

Na prawidłowy przebieg testu składa się wiele czynników. Przede wszystkim zależy on od liczby i lokalizacji antygenów na powierzchni erythrocytu. Ważna jest również temperatura reakcji: **przeciwciała IgG najlepiej reagują w temperaturze 37°C (ciepłe aglutyniny), natomiast przeciwciała klasy IgM w temperaturze 4°C lub maksymalnie w temperaturze pokojowej (zimne aglutyniny).**

Klasyczne testy aglutynacji przeprowadzane na szkiełkach lub w probówkach są coraz częściej zastępowane przez mikrometody kolumnowe, znacznie prostsze, wygodniejsze oraz szybsze w wykonaniu. Są one również bardzo czułe, dzięki czemu umożliwiają wykrycie bardzo słabo reagujących przeciwciał.

18.6.1.1. Wykrywanie przeciwciał w klasie IgM

Przeciwciała w klasie IgM (kompletne aglutyniny) wykrywa się przez inkubację surowicy osoby badanej ze wzorcowymi krwinkami grup O, A oraz B w temperaturze pokojowej w fizjologicznym roztworze NaCl.

18.6.1.2. Wykrywanie przeciwciał w klasie IgG

Przeciwciała w klasie IgG (niekompletne aglutyniny) wytwarzane są tylko u osób, które uległy immunizacji antygenami w obrębie układów grup krwi. Ze względu na brak zdolności wywołania aglutynacji w fizjologicznym roztworze NaCl przez przeciwciała IgG stosuje się metody, które mają na celu zmniejszenie potencjału zeta (np. reakcja w roztworze koloidalnym, w obecności protaminy, enzymów proteolitycznych papainy lub trypsyny, w środowisku o obniżonej sile jonowej, *low ionic strength solution*, LISS). Znacznie częściej wykorzystuje się jednak testy antyglobulinowe.

18.6.1.2.1. Test antyglobulinowy

Ze względu na charakter niekompletnych aglutynin do wykrywania przeciwciał w klasie IgG używa się testu antyglobulinowego zwanego testem Coombsa. Wykorzystuje się w nim poliklonalne antyludzkie przeciwciała uzyskane od zwierząt doświadczalnych, które wiążą się z ludzkimi przeciwciałami (surowica antyglobulinowa), prowadząc do aglutynacji krwinek związanych z przeciwciałami. Surowica antyglobulinowa zawiera również przeciwciała skierowane przeciwko C3, które pozwalają na wykrycie składników układu dopełniacza na powierzchni erythrocytów. Znane są 2 odmiany tego testu: bezpośredni i pośredni test antyglobulinowy (ryc. 18.10).

18.6.1.2.1.1. Bezpośredni test antyglobulinowy (BTA)

W teście tym wykrywane są przeciwciała, które związały antygeny na powierzchni erythrocytów w organizmie, czyli *in vivo*. Erythrocyty wyizolowane z krwi są inkubowane z surowicą antyglobulinową. Jeżeli zostały opłaszczane przez przeciwciała, są wiązane przez przeciwciała w surowicy

antyglobulinowej, wywołując aglutynację. Bezpośredni test antyglobulinowy jest stosowany:

- u noworodków z podejrzeniem choroby hemolitycznej,
- u chorych z podejrzeniem niedokrwistości autoimmunohemolitycznej,
- u biorców krwi w przypadku wystąpienia powikłań potransfuzyjnych,
- u noworodków urodzonych przez kobiety Rh ujemne,
- u niemowląt do 4. miesiąca życia, przy dobieraniu krwi do transfuzji.

Należy pamiętać, że bezpośredni test antyglobulinowy może dać wynik fałszywie dodatni, np. u pacjentów z hipergammaglobulinemią.

18.6.1.2.1.2. Pośredni test antyglobulinowy

Pośredni test Coombsa wykrywa wolne aloprzeciwciała odpornościowe obecne w surowicy krwi po uprzednim zaabsorbowaniu ich *in vitro* na wzorcowych krwinkach czerwonych. Krwinki te zawsze są grupy O oraz mają znane pozostałe antygeny grupowe. Jest on podstawową metodą identyfikacji antygenów i przeciwciał grupowych poza układem ABO.

W pośrednim teście antyglobulinowym badaną surowicę najpierw inkubuje się ze wzorcowymi krwinkami. Następnie ją odplukuje, aby usunąć przeciwciała niezwiązane z erythrocytami. W kolejnym etapie do krwinek dodaje się surowicę antyglobulinową, która w przypadku związania przeciwciał znajdujących się w badanej surowicy z krwinkami wywołuje aglutynację. Pośredni test antyglobulinowy jest elementem próby zgodności krwi przed przetoczeniem. Ujemny wynik pośredniego testu antyglobulinowego między krwinkami dawcy a surowicą biorcy krwi (próby krzyżowej) jest koniecznym warunkiem pozwalającym na przeprowadzenie transfuzji. Pośredni test antyglobulinowy jest stosowany do:

- wykrycia aloprzeciwciał odpornościowych w surowicy krwi,
- wykrywania przeciwciał odpornościowych u kobiet ciężarnych,
- badania antygeny D,
- dobierania krwi do transfuzji,
- oznaczania antygenów na krwinkach.

18.6.1.3. Próba zgodności

Aby zmniejszyć częstość powikłań potransfuzyjnych, przed przetoczeniem krwi choremu konieczne jest wykonanie próby zgodności. Według obecnych zaleceń próba zgodności obejmuje:

- oznaczenie antygenów układu ABO u dawcy i biorcy,
- oznaczenie antygeny RhD u biorcy i dawcy, jeżeli biorca jest RhD-ujemny,
- przeprowadzenie testów na obecność przeciwciał odpornościowych w surowicy biorcy z układu Rh, Kell, Kidd, Duffy, Lewis, MNS, P1PK,
- przeprowadzenie właściwej próby krzyżowej.