that the positive DAT in voluntary blood donors can be the cause of disturbances during the performance of compatibility test (crossmatch), in patients with multiple erythrocyte alloantibodies. For performing DAT we used polyspecific and monospecific AHG reagents anti-IgG, anti-C3d (Seraclone®) for the method in a test tube, and the ID Liss/Coombs card anti-IgG + C3d (DiaMed®) for the gel method. During the performance of the compatibility testing, for the haematological patient who has the anti-K and anti-E irregular antibodies in the serum, with phenotype blood unit, the positive result was obtained at room temperature and in the indirect antiglobulin test. In further examination, the donor red cells were tested in the direct antiglobulin test. In a test tube with polyspecific AHG reagent test result was positive, and in the LISS/Coombs gel method test result was negative. Because of discrepancies in testing, DAT was performed with monospecific AHG reagents. Only with anti-C3d monospecific AHG reagent in tube there was a positive result with donor erythrocyte. Voluntary blood donor was a man, 61 years old, who was suffering from hypertension, treated by ACE inhibitor medication. The results of blood counts and biochemistry did not indicate existence of haemolytic process. Aetiology and consequences of positive DAT in the healthy population are not yet sufficiently investigated. This requires extensive and detailed research. Accordingly, the disturbances in the selection of blood units for the recipient should be kept in mind the existence of this phenomenon.

**Keywords:** voluntary blood donor, direct antiglobulin test, immunohaematological testing

## Uvod

Direktan antiglobulinski test (Coombs-ov test) je test kojim se otkriva prisutnost antitela ili komponenti komplementa na eritrocitnoj membrani. Prvenstveno je marker imunog razaranja eritrocita in vivo produktima imunog odgovora organizma<sup>1</sup>. Pozitivan DAT sa ili bez skraćenja životnog veka eritrocita može biti prisutan kod mnogih bolesti i kliničkih stanja. Hemolizne anemije različite etiologije su u najvećem broju slučajeva DAT pozitivne. Hronično transfundovani bolesnici, bolesnici sa malignim ili autoimunim obolenjima, kao i bolesnici sa hipergamaglobulinemijom mogu imati pozitivan rezultat DAT-a<sup>2</sup>. Utvrđeno je da se pozitivan DAT susreće, kao slučajan nalaz, kod 1-15% hospitalizovanih bolesnika, bez kliničkih manifestacija hemolize<sup>3</sup>.

Svoju primenu u imunohematološkom testiranju DAT ima kod ispitivanja: hemolizne transfuzijske reakcije, hemolizne bolesti novorođenčeta, autoimune hemolizne anemije, autoimune hemolizne anemije uzrokovane lekovima, transplantacije kostne srži<sup>2,4</sup>.

Direktan antiglobulinski test se obavezno izvodi prilikom pripreme krvi za bolesnike koji su primali transfuzije koncentrata eritrocita u poslednja tri meseca, kao i kod novorođenčeta radi dijagnostike hemolizne bolesti novorođenčeta.

Nalaz pozitivnog DAT-a kod doborovoljnih davalaca krvi je izuzetno retka pojava. Prema podacima iz literature učestalost pozitivnog DAT-a kod doborovoljnih davaoca se kreće od 1 na 1000 (SAD) do 1 na 14000 (Velika Britanija, Francuska)<sup>5</sup>. Većina doborovoljnih davaoca krvi sa pozitivnim DAT-om je potpuno zdrava i ispunjava kriterijume za doniranje jedinice krvi.

Cilj našeg prikaza slučaja je bio da pokažemo da pozitivan DAT-a kod doborovoljnog davaoca krvi može biti uzrok smetnji tokom izvođenja testa kompatibilnosti (interreakcija), u okviru pretransfuzijskog testiranja bolesnika sa multiplim eritrocitnim aloantitelima.

## Materijal i metode

Uzorci krvi bolesnika i doborovoljnog davaoca krvi za pretransfuzijsko ispitivanje uzimane su u vakum epruvete sa EDTA. Sva imunohematološka ispitivanja izvedena su u skladu sa standardnim operativnim procedurama i prema uputstvima proizvođača. Za izvođenje DAT-a koristili smo polispecifičan (anti-IgG+C3d) i monospecifične AHG tečne test reagense anti-IgG, anti-C3d (Seraclone®) za metodu u epruveti, a za metod u gelu ID Liss/Coombs kartice anti-IgG+C3d (DiaMed®). Skrining iregularnih antitela i identifikacija kod bolesnika i davaoca izvedena je metodom u epruveti sa komercijalnim test eritrocitima Biotestcell I-II-III(Biorad®) i panelom Biotestcell 11 (Biorad®). Stepen aglutinacije za metodu u epruveti i metodu u gelu merena je skalom od 0 do +4<sup>6</sup>.

## Prikaz slučaja

U toku hospitalizacije bolesnice sa Odeljenja hematologije bilo je neophodno pripremiti dve jedinice koncentrata eritrocita u terapijske svrhe radi korekcije krvne slike. Bolesnici je od ranije određena krvno grupna pripadnost: O RhD pozitivna, Rh fenotip CcDee i Kell fenotip kk, sa prisutnim anti-K i anti-E iregularnim antitelima u serumu. Prisutnost multiplih eritrocitnih aloantitela u serumu primaoca zahtevala je ponavljanje skrininga i identifikacije antitela. Ponovljenom identifikacijom detektovano je samo iregularno anti-K, što je ukazivalo da je titar anti-E aloantitela pao ispod nivoa detektibilnosti u ovom testu. Iz tog razloga test kompatibilnosti (interreakcija) se morao izvesti sa fenotipiziranim jedinicom krvi, K i E negativnom. Tokom izvođenja testa kompatibilnosti (interreakcija) sa fenotipiziranim jedinicom krvi dobili smo pozitivan rezultat na sobnoj temperaturi i u indirektnom antiglobulinskom testu. DAT kod bolesnice je bio negativan. Daljim ispitivanjem testirali smo eritrocite davaoca u direktnom antiglobulinskom testu. Metodom u epruveti sa polispecifičnim AHG test reagensom rezultat je bio pozitivan, pri čemu je stepen aglutinacije iznosio +3, dok je metodom u gelu sa Liss/Coombs karticama rezultat bio negativan. Zbog diskrepance u testiranju, DAT

je izведен i sa monospecifičnim AHG reagensima. Samo sa anti-C3d monospecifičnim AHG reagensom metodom u epruveti eritrociti davaoca su imali pozitivan rezultat. U ovom testiranju stepen aglutinacije je iznosio +2. Retrospektivno, uvidom u bazu podataka dobili smo podatke o davaocu krvi. U ličnoj anamnezi dobrovoljni davalac krvi je muškarac star 61 godinu, koji unazad šest godina boluje od hipertenzije i u terapiji koristi lek iz grupe ACE inhibitora. Naknadno, davaocu su urađene analize krvne slike i biohemije. Vrednosti nekonjugovanog bilirubina, LDH i haptoglobina nisu ukazivale na postojanje hemoliznog procesa. Retestiranje DAT-a je urađeno nakon tri meseca gde su svi rezultati testa i u epruveti i u gelu bili negativni.

### Diskusija

Pozitivan direktni antiglobulinski test (DAT) se može povremeno javiti kod zdravih dobrovoljnih davaoca krvi i najčešće se otkriva kada su donorovi eritrociti inkomaptibilni u testu kompatibilnosti (interreakciji)<sup>7</sup>. Takav rezultat je dobijen tokom pretransfuzijskog testiranja hematološkog bolesnika u našem ispitivanju. To proistiće iz činjenice da se DAT rutinski ne izvodi prilikom testiranja uzoraka dobrovoljnih davalaca krvi i pripada paleti dopunskih imunohematoloških testova kod davaoca<sup>7</sup>.

U suštini, pozitivan DAT nastaje kao posledica in vivo oblaganja eritrocita imunoglobulinima i komponentama komplementa. Vezivanje antitela i komponenti komplementa za eritrocitnu membranu samo po sebi ne znači i oštećenje eritrocita i skraćenje njihovog životnog veka. Ukoliko je broj IgG molekula veći od 1000 IgG1 dolazi do klinički evidentne destrukcije eritrocita. Zato je za pravilnu interpretaciju pozitivnog DAT-a potrebno poznavati pacijentovu anamnezu, kliničke podatke i rezultate drugih laboratorijskih testiranja koji bi ukazivali na razvoj hemoliznog procesa<sup>8,9,10</sup>.

Primena različitih tehnika u testiranju kao što su aglutinacija u tečnoj sredini (epruveta) i gel tehnika, ali i kvalitet AHG test reagenasa mogu da u znatnoj meri utiču na rezultat DAT-a.

Donji prag osetljivosti DAT-a za IgG molekule iznosi 100-500 IgG i 400-1000 C3d molekula po eritrocitu za metodu u epruveti, dok je tehnikom u gelu moguće detektovati svega 70 do 150 molekula globulina po eritrocitu<sup>11,12</sup>. Izvodenje DAT-a gel metodom omogućilo je detekciju IgG molekula u niskoj koncentraciji, što je dovelo do povećanja broja pozitivnih rezultata testa kod ispitanika. Istraživanje sprovedeno na 64 uzorka dobrovoljnih davaoca krvi sa pozitivnim DAT-om pokazalo je slabiju osetljivost gel metode za otkrivanje eritrocita obloženih samo sa C3d komponentom komplementa u odnosu na metodu u epruveti<sup>13</sup>.

U našem prikazu slučaja eritrociti davaoca su bili obloženi samo sa C3d komponentom komplementa. To je evidentirano i u studijama u kojima su kod 40–47% dobrovoljnih davalaca krvi sa pozitivnim DAT-om detektovane samo komponente komplementa (C3d). Neka istraživanja su ukazala na činjenicu da je prisustvo ovih fragmenata na eritrocitima dokaz o kontinuiranoj aktivaciji sistema komplementa slabog inteziteta i da ne uključuje specifičnu reakciju antigen-antitelo. Zato se za njih kaže da su „nevino prisutni“ i prave smetnju u imunohematološkom testiranju<sup>14</sup>.

Na etiologiju pozitivnog DAT-a kod dobrovoljnih davalaca krvi utiče niz faktora. Češće se otkriva kod starijih dobrovoljnih davalaca u odnosu na mlađe. Takođe, ovakav rezultat može da perzistira godinama kod pojedinih ljudi bez ikakvih simptoma, dok je kod ostalih povezan sa virusnim infekcijama, imunološkim poremećajima ili primenom određenih lekova<sup>14</sup>.

Posledice i prognoza davaoca kod kojih je ustanovljen pozitivan DAT još uvek nisu dovoljno ispitane. Jedna prospективna kohortna studija utvrdila je da ovi davaoci imaju povećan rizik za razvoj maligniteta posebno hematoloških i to 2,4 puta veći rizik u odnosu na davaoce sa negativnim DAT-om. Iz tog razloga se smatra da su neophodna dalja ispitivanja u smislu potvrde ove povezanosti i otkrivanja faktora rizika za malignitet u ovoj grupi<sup>15</sup>.

## Zaključak

Na efikasnost transfuzije labilnim krvnim komponentama značajno utiču rezultati dobijeni pretransfuzijskim testiranjem primaoca i davaoca. Primena osnovnih principa imunohematološkog testiranja je neophodna za odabir kompatibilne jedinice krvi za bolesnika. Ipak, pozitivan rezultat DAT-a kod davaoca može dodatno da oteža i iskomplikuje odabir odgovarajuće komponenete za transfuziju kod bolesnika sa prisutnim eritrocitnim aloantitelima u serumu. Etiologija i posledice ovog fenomena kod zdrave populacije još uvek nisu dovoljno ispitane, što zahteva obimnija i detaljnija istraživanja. Shodno tome, kod smetnji prilikom odabira jedinica krvi za primaoca treba imati u vidu i postojanje ovog fenomena.

## Literatura

1. American Association of Blood Banks. Red cell antigenantibody reactions and their detection. In: Brecher ME, editor. Technical Manual – 15 th ed, Bethesda, MD: AABB; 2005: 271-87.
2. American Association of Blood Banks. The positive direct antiglobulin test and immune-mediated red cell destruction. In: Brecher ME, editor. Technical Manual – 15 th ed, Bethesda, MD: AABB; 2005:453-82..
3. Judd WJ, Butch SH, Oberman HA, et al. The evaluation of a positive direct antiglobulin test in pretransfusion testing. Transfusion 1980;20:17-23
4. Working party of the British Committee for Standards in Haematology, Blood transfusion task Force. Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. Transf Med. 2004; 14: 59-73
5. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Red cell antibodies. Blood transfusion in clinical medicine. 11th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications 2005:410-52.
6. S. Jovanović Srzentić, D. Veljković. Imunobiološki i klinički značaj krvnih grupa. Inra.Net Communication Beograd; 2009:151
7. Judd WJ, Barnes BA, Steiner EA et al. The evaluation of a positive direct antiglobulin test (autocontrol) in pretransfusion testing revisited. Transfusion 1986;26:220-224
8. Garratty G. The James Blundell Award Lecture 2007: Do we really understand immune red cell destruction? Transfus Med 2008;18:321-4
9. Nicole D. Zantek, Scott A. Koepsell, Daryl R. Tharp Jr., Claudia S. Cohn . The direct antiglobulin test: A critical step in the evaluation of hemolysis American Journal of Hematology 2012;87:707-709
10. American Association of Blood Banks. Investigation of a positive direct antiglobulin test. In: Brecher ME, editor. Technical Manual – 15 th ed, Bethesda, MD: AABB; 2005:771-91.
11. Bellia M, Georgopoulos J, Tsevrenis V, Nomikou E, Vgontza N, Kontopoulou-Griva I. The investigation of the significance of a positive direct antiglobulin test in blood donors. Immunohematology 2002;18:78-81.
12. A.J. Sweeney Problems highlighted when using anticoagulated samples in the standard tube low ionic strength antiglobulin test Immunohematology 2006;22:72–77.
13. Tissot J-D, Kiener C, Burnand B, Schreider P. The Direct antiglobulin test: still a place for the tube technique? Vox Sanq. 1999;77:223-6
14. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Red cell antibodies. Blood transfusion in clinical medicine. 11th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications ;2005:263-264.
15. Y. Rottenberg, V. Yahalom, E. Shinar, M. Barchana, B. Adler, O Paltie Blood donors with positive direct antiglobulin tests are at increased risk for cancer. Transfusion 2009;49:838-842.

Autor za korespondenciju:  
Andrijana Kulic  
Služba za transfuziju krvi KBC Zemun,  
Beograd, Vukova 9  
Telefon:2614442  
Email: [kulic.andrijana@gmail.com](mailto:kulic.andrijana@gmail.com)