

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Vyšetřování krevních skupin a screening protilátek
Bakalářská práce

Autor: Michaela Vojtová

Vedoucí práce: MUDr. Karel Blažek

17.8.2009

Investigation of blood groups and screening of antibodies

Blood transfer – transfusion – is today's most frequent transplantation. Blood is transferred from healthy donor to ill recipient. Result of translation depends on antigens and antibodies of blood groups, which are specific to each individual. We distinguish blood groups dictated by leukocytes (white blood cells), trombocytes (platelets), and erythrocytes (red blood cells). Blood group antigens are most frequently located on cell membranes. Antibodies are located in blood plasma; we distinguish two types. Natural antibodies are the first type of antibodies, which are present in blood without any prior immunization. Immune or obtained antibodies are those, who are present after immunization of a patient by transfer of blood of other group or in women during pregnancy. Today, transfusion of erythrocytes or of blood plasma is the most frequent. Before transfusion, it is necessary to find out whether donor's antibodies do not react with recipient's antigens in case of plasma transfusion and/or whether recipient's antibodies do not react with donoer's antigens in case of erythrocyte transfusion. For this reason, blood groups are investigated and antibodies screening is performed before each transfusion. During blood group investigation, antibodies and antigens of two most important blood systems are checked. This concerns AB0 system and Rh system, where non-presence of main antigen D is checked. Antigen D is very strong antigen with great antigenous force, which frequently provokes creation of antibodies. Blood group system AB0 is the only system which includes natural antibodies against antigens, which are not present on the surface of erythrocytes. In case of blood group system Rh, only immune antibodies are known. Other blood groups systems include antigens with lesser antigenous force. These systems are only important when antibodies are present. So-called antibodies screening is a method which checks for presence of antibodies. There are two methods to consider. First method uses a test tube, while the other uses gel agglutination in solid phase. My Bachelor Work compares both systems in the following areas: reliability, validity, effort, and cost.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Vyšetřování krevních skupin a screening protilátek vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které uvádím v příložené bibliografii.

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích.....

.....

podpis studenta

Poděkování

Děkuji tímto vedoucímu mojí bakalářské práce panu doktoru Karlovi Blažkovi za rady a čas, který mi věnoval. Také děkuji ostatním zaměstnancům Biochemicko-hematologické laboratoře Laboma s.r.o. za pomoc při praktickém zpracování mojí bakalářské práce.

Obsah

1. Současný stav	9
1.1. Historie transfuzí	9
1.2. Krevní skupiny	10
1.2.1. Charakteristika	10
1.2.2. Antigeny krevních skupin	11
1.2.3. Protilátky krevních skupin	12
1.3. Skupinový systém AB0	13
1.3.1. Historie objevu	13
1.3.2. Charakteristika systému	14
1.3.3. Dědičnost krevních skupin AB0 systému	15
1.3.4. Vývoj AB0 systému u člověka	16
1.3.5. Vzácné abnormality v AB0 systému	16
1.3.6. Význam AB0 systému pro transfuzi	18
1.4. Rh systém	19
1.4.1. Historie objevu	19
1.4.2. Charakteristika systému	20
1.4.3. Dědičnost Rh systému	21
1.4.4. Význam Rh systému pro transfuzi	22
1.5. Další krevní skupinové systémy	22
1.6. Screening protilátek	23
1.7. Způsoby vyšetření	24
1.7.1. Typy metod	24
1.7.2. Diagnostická séra, lektiny	26
1.7.3. Typové krvinky	27
1.7.4. Vyšetření krevní skupiny v AB0 systému	27
1.7.5. Vyšetření Rh systému	30
1.7.6. Screening protilátek	31
1.7.7. Určení specity protilátek	34

2. Cíl práce a hypotézy	35
2.1. Cíl práce	35
2.2. Hypotézy	35
3. Metodika	36
4. Výsledky	37
4.1. Stanovení krevních skupiny v systému AB0	37
4.2. Stanovení krevní skupiny v systému Rh	38
4.3. Screening protilátek	39
4.4. Srovnání metod stanovení AB0 a Rh skupiny a screeningu protilátek	39
5. Diskuse	40
6. Závěr	43
7. Seznam použité literatury	44
8. Klíčová slova	46
9. Přílohy	47

ÚVOD

Krevní převod- transfuze- je v dnešní době nejčastěji prováděná transplantace. Krevní transfuze je léčebný zákrok, při kterém převádíme krev zdravého člověka dárce do krevního oběhu nemocného příjemce. Při transfuzi nahrazujeme nemocnému krev, kterou ztratil, nebo jednotlivé složky krve, které mu chybí. Dnes se nejčastěji provádí transplantace erytrocytů. Erytrocyty, stejně jako všechny ostatní buňky lidského těla, mají na svém povrchu znaky antigenního charakteru. Pokud tyto znaky dárce nesouhlasí se znaky příjemce, jsou imunitním systémem příjemce rozpoznány jako cizí a dochází ke vzniku imunitní reakce. V případě, že se do krevního oběhu příjemce dostalo velké množství erytrocytů, které jsou rozpoznány jako cizí, dochází ke shlukování jednotlivých erytrocytů, takzvané aglutinaci, tato reakce je velice prudká a může vést až k úmrtí příjemce. Pokud je množství cizích antigenů malé je reakce slabší nebo se vůbec neprojeví, vznikají ale nepravidelné imunní protilátky, které mohou příjemce ohrožovat při dalších transfúzích. Protilátky mohou vznikat u žen také během těhotenství, pokud jejich plod má některé antigenní znaky od otce, které se nevyskytují na membránách erytrocytů matky. Tyto protilátky mohou pronikat z krevního oběhu matky přes placentu do krevního oběhu plodu, dochází pak k různému stupni poškození plodu, v závažných případech až k potratu. Takto vzniklé protilátky zůstávají v krevním oběhu matky a při dalším těhotenství mohou ohrozit i další plod, který má příslušné antigeny, proti kterým jsou dané protilátky vytvořeny. Proto je nutné při transfuzi dodržovat pravidlo o kompatibilitě krve dárce a příjemce a kontrolovat těhotné ženy, jestli netvoří protilátky proti antigenům plodu. O kompatibilitě mluvíme tehdy, jsou-li antigenní znaky dárce a příjemce shodné a po transfuzi tak nedochází k imunitní reakci ani k tvorbě protilátek.

Jednotlivé antigeny se rozdělují podle různých znaků do různých skupin, které se nazývají krevní skupinové systémy. V těchto skupinových systémech jsou antigeny z podobnými antigenními vlastnostmi a k nim patřící příslušné protilátky proti těmto antigenům. Nejznámější a nejvýznamnější krevně skupinovým systémem je systém ABO, další významný krevně skupinový systém je Rh systém, vyšetření antigenů a protilátek těchto systémů se označuje jako vyšetření krevních skupin a provádí se u všech dárců a příjemců

krve a u všech těhotných žen. Antigeny dalších krevně skupinových systémů mají menší důležitost a slabší schopnost imunizace příjemce nebo těhotné ženy, jsou významné jen tehdy, jsou-li přítomny protilátky. Vyšetření přítomnosti těchto protilátek označujeme jako screening protilátek a stejně jako vyšetření krevních skupin se vyšetřují u dárců a příjemců krve a u těhotných.

1. SOUČASNÝ STAV

1.1. Historie transfuzí

Významu krev pro život si byli lidé vědomi vždycky. Myšlenka vpravit pro léčebné účely do těla ať již krev nebo jiné léčivé roztoky se ovšem mohla objevit až v době, kdy byla známá již existence krevního oběhu. První pokusy o zavedení roztoků do krevního oběhu se uskutečnily v polovině 17. století. Nejdříve se prováděly krevní převody mezi zvířaty, ale brzy se objevily i pokusy o převod krve ze zvířete na člověka. Pařížský profesor J. Denis provedl v roce 1668 první převod zvířecí (beránčí) krve na člověka. Z celkem osmi transfuzí však jen dvě mohly být označeny jako úspěšné. Ani výsledky anglických a italských vědců nebyly dobré, a tak kolem roku 1680 byly další transfuze pro svůj krajně riskantní charakter zakázány. Neúspěchy, které zákonitě tyto pokusy provázely, vedly pak ke vzniku mylného předpokladu. Z výsledků totiž badatelé posléze usoudili, že je-li nebezpečná krev zvířecí, pak stejně rizikový by byl i převod krve lidské. O přímém převodu krve mezi lidmi se tak sice diskutovalo jako o možném léčebném prostředku, ale doložený úspěšný pokus byl proveden až v 19. století. V roce 1818 úspěšně provedl Angličan James Blundell převod lidské krve na člověka, umírajícího na rakovinu. Pokusů pak přibývalo i v dalších zemích a v roce 1875 již existoval jakýsi soupis provedených transfuzí, který obsahoval 478 případů, z nichž ovšem ve 129 případech se jednalo o převod krve zvířecí. Výsledky v každém případě nesplnily očekávání a nebyly nikterak povzbuzující. Jen 150 převodů, tedy méně než polovina proběhla příznivě. Ostatní provázely komplikace, často smrt. (1) Dlouho nebylo jasné, proč některé převody jsou život zachraňující a jiné končí smrtí pacienta. Tuto otázku vysvětlil až objev krevních skupinových systémů. Tento objev odhalil příčiny komplikací, které transfuze krve dříve provázely. Díky objevu krevních skupinových systémů došlo k masivnímu rozšíření transfuze jako léčebné a život zahraňující metody.

1.2. Krevní skupiny

1.2.1. Charakteristika

Pojmem krevní skupiny rozumíme přítomnost určitých molekul na povrchu krevních buněk a zároveň přítomnost pravidelných nebo nepravidelných protilátek v plazmě proti těmto molekulám. Podle přítomnosti protilátek a jim příslušných antigenů rozdělujeme jedince do různých krevních skupin. Máme krevní skupiny leukocytů, trombocytů a erytrocytů. Ve své práci se budu věnovat krevním skupinám erytrocytů. U člověka jsou to skupinové systémy AB0, Rh, Kell a jiné.

Krevní skupinové systémy erytrocytů jsou staré nejméně několik milionů let a proto imunitní systém je omezen v tvorbě protilátek proti některým původcům chorob s podobnými antigenními vlastnostmi. (7) Díky tomu může být různý výskyt některých krevních skupin v některých částech světa ovlivněn častějším výskytem některých nemocí. Například skupina A má podobné antigenní vlastnosti jako nositel varioly, u těchto lidí probíhá toto onemocnění výrazněji. Jedinci se skupinou 0 mají antigen H, který se podobá původci moru *Jersinia pestis*, proto je tato skupina vzácná v centrech, ve kterých dříve mor krutě řádil.

Velmi mnohé antigeny a je určující genetické systémy jsou fylogeneticky staré, částečně přešlé z prokaryontů na eukaryonty. Na vytváření krevní skupiny se může podílet různý genetický podklad s různě účinnými alelami. (7) Krevní skupiny jsou dědičné vlastnosti dané pro celý život. Jsou přebírány od rodičů prostřednictvím genů. (3)

Klinicky nejvýznamnější jsou systémy AB0 a Rh. V systému Rh se hlavně vyšetřuje přítomnost nebo nepřítomnost antigenu označeného jako antigen D. Vyšetření krevních skupin se v dnešní době provádí u všech dárců krve, příjemců krevních přípravků a u těhotných žen. Při vyšetření krevních skupin rozlišujeme antigeny na povrchu krevních buněk a protilátky přítomných v séru.

1.2.2. Antigeny krevních skupin

Všechny krevní skupinové substance jsou v přesném smyslu definice antigeny, které mohou stimulovat cizí imunitní systém, v závislosti na jeho stupni cizosti a antigenní síle, k tvorbě specifických protilátek. (3) Při tvorbě krevně skupinových antigenů se zpravidla uplatňuje soubor komplexů různých genů na různých chromozomech.

Antigeny jsou také někdy označovány jako aglutinogeny. Jsou to povrchové molekuly na membránách erytrocytů.

Krevně skupinové antigeny vznikají dvěma způsoby. Prvním způsobem je přímý genetický přenos, kdy geny přímo kódují krevně skupinový antigen, takto vznikají například antigeny u Rh systému. Druhým způsobem je nepřímý genetický přenos, kdy prvotní produkty krevně skupinových antigenů jsou enzymy, které postupně vytváří konečné antigeny, tento způsob se uplatňuje u systému AB0.

Během několika posledních let byla mnohem víc objasněna funkce krevně skupinových antigenů na membránách erytrocytů. Spousta skupinových antigenů je umístěna na bílkovinách, zodpovědných za transport, například cukrů a vody přes membrány. Jiné antigeny slouží jako receptory pro různé mikroorganismy.

Antigeny krevních skupin patří ke 3 různým biochemickým skupinám. Mohou to být glykoproteiny obsahující cukernou a bílkovinou složku, vyskytující se například u antigenů AB0 systému vylučovaných ve slinách. Dále to mohou být glykolipidy obsahující cukernou a lipidovou složku. Do této skupiny patří na membráně lokalizované antigeny AB0 systému. Posledním skupinou antigenů jsou lipoproteiny obsahující lipidovou a bílkovinou složku. Jsou to například antigeny Rh systému na membráně erytrocytů. Pro antigeny glykoproteinové a glykolipidové je za antigenní specifiku zodpovědná uhlíková část, u lipoproteinů je to proteinová část.

1.2.3. Protilátky krevních skupin

Krevně skupinové antigeny mohou indukovat tvorbu protilátek, např. následkem krevní transfúze. Protilátky jsou vytvářeny plazmatickými buňkami a nacházejí se hlavně v plazmě, někdy však i v jiných tělních tekutinách. (4) Protilátky nazýváme aglutininy. Protilátky v krevním systému AB0, které jsou přítomny i bez imunizace, můžeme označovat jako izoaglutininy.

Krevně skupinové protilátky mohou být klasifikovány různým způsobem, například: na základě původu antigenu, proti kterému jsou namířeny, na základě příčiny tvorby protilátek nebo sérologického chování protilátky. (4)

Na základě původu antigenu se protilátky dělí na dvě skupiny. První skupinou jsou aloprotilátky, které jsou namířené proti antigenům od cizího jedince. Tyto protilátky vznikají jako důsledek předchozí imunizace. Druhou skupinou jsou autoprotilátky, namířené proti vlastním antigenům.

Další rozdělení je podle příčiny, která způsobila tvorbu protilátek. V séru většiny lidí se nacházejí krevně skupinové protilátky i bez předchozího kontaktu s cizími erytrocyty. Tyto protilátky se nazývají „přirozeně se vyskytující“. Tvoří se pod vlivem antigenů, které úzce souvisí s krevně skupinovými antigeny (většinou pocházejí ze střevních bakterií). Oproti přirozeně se vyskytujícím protilátkám existují protilátky, které jsou výsledkem známé imunizace, jako je krevní transfúze nestejnoskupinové krve nebo těhotenství. Přirozeně se vyskytující protilátky a imunní protilátky se liší jedna od druhé z hlediska sérologických charakteristik. Přirozeně se vyskytující protilátky často optimálně reagují při nižších teplotách a obvykle patří do třídy IgM, zatímco imunní protilátky obvykle nejlépe reagují při 37°C a patří do třídy IgG. (4) Krevně skupinové protilátky většiny krevních systémů jsou nepravidelné neboli imunní. Výjimkou jsou protilátky krevně skupinového systému AB0 vyskytující se přirozeně i bez předchozí imunizace.

Podle sérologických vlastností protilátky dělíme protilátky na kompletní a inkompletní. Hlavním znakem pro rozdělení protilátek do těchto skupin je schopnost vyvolat aglutinaci. V imuno hematologii se jako klasická metoda k průkazu reakce mezi antigenem a protilátkou používá aglutinační technika. Tato technika je založena na

skutečnosti, že protilátky navázané na antigenních determinanty na erythrocytech mohou (s podporou nebo bez podpory) vytvářet můstky mezi těmito krvinkami, což způsobuje aglutinaci erythrocytů. (4) Z tohoto hlediska rozdělujeme protilátky na kompletní a inkompletní. Kompletní protilátky jsou schopny aglutinovat krvinky přímo. Tyto protilátky zpravidla patří do třídy IgM a přímá aglutinace je umožněna díky jejich velikosti, jsou totiž schopné překlenout vzdálenost mezi jednotlivými erythrocyty suspendovanými v solném prostředí. Druhou skupinou jsou inkompletní protilátky, které zpravidla patří do třídy IgG. Inkompletní protilátky nejsou schopny krvinky přímo aglutinovat pro svou menší velikost. Skutečnost, že aglutinace nenastává vždy přímo je způsobena určitou vzdáleností mezi krvinkami. Mnoho bílkovin přítomných na membráně erythrocytů má negativní elektrický náboj. Ve vodných roztocích se poté kolem krvinky vytvoří vodní plášť s pozitivně nabitými ionty. Vzniká tak rozdíl v potencionálu mezi negativně nabitými erythrocyty a kationy v médiu který se nazývá zeta potenciál. Tento potenciál způsobuje, že se v náplavu mezi krvinkami vytváří odpudivé elektrostatické síly. Krvinky jsou proto od sebe vzdáleny asi 20-30 nm. Aby došlo k aglutinaci, musí být protilátky schopny tuto vzdálenost překonat. Aby proběhla aglutinace i u inkompletních malých protilátek, je třeba těmto protilátkám pomoci, nejlépe zeslabením vlivu zeta potenciálu. Tím se u inkompletních protilátek dosahuje stejné aglutinace jako u kompletních protilátek. (8)

1.3. Skupinový systém AB0

1.3.1. Historie objevu

Objev krevních skupin je připisován vídeňskému vědci Karlovi Landsteinerovi, který v roce 1901 objevil tři krevní skupiny A, B a C, dnešní A, B a 0. Roku 1902 popsali rakouští vědci A. van Descatello a A. Sturli krevní skupinu AB jako „výjimku z Landsteinerova pravidla“. Roku 1907 nezávisle na nich popsal český psychiatr Jan Jánský čtvrtou krevní skupinu, která obsahuje znaky A i B. (12) Jánský zkoumal závislost mezi duševně nemocnými a vlastnostmi jejich séra. Nenašel žádnou spojitost. Jako vedlejší produkt své práce ale odhalil, že populace se dá rozdělit do čtyř skupin na základě

vlastností jejich séra. Jánský používal označení I, II, III a IV. Nezávisle na Jánským popsal roku 1910 čtyři krevní skupiny Američan William Lorenzo Moss. Použil také označení římskými číslicemi, ale v opačném pořadí než Jánský. Ve třicátých letech 20. století se sjednotilo označování krevních typů A, B, AB a 0. (12) V některých jazycích, mimo jiné v angličtině, se používá zápis ABO s písmenem O, v jiných jazycích například v češtině se používá zápis AB0. (10)

1.3.2. Charakteristika systému

Krevní skupinový systém AB0 a k němu patřící krevní skupiny je nejdéle známý krevní skupinový systém. Patří k němu 4 základní krevní skupiny A, B, AB a 0. (8)

Na světě je nejčastější skupina krevní skupina 0, ale v některých oblastech, například ve Švédsku a Norsku a také v České Republice, je nejběžnější typ A. Skupina AB je nejméně častá. Jsou popsána určitá regionální a rasová rozdělení lidské krve podle přítomnosti antigenů AB0 systému. (10)

Systém AB0 je definován 3 znaky- aglutinogeny A, B a H. Fenotypicky existují tedy 4 různé krevní skupiny AB0 systému. Přítomnost antigenu A určuje skupinu A. Přítomnost antigenu B určuje skupinu B. Přítomnost antigenu A i B určuje skupinu AB. Přítomnost samotného antigenu H určuje skupinu 0. (7) Antigeny systému AB0 se nevyskytují pouze na červených krvinkách, ale také v jiných tkáních jako jsou ledviny, játra, plíce. Mimo jiné ovlivňují i srážení krve. (10)

Aglutinogeny A a B se nevyskytují ve všech erytrocytech ve stejné antigenní síle. Mimo hlavní antigeny krevních skupin AB0 existuje několik kvalitativně i kvantitativně odlišitelných druhů antigenů A a B. Tyto navzájem příbuzné, ale přitom svojí antigenitou a strukturou odlišné druhy antigenů označujeme jako podskupiny. (8) Nejznámější podskupiny u skupiny A jsou A_1 a A_2 , v populaci je převaha podskupiny A_1 , kterou má až 80% jedinců, podskupinu A_2 má téměř 20% jedinců se skupinou A. Stejně zastoupení podskupin je i u podskupin A_1B a A_2B . Ostatní podskupin krevní skupiny A jsou vzácné a mají slabou expresi A antigenu na povrchu erytrocytů. Někteří jedinci z podskupinou A_2 mohou mít ve svém krevním běhu i protilátky anti- A_1 , podobně jsou na tom i jedinci

s podskupinou A₂B. Osoby z jinou krevní skupinou mají v oběhu vždy protilátky anti-A i anti-A₁. Byli rovněž popsány i podskupiny u krevní skupiny B, ty jsou ale opět velmi vzácné. V laboratorní praxi se běžně vyšetřují pouze podskupiny A₁, A₂, A₁B a A₂B.

U 80% lidí se skupinou A nebo B se antigeny nachází i v tělních tekutinách, poté mluvíme o sekretorství, neboli o schopnosti vylučovat skupinové systémy do tělních tekutin. Jedinci se schopností sekretorství se nazývají sekretoři, jedinci bez této schopnosti jsou označovány jako nonsekretoři. Schopnost sekretorství závisí na genotypu sekretorového genu Se. Antigeny jsou vylučovány do tělních tekutin, pokud je přítomna dominantní alela Se, naproti tomu pokud jsou homozygotní tiché se alely, nejsou antigeny do tělních tekutin vylučovány.

Na rozdíl od nepravidelných protilátek ostatních systémů, u AB0 systému jsou pravidelně u všech lidí přítomny proti krevním antigenům přirozené protilátky. (3) Přesný důvod, proč lidský organismus vytváří protilátky k antigenu, se kterým se nikdy nesešel, není vědecky popsán. Vědci předpokládají, že určité bakteriální antigeny jsou stejné u glykoproteinů A i B a protilátky vytvořené proti těmto bakteriím reagují s krví cizího typu. Jsou známé dva typy protilátek anti-A a anti-B. Výskyt protilátek je skupinově specifický. Protilátky se mohou v krvi vyskytovat jen proti tomu antigenu, který se nevyskytuje na vlastních krvinkách. (8) U osob s krevní skupinou A se vyskytuje aglutinin anti-B, zatímco u osob s krevní skupinou B anti-A. Osoby s krevní skupinou AB nemají ve svém séru přítomné žádné protilátky, neboť mají na svých erythrocytech přítomny oba antigeny a při přítomnosti protilátek by docházelo k hemolýze vlastních krvinek. Osoby s krevní skupinou 0 mají v séru přítomny oba typy aglutininů, neboť jejich erythrocyty mají na svém povrchu jen antigen H.

1.3.3. Dědičnost krevních skupin AB0 systému

Dědičnost krevních antigenů objevil jako první v roce 1924 Bernstein na základě rodinných studií v AB0 systému. Imunogenetici původně vycházeli z hypotézy, že každý skupinový antigen červené krvinky je přímým produktem jednoho jediného genu. (3) Dnes už je tato hypotéza překonaná.

Dědičnost v AB0 systému je podmíněna geny na 9 chromozomu- A, B, 0 a geny na 19 chromozomu- geny H s alelami H a h. Skupinové antigeny AB0 systému se netvoří přímým působením genů. Geny kontrolují produkci enzymů- transferáz. H geny na chromozomu 19 kódují H transferázu, která řídí produkci antigenu H. Jestliže na lokusu AB0 genu chromozomu 9 je alela A nebo B je struktura antigenu H prostřednictvím A transferáz nebo B transferáz transformována na antigeny A nebo B. Některé alely 0 transferázu nekóduje, antigen H zůstane nezměněný. (8) Znak A je se znakem B kodominantní. Znaky A a B jsou dominantní nad znakem H.

1.3.4. Vývoj AB0 systému u člověka

Antigeny A, B i prekurzorové substance H jsou prokazatelné již u 6 týdenních embryí, nejsou zde však plně rozvinuty. Při porodu dosahují přibližně 20-30 % maxima. Plnohodnotné antigeny se objevují v prvním a druhém roce života jedince, které dosahují plné funkčnosti a antigenicity v 18-20 roce života. (8) Z tohoto důvodu se u novorozenců vyšetřují pouze antigeny na membránách erytrocytů a nevyšetřují se aglutininy neboť ty ještě nejsou v séru novorozenců přítomny.

1.3.5. Vzácné abnormality v AB0 systému

Mimo hlavních antigenů krevních skupin v AB0 systému existuje několik vzácných A a B variant. (3) Mezi tyto varianty patří různé podskupiny jednotlivých hlavních skupin. Další varianty mohou vzniknout jako důsledek nějakého onemocnění nebo vlivem některé genetické vrozené odchylky.

Mezi vrozené abnormality tohoto krevně skupinového systému patří například fenotyp Bombay. Jde o genetickou odchylku v syntéze skupinových antigenů, kdy je jedinec recesivní homozygot hh a nedochází u něj k syntéze antigenu H na erytrocytech. Protože tento antigen je prekurzor pro tvorbu antigenu A i B, může být syntéza těchto antigenů postižena již v tomto kroku. Ve výsledku bude mít jedinec fenotyp skupiny 0. Nebude u něj prokázán antigen A respektive antigen B, ačkoliv jedinec může nést geny pro

tvorbu některého z těchto antigenů případně obou. (11) Tato výjimečně vzácná kombinace se označuje jako Bombay-typ (Oh). (8) První dárce s tímto genotypem byl objeven v Bombay (Indie), odkud jméno této krevní skupiny (4) Podle pravidel dědičnosti krevních skupin by pak jejich potomci měli mít skupinu 0 nebo skupinu druhého s rodičů. Protože ale stačí, aby jedinec byl heterozygot a měl jen jednu dominantní alelu H, aby se u něj projevila určitá krevní skupinová vlastnost, může nastat situace, kdy se rodičům narodí potomek s krevní skupinou, kterou by dle pravidel dědičnosti vůbec neměl mít.

U jedinců s tímto fenotypem se vždy vyskytuje protilátka aloanti-H. Tato protilátka je klinicky důležitá, protože reaguje se všemi krvinkami běžných krevních skupin AB0. Aloprotilátka anti-H je prakticky vždy příčinou akutní hemolytické potransfúzní reakce a tyto osoby musí obdržet krev dárců s krevní skupinou Bombay. (4)

Další vrozenou abnormalitou je takzvaný cis fenotyp AB. U cis AB fenotypu jsou přítomny jak A, tak B antigeny. (4) V tomto případě jsou jak alely A, tak B alely umístěny na stejném chromozomu vedle sebe. Za normálních okolností jsou u skupiny AB tyto alely umístěny na dvou různých chromozomech příslušného chromozomového páru a jsou umístěny naproti sobě. V těchto případech potomek zdědí vždy jen jednu alelu, u fenotyp cis AB se obě alely dědí současně. Sérologicky je tento genotyp charakterizován několika specifickými vlastnostmi. A a B antigeny jsou mnohem slabší než obvykle, a množství H antigenů je naopak relativně velké. U sekretorů je množství A antigenů ve slinách normální, množství B antigenů je malé a množství H antigenů je velké. (4) Dalším možným vysvětlením pro Cis AB genotyp je to, že zmutovaná alela A nebo B kóduje enzym schopný vytvořit z antigenů H antigen A ale i antigen B.

Druhou skupinou abnormalit v AB0 systému jsou abnormality získané během života. Mezi ně patří například slabá exprese antigenů. V těchto případech může dojít k poklesu aktivity transferáz produkovaných ABH alelami vlivem určitých onemocnění jako je například leukémie. Výsledkem je pak slabší exprese antigenů na povrchu erytrocytů. AB0 antigeny jsou však také slabě exprimovány u novorozenců, neboť ještě nejsou dostatečně vyvinuty. Během dalšího vývoje dochází k postupnému zesílení exprese až k normálním hodnotám.

Další získanou abnormalitou je takzvaný získaný B antigen. Objevuje se u pacientů s krevní skupinou A vlivem některých bakteriálních infekcí. Jde o přítomnost antigenu, který připomíná antigen B. Tento získaný B antigen byl poprvé zmíněn Cameronem roku 1959. Ten popsal případu pacientů s krevní skupinou A₁, kteří vykazovali slabou reakci s polyklonálním anti-B sérem, ačkoliv měli anti-B protilátky. U mnohých těchto pacientů se objevily střevní problémy. V roce 1975 Gerbel prokázal, že Gram-negativní bakterie mohou produkovat enzymy schopné změnit A₁ antigeny na tak zvané získané B antigeny. (4) Jakmile bakterie způsobující vznik získaného B antigenu, vymizí se střeva, dochází k vymizení získaného antigenu B. Pacientům se získaným B antigenem, nesmí být podána transfuze B erytrocytů. Anti-B protilátky přítomné v séru těchto pacientů by v tomto případě silně reagovali s antigeny na dárcovských erytrocytech.

1.3.6. Význam AB0 systému pro transfuzi

Protože se v AB0 systému vyskytují protilátky přirozeně, je tento systém pro klinickou transfuzní praxi ten nejdůležitější, neboť je také nejnebezpečnější. Vždy je nutno transfundovat stejnoskupinově. Nerespektování této skutečnosti může vést k prudké reakci mezi protilátkami příjemce a erytrocyty dárce a jejich následnému rozpadu v krevním řečišti příjemce.

Jsou přesto situace v nouzi, které přicházejí při nedostatku krevních konzerv určitých skupin, a vyplývají z nerovnoměrného rozdělení krevních skupin AB0 u obyvatel, které si vynutí transfuze nestejných skupin. (3) Jedná se o naléhavé krevní převody z důvodu vitální indikace, kdy hrozí nebezpečí prodlení a není známá skupina pacienta, v takovémto případě se používají erytrocyty skupiny 0 Rh negativní, krevní skupina se u těchto případů vyšetřuje dodatečně. Jiný stav nouze může nastat při nedostatečných zásobách erytrocytů určitých skupin, kdy je pak nutno přistoupit u nezbytných případů, jejichž skupinu známe k nestejnostupinové transfuzi. I v takovýto případech je nutné dodržovat určitá pravidla. Erytrocytové koncentráty skupiny 0 mohou být transfundovány také příjemcům s krevními skupinami A, B a AB, jestliže u příjemce není přítomna při teplotě těla účinná anti-H protilátka. Erytrocytové koncentráty skupin A a B mohou být

transfundovány jen stejnoskupinově a navíc příjemcům krevní skupiny AB, je však nutné předem odstranit plazmu obsahující nežádoucí protilátky. Při ABO nestejnoskupinové transfuzi erytrocytů jsou jedinci s krevní skupinou 0 univerzální dárce, ale jako příjemci mohou dostat jen erytrocyty skupiny 0. Naopak jedinci se skupinou AB jsou považováni za univerzální příjemce, kteří mohou dostat určité množství erytrocytů jiných skupin. Erytrocytové koncentráty od dárců se skupinou AB je možné transfundovat pouze příjemcům se skupinou AB. Při transfuzi plazmy se tyto pravidla pro přítomnost protilátek obrazejí. Plazma skupiny 0 se tak může transfundovat pouze pacientům se skupinou 0. Zatímco plazmu AB je možné transfundovat všem skupinám. Plazma skupin A nebo B mohou být transfundovány stejnoskupinově a navíc i příjemcům skupiny 0. Přesto vše je lepší vždy transfundovat stejnoskupinově.

1.4. Rh systém

1.4.1. Historie objevu

Landsteiner a Wiener v roce 1940 objevili, že králičí protilátky namířené proti erytrocytům opice Macaca Rhesus také reagovaly s erytrocyty u 84% lidí, kteří byli od té doby označováni jako Rh pozitivní, zatímco 16% lidí jejichž erytrocyty nereagovali byli označeni jako Rh negativní. Antigen, který byl takto identifikován, byl označen jako antigen D. Brzy byly nalezeny lidské protilátky, jejichž specifita se jevila stejná jako u protilátek v králičím séru. Později se ukázalo, že to není správné. (4) Zjistilo se, že antigen odhalený králičími sérem, je na systému Rh nezávislý, ten to antigen byl označen jako LW. Bylo prokázáno, že antigen D detekovaný lidskými protilátkami, je součástí rozsáhlejšího skupinového systému. Tento systém byl pojmenován jako Rhesus systém zkráceně Rh systém.

1.4.2. Charakteristika systému

V současné době je známo 48 antigenů tohoto systému. Mnohé z nich jsou kombinované antigeny. Tyto antigeny se vyskytují, jestliže jsou dvě Rh alely umístěny na jednom chromozomu.

Největší důležitost se příkládá antigenu D. Osoby, u kterých je na erytrocytech přítomný antigen D, označujeme jako Rh pozitivní. Alela d neprodukuje vlastní antigen. (8) Z tohoto důvodu se antigen d nevyskytuje, a proto neexistuje ani protilátka anti-d. Při nepřítomnosti daného antigenu je osoba označena jako Rh negativní. Další antigeny Rh systému jsou antigeny C a c a antigeny E a e. Kromě již zmíněných antigenů existuje velké množství antigenů, které jsou nejpravděpodobněji kódovány jinými alelami lokusu.

Antigeny Rh systému nejsou stejnorodé, ale skládají se pravděpodobně z více podjednotek, popřípadě se na jejich místě může vyskytovat více alel příbuzné specifičnosti.

Na červených krvinkách existuje značná kvantitativní a kvalitativní variabilita D antigenu. Rozlišujeme slabý nebo silný D antigen v souvislosti s jeho abnormálním počtem, zatímco kvalitativně odlišné formy se nazývají „D varianty“.

Kvantitativní variabilita znamená, že počet D antigenů je vyšší než normálně (zesílený D antigen) nebo nižší než normálně (zeslabený D antigen). Zesílený D antigen se nachází u lidí s chybějícími E/e nebo C/c molekulami. Někteří jedinci mají na erytrocytech výrazně nižší počet D antigenů. Počet D antigenů přítomných na erytrocytech se slabým D se výrazně liší.

Kvalitativní variabilita D antigenu znamená, že antigen je inkompletní. Část molekuly, na které je přítomný D antigen, chybí. Někteří lidé jsou Rh pozitivní a přesto vytvářejí aloprotilátku anti-D, následkem transfuze D pozitivní krve. Tyto protilátky nejsou u příslušné osoby namířeny proti jejímu vlastnímu D antigenu, ale proti D antigenu dárce. Vysvětlením pak je, že D antigen může být inkompletní. V těchto vzácných případech je část glykoproteinové molekuly, na které je umístěn D antigen, změněna mutací. Takový D antigen se nazývá parciální nebo D varianta. D antigen se skládá z jednotlivých antigenních determinant nebo epitopů. U lidí s D variantou jeden nebo více těchto epitopů chybí. Pokud je těmto lidem podána krev s kompletním D antigenem, mohou vytvořit protilátky,

protože v kompletním D antigenu jsou přítomny D epitopy, které u D varianty chybí a které jsou následně rozpoznány jako cizí, což vede k tvorbě protilátek. (4)

Alela C může tvořit několik typů C^w , C^u , C^x a alela E tvoří E^w , E^u .

Protilátky Rh systému jsou nepravidelné. Většinou jde o IgG, řidčeji o IgM a zcela výjimečně o IgA protilátky. (8) Zpravidla jsou získány teprve imunizací následkem chybné nestejnokupinové transfuze, nebo v těhotenství zásluhou difference antigenů matky a dítěte. (3) Zásluhou velké antigenní síly antigenu D byla protilátka anti-D dříve nejvýznamnější. V dnešní době se stala vzácnou, díky převodu identické krve a profylaxi Rh negativních matek. Zvláště pozoruhodné je D^u . Protože pravděpodobně jde o nekompletní D antigen, nemohou D pozitivní lidé tvořit anti- D^u , protože by se eventuálně vytvořené protilátky mohly zaměřit i na vlastní D antigeny. (3) D negativní lidé ale mohou tvořit protilátky nejen anti-D ale i anti- D^u .

1.4.3. Dědičnost Rh systému

Rozeznáváme dva blízce podobné Rh proteiny- RhD a RhCcEe, kódované dvěma příbuznými geny- RHD a RHCE. (15) Dědičnost antigenu D má svá vlastní specifika. Rh pozitivní jedinci mají přítomný RhD protein, u Rh negativních jedinců se tento protein nenachází. Ostatní antigeny Rh systému jsou determinovány mnohem menšími rozdíly jednotlivých proteinů.

Rh proteiny tvoří v membráně tetrametrické komplexy s Rh glykoproteinem. U fenotypu a klinické jednotky Rh_{null} je sestavení těchto tetrametrů znemožněno mutacemi genu pro Rh glykoprotein nebo Rh protein a na krvi nejsou nalézány žádné Rh antigeny. (15) Další mutace mohou způsobit neúplné zablokování výstavby těchto komplexů a jsou příčinou vzniku slabě exprimovaných Rh antigenů. Pokud mutace a přestavba genů zapříčiní změnu v imunogenní části proteinů, vznikají Rh varianty. Tyto varianty jsou charakteristické chyběním určitých Rh epitopů a možností tvorby protilátek anti-D proti normálním Rh antigenům.

1.4.4. Význam Rh systému pro transfuzi

Antigen D systému Rh je velmi silný. Po transfuzi Rh pozitivních erytrocytů Rh negativním dárčům dochází až v 80% případů k tvorbě protilátek anti-D. Proto je nutné provádět transfuze z hlediska D antigenu kompatibilně. Zatímco Rh pozitivní jedinci mohou být transfundováni i Rh negativními krvemi, Rh negativní jedinci mohou být transfundováni jen krvemi Rh negativními. Výjimky z tohoto pravidla jsou přípustné pouze v případech ohrožení života. Všeobecně se doporučuje při aplikaci Rh pozitivních koncentrátů Rh negativním příjemcům, podat profylakticky intra venózně anti-D hyperimunní globulin.

1.5. Další krevní skupinové systémy

V současnosti je známo více než 250 krevních skupin. Velký počet těchto krevních skupin patří do jednoho z 23 krevně skupinových systémů. Kromě krevně skupinových systémů existují rovněž krevně skupinové soubory a kategorie antigenů vysokou frekvencí (HFA) a antigenů s nízkou frekvencí (LFA) výskytu. Krevní skupinový systém se skládá z určitého počtu antigenů kódovaných jedním samostatným genem nebo více geny velmi těsně vázanými geny, mezi kterými se nevyskytuje crossing over s následnou genetickou rekombinací. Krevně skupinové soubory se skládají z antigenů, které spolu geneticky, biochemicky nebo sérologicky navzájem souvisí, ale nepatří do krevně skupinového systému. Kategorie antigenů s vysokou frekvencí výskytu (HFA) zahrnuje antigeny, které se nacházejí u kavkazské populace ve frekvenci vyšší než 99%. Kategorie antigenů s nízkou frekvencí (LFA) zahrnuje antigeny, které se u kavkazské populace nacházejí ve frekvenci nižší než 1%. (4)

Další krevní skupinové systémy mají význam jen tehdy, jsou-li přítomny protilátky. Jejich přítomnost vyžaduje pak stejnoskupinovou transfuzi. V každém případě platí zásada, že pacientovi se specifickou aloprotilátkou nesmí být aplikován erytrocytární koncentrát s antigenem, proti kterému je namířena. (8) Dalším významem antigenům těchto systémů je ten,

že autoimunní protilátky vytvořené proti nim se mohou podílet na vzniku hemolytické choroby novorozenců. (6)

Mezi další krevně skupinové systémy patří například Kell systém, Lewis systém a mnoho dalších. U těchto systémů jsou známy jen imunní protilátky vzniklé po imunizaci. Přítomnost protilátek proti antigenům těchto systémů se zjišťuje při screeningu nepravidelných protilátek.

1.6. Screening protilátek

V souvislosti s rozvojem transfuzí se začala vyšetřovat i přítomnost nebo nepřítomnost nepravidelných protilátek séru- takzvaný screening protilátek. Při screeningu protilátek se vyšetřují nepravidelné protilátky, které vznikají na antigenní podnět při imunizaci pacienta.

Detekce protilátek je důležitá vzhledem k tomu, že tyto protilátky mohou být zodpovědné za urychlené odbourávání erytrocytů nesoucí příslušné antigeny. Protilátky jsou základem tří nežádoucích reakcí. První je hemolytická transfúzní reakce. Tato reakce je způsobena transfúzí krve s krevní skupinou, proti které má příjemce protilátky. Protilátky jsou zodpovědné také za rozvoj hemolytického onemocnění novorozence a autoimunní hemolytické anemie. Při hemolytickém onemocnění novorozence žena vytváří protilátky proti antigenům, které její plod zdědil od otce. Autoimunní hemolytická anemie je způsobena protilátkami, které jsou namířené proti antigenům přítomným na vlastních erytrocytech pacienta.

Reaktivita protilátek in vitro je dána vlastnostmi protilátky samé a vlastnostmi média, v němž se vyšetření provádí. Žádná s dosud známých metod neprokazuje všechny protilátky. Spolehlivé vyšetření protilátek proto musí zahrnovat více metod. Vedle vhodné metodiky je druhým rozhodujícím momentem výběr vhodných typových krvinek. (2)

Při testu na nepravidelné protilátky je sérum pacienta testováno se screeningovým panelem, který obsahuje speciální diagnostické erytrocyty, všechny skupiny 0, takže anti-A nebo anti-B protilátky, pokud jsou přítomny, nemohou test narušit. Screeningové krvinečky jsou vybrány takovým způsobem, aby byly přítomny nejdůležitější antigeny různých

krvně skupinových systémů, takže mohou být detekovány prakticky všechny klinicky významné erytrocytární protilátky. (4)

Screening protilátek se provádí u pacientů, u kterých by mohlo dojít k postransfuzní reakci, nebo u těhotných žen. Provádí se nejpozději současně s provedením zkoušek slučitelnosti. (2)

1.7. Způsoby vyšetření

1.7.1. Typy metod

Při stanovení se používají takzvaná diagnostická séra a typové krvinky, tyto reagencie musí mít předem dané vlastnosti a musí mít dostatečnou čistotu, aby bylo možné provést opakované vyšetření s dostatečnou přesností. Pro vyšetření se dříve používaly erytrocyty a séra od dárců, které si musela každá laboratoř sama připravit. Takto připravené látky bývaly pokaždé jinak silné a docházelo k problémům se standartizací metod. Dnes se používají komerčně vyráběná diagnostická séra ze známým obsahem aglutininu a typové krvinky se známými antigeny. Tyto reagencie prohází při výrobě kontrolou kvality a mají standardní, tedy známý obsah antigenů nebo protilátek.

Vyšetření krevních skupin i screening protilátek se provádějí na transfuzních odděleních nemocnic nebo v hematologických laboratořích. Vyšetření se provádí aglutinační metodou. Při reakci zde reaguje známý antigen s neznámou protilátkou ve vyšetřovaném séru nebo známá protilátka s neznámým antigenem na vyšetřovaných erytrocytech.

Rozeznáváme imuno hematologické metody pro vyšetřování základních krevních skupinových systémů (AB0, Rh), ostatních krevních systémů, nepravidelných přirozených a imunních protilátek a kompatibility krve. (8)

Zpočátku se aglutinační reakce prováděly na sklíčkách nebo kartičkách. Tento způsob se dnes používá při kontrole slučitelnosti krve dárce a příjemce těsně před zahájením transfuze u lůžka příjemce, kdy se naposledy kontrolují krevní skupiny pacienta

a konzery erytrocytů od dárce a nepřítomnost nepravidelných protilátek pacienta proti antigenům na membránách erytrocytů dárce.

Později se začaly vyšetření krevních skupin a screening protilátek provádět ve zkumavkách, jako takzvaná zkumavková metoda. Při této metodě dochází k aglutinaci erytrocytů ve vodním prostředí ve zkumavkách.

Kromě klasické zkumavkové metody byla v první polovině osmdesátých let vyvinuta metoda sloupcových testů. Jde o soustavu mikrozkušavek obsahující gel s určitými reagensy podle druhu vyšetření, pro který jsou určeny. Gel pro vyšetření krevních skupin v ABO systému a v Rh systému obsahuje předem definované protilátky. Pro vyšetření screeningu protilátek jsou dodávány karty s čistým gelem a s gelem obsahující AGH sérum. Ve všech sloupcových aglutinačních systémech jsou mikrozkušavky upevněny na kartách. Dnešní sloupcové testy jsou založeny na přímé vazbě senzibilizovaných erytrocytů na gelovou matrix ve sloupci. Senzibilizované erytrocyty jsou zachycovány a po centrifugaci zůstávají ve vrchní části sloupce. Nesenzibilizované erytrocyty budou migrovat během centrifugace směrem ke dnu sloupce. Při pozitivní reakci budou všechny erytrocyty zachyceny v gelu, zatímco při negativní reakci projdou všechny erytrocyty na dno. U méně silných reakcí budou některé erytrocyty zachyceny, zatímco jiné projdou skrz sloupec na dno, poměr mezi erytrocyty zachycenými a erytrocyty prošlými určuje sílu reakce. Čím slabší reakce, tím víc erytrocytů projde na dno. Sloupcová metoda má oproti zkumavkové metodě několik výhod. Tato metoda je rychlá, lze ji automatizovat a senzibilizované erytrocyty není nutno promývat. (4) Navíc jsou nastaveny jednotlivé typy reakcí a mohou být dobře interpretovány i později.

V devadesátých letech byly pro sérologické vyšetření krevně skupinových protilátek vyvinuty metody na mikrotitračních destičkách založené na technice pevné fázi. Při této technice je vždy jedna reagensie navázána na dně jamek mikrotitrační destičky, kde tvoří jednu vrstvu.

1.7.2. Diagnostická séra, lektiny

Krevní skupinové antigeny se vyšetřují aglutinačními reakcemi, při kterých se neznámý antigen nechá reagovat se známým aglutininem séra. Séra, která se použijí k vyšetření a o kterých se ví, že obsahují známý aglutinin, se nazývají diagnostická séra. (8)

Diagnostická séra se získávají od lidí nebo od zvířat. K přípravě diagnostických sér se rovněž používají i takzvané lektiny.

Lektiny jsou proteiny z rostlinných zdrojů. Tyto proteiny jsou schopny specificky rozpoznávat různé mono-, di- a trisacharidy. Erythrocyty mají na svém povrchu tak zvaný glykokalyx, který obsahuje různé oligosacharidové řetězce. Na tyto struktury se vážou lektiny a tím vyvolávají aglutinaci erythrocytů.

Lidská diagnostická séra se nazývají sangvitysty. Dělí se na přirozená, která obsahují přirozené protilátky, a na imunní, která jsou výsledkem přirozené nebo umělé imunizace. K přípravě se používá krev od dobrovolných dárců, žen imunizovaných přirozenou cestou po dobu těhotenství a nemocných, imunizovaných transfuzemi krve. Využívají se jen ti nemocní, kteří mají protilátky ve vysokém titru. (8) Lidská diagnostická séra pro určování krevních skupin v AB0 systému jsou barevně odlišována podle obsahujících aglutininů.

Zvířecí diagnostická séra se označují jako xenoséra. Opět mohou být přirozená nebo imunní. Zvířecí séra se mohou získávat například od králíků, úhořů a jiných živočichů.

Na diagnostická séra je kladeno několik požadavků. Prvním požadavkem je specifita daného séra. Sérum musí reagovat jen s jedním předem daným antigenem. Druhým požadavkem je účinnost séra, která se vyjadřuje titrem. Posledním požadavkem je rychlost a výraznost reakce, to se vyjadřuje v časových jednotkách- avidita. Reakce musí mít určitou sílu, aby bylo možno vždy přesně určit, zda k aglutinaci došlo nebo ne. Základní diagnostická séra mají tedy předepsaný titer a aviditu. K diagnostice krevních skupinových vlastností se používají jen taková séra a lektiny, jejichž vlastnosti bezpečně známe a která dávají dostatečně silné a jednoznačně přesvědčivé reakce. (8)

1.7.3. Typové krvinky

Typové krvinky slouží k průkazu přirozených nebo imunních protilátek v krevním séru. (8) Jsou to erytrocyty, kteří na své membráně mají nám známé antigeny. Používají se při stanovení pravidelných protilátek v krevní plazmě u skupinového systému AB0 a při screeningu nepravidelných protilátek ostatních skupinových systémů

Celý soubor několika druhů těchto krvinek se nazývá panel typových krvinek. (8) Tyto panely se využívají při typování erytrocytů v případě pozitivního výsledku screeningu nepravidelných protilátek a slouží k přesnému určení skupinové příslušnosti dané nepravidelné protilátky.

1.7.4. Vyšetření krevní skupiny v AB0 systému

Určení krevních skupin je jen tenkrát úplné, když mimo antigenů jsou též vyšetřeny i izoaglutininy. (3) Příslušnost ke krevnímu skupinovému systému AB0 se zjišťuje na červených krvinkách a v séru nebo v plazmě. Na červených krvinkách se odvozuje z přítomnosti aglutinogenu A, B nebo obou. V séru se odvozuje z přítomnosti protilátek anti-A, anti-B případně obou dvou. Protože aglutininy anti-A a anti-B jsou kompletní protilátky, lze vyšetření AB0 krevních skupin provést ve zkumavkách, nebo na destičkách při pokojové teplotě.

Pro stanovení krevních skupin se používají čerstvě odebrané vzorky krve v běžných antikoagulačních roztocích. Neměly by se používat vzorky hemolyzované, zkalené nebo kontaminované nebo vzorky s přítomností sraženiny.

Při vyšetření se používají diagnostická séra anti-A, anti-B, anti-AB a typové krvinky skupin A, B a 0. Před samotným stanovením je nutné centrifugací oddělit erytrocyty od séra. Sérum se bezprostředně po centrifugaci oddělí od krvinek. (8) Z oddělených erytrocytů pacienta se vytvoří 2 až 3% náplav ve fyziologickém roztoku.

Pro klasickou zkumavkovou metodu si označíme 6 zkumavek. První tři se použijí na vyšetření aglutinogenů a další tři pro vyšetření aglutininů. Vyšetření antigenů bývá označováno jako přední řada a vyšetření aglutininů se označuje jako zadní řada. Toto

označení vyplývá z postavení zkumavek ve stojánku při práci. Do zkumavek pro určení aglutinogenů se podle označení nakape po dvou kapkách příslušných diagnostických sér anti-A, anti-B a anti-AB. Do všech tří zkumavek se následně přidá stejné množství náplavu vyšetřovaných erytrocytů. Do zkumavek pro vyšetření aglutininů se opět podle označení nakape po dvou kapkách vyšetřovaného séra. K němu se přidá stejné množství příslušných typových erytrocytů skupin A, B a 0. Po nakapání se všechny zkumavky nechají 3 až 5 minut inkubovat a pak se centrifugují. Centrifugujeme po dobu 1 minuty při 1500 otáčkách. Poté se mírným poklepem odloučí krevní sediment a výsledek se hodnotí makroskopicky. Zjišťuje se v jaké zkumavce došlo k aglutinaci, neboli v které zkumavce reagovaly přítomné aglutininy s příslušnými antigeny.

Podle toho v jakých zkumavkách dojde k aglutinaci, určujeme příslušnost dané krve k určité krevní skupině v ABO systému. Krev se skupinou A bude aglutinovat ve zkumavkách přední řady s diagnostickými séry anti-A a anti-AB, v zadní řadě bude aglutinace ve zkumavce s typovými erytrocyty skupiny B. U krevní skupiny B dojde k aglutinaci ve zkumavkách s diagnostickými séry anti-B a anti-AB a s typovými krvinkami skupiny A. Všechny ostatní zkumavky musí vyjít negativně- bez aglutinace. Krevní skupina AB bude reagovat ve všech zkumavkách s diagnostickými séry a všechny zkumavky s typovými erytrocyty budou negativní, protože na erytrocytech pacienta jsou přítomny oba antigeny a v séru pacienta se nevyskytují žádné přirozené protilátky ABO systému. Erytrocyty krevní skupiny 0 nebudou reagovat se žádným diagnostickým sérem, aglutinace bude u typových krvinek skupiny A a B. Zkumavka z typovými erytrocyty skupiny 0 musí být u všech skupin negativní, neboť zde není přítomný žádný antigen na povrchu krvinek a proto protilátky se séra pacientů nejsou schopny vyvolat aglutinaci. Tato reakce může při stanovení sloužit i jako kontrola správnosti pracovního postupu.

U krví s krevními skupinami A a AB se ještě vyšetřuje podskupiny A_1 , A_2 nebo A_1B , A_2B . Při tomto vyšetření určujeme kvantitativní i kvalitativní poměr mezi antigeny A a H. Jestliže je poměr větší k A, dostaneme podskupiny A_1 a A_1B , jestliže je menší k A, dostaneme podskupiny A_2 a A_2B . K vyšetření podskupin se vždy používá současně diagnostické sérum anti- A_1 nebo anti- A_1B a anti-H. (2) Do označené zkumavky dáme stejné množství diagnostického séra anti- A_1 nebo anti- A_1B a náplavu erytrocytů pacienta. Obsah

se centrifuguje 1 min při 1500 otáčkách. Výsledek odečítáme makroskopicky. Dojde-li k aglutinaci erytrocytů vyšetřované osoby v séru anti-A₁, jedná se o podskupinu A₁ nebo A₁B. Pokud k aglutinaci nedošlo, jedná se o podskupiny A₂, A₂B: u těchto případů děláme kontrolu ještě diagnostickým sérem anti-H. Výsledek tohoto vyšetření musí být vždy pozitivní.

Při vyšetření na kartičkovém systému, který se používá pro test u lůžka pacienta, se vyšetřují pouze antigeny na erytrocytech. Tento způsob testování se většinou využívá těsně před samotným podáním transfuze a slouží jako poslední kontrola slučitelnosti krve dárce a příjemce. Používají se při něm pouze diagnostická séra anti-A a anti-B. Vyšetřují se antigeny na erytrocytech příjemce a antigeny na erytrocytech v krevní konzervy. U obou musí vyjít stejná krevní skupina, jinak není možno krevní transfuzi pacientovi podat.

Nově se k vyšetření používají gelové komerčně vyráběné sety. K vyšetření se používají karty s mikrozkušnicemi. Na těchto kartách se vyšetřují antigeny a protilátky krevního systému AB0 a současně antigen D krevního systému Rh. Každá mikrozkušnice obsahuje polymerizovaný dextran v pufovaném médiu s přísadami konzervačních látek smíšený s různými reagensy. (13) Mikrozkušnice A pro stanovení antigenu A obsahuje monoklonální anti-A, jde o směs IgM protilátek. Mikrozkušnice B pro stanovení antigenu B obsahuje monoklonální anti-B, jedná se o protilátky třídy IgM. Mikrozkušnice AB pro určení přítomnosti obou antigenů obsahuje monoklonální anti-AB, směs IgM protilátek. Mikrozkušnice D pro určení antigenu D s Rh systémem obsahuje monoklonální anti-D, IgM protilátky. Mikrozkušnice D' obsahuje monoklonální anti-D, jde o směs IgG a IgM protilátek. Tato monoklonální anti-D reagensie detekuje slabé D antigeny a částečné varianty D antigenu. Mikrozkušnice Ctl. obsahuje jen roztok pufru bez protilátek a slouží jako kontrolní mikrozkušnice. Mikrozkušnice N_A a N_B jsou určeny pro stanovení pravidelných aglutininů skupinového systému AB0 a obsahují jen roztok pufru bez protilátek. Provedení testu je obdobné jako při stanovení zkoušnicovou metodou. Připravíme si 5% suspenzi červených krvinek pacienta. Suspenzi pipetujeme v množství daném výrobcem do mikrozkušnic pro stanovení antigenů systému AB0/Rh, to znamená do mikrozkušnic obsahujících protilátky anti-A, anti-B, anti-AB a anti-D. Dále pipetujeme stejné množství diagnostických erytrocytů A/B do mikrozkušnic pro stanovení

aglutininů anti-A a anti-B. Do těchto mikrozkušavek přidáme stejné množství vyšetřovaného séra pacienta. Vyšetřovací kartu po napipetování centrifugujeme a ihned poté odečítáme výsledky. Hodnocení se provádí podle předem daného návodu od výrobce. Za negativní výsledek se považuje proužek červených krvinek na spodu gelového sloupce a žádné viditelné aglutináty ve zbytku sloupce. U pozitivního výsledku pozorujeme aglutinaci v gelovém sloupci. Aglutinace může být v různé síle, od ojedinělých aglutinátů malých rozměrů v dolní polovině sloupce až po proužek aglutinovaných červených krvinek na vrcholu gelového sloupce. (13)

1.7.5. Vyšetření Rh systému

Při tomto vyšetření se stanovuje přítomnost nebo nepřítomnost antigenu D na erythrocytech pacienta. Pro vyšetření se používají diagnostická sérum anti-D obsahující protilátky IgM a sérum anti-D MIX obsahující komplex protilátek tříd IgM a IgG. Jakou součást vyšetření se používá kontrolní sérum. Hodnotíme vznik aglutinace při přítomnosti vyšetřovaného antigenu na erythrocytech. Do označených zkumavek se nakape příslušné diagnostické sérum a k němu se přidá stejný počet 2-3% náplavu erythrocytů pacienta ve fyziologickém roztoku. Zkumavky se centrifugují 1 minutu při 1500 otáčkách. Po centrifugaci jemným poklepem oddělíme krevní sediment a makroskopicky hodnotíme. Poté kontrolujeme mikroskopicky. Kontrolní vyšetření musí vyjít vždy negativně bez aglutinace. Při přítomnosti aglutinace označujeme jako Rh pozitivní.

U dárců krve se v případě negativity obou těchto vyšetření doplňuje vyšetření nepřímým antiglobulínovým testem na důkaz tzv. „slabých“ antigenů D a jejich variant. (6) Jestliže je výsledek tohoto testu negativní je dárce Rh negativní, v případě pozitivního výsledku testu je dárce D^u pozitivní. Jedinci D^u pozitivní jsou jako dárce krve považováni za Rh pozitivní, ale jako příjemci jsou Rh negativní a musí dostat krev Rh negativní. Pro toto vyšetření potřebujeme sérum antiglobulinum humanum, označované jako AGH sérum. Toto sérum obsahuje zvířecí protilátky proti lidskému globulinu. Do označených zkumavek kápneme 2 kapky anti-D Mix a přikápneme stejné množství 3-5% náplavu vyšetřovaných erythrocytů. Zkumavky protřepeme a inkubujeme 20 až 30 minut v termostatu při 37°C.

Poté zkumavku naplníme fyziologickým roztokem pod tlakem nebo proudem, aby došlo k promytí erytrocytů. Centrifugujeme 1 minutu při 2500 otáčkách. Po centrifugaci odstraníme supernatant. Suchý sediment erytrocytů uvolníme důkladným protřepáním a opět promyjeme fyziologickým roztokem. Tento postup poté ještě jednou opakujeme. Po poslední centrifugaci odstraníme supernatant a k suchému sedimentu přidáme 2 kapky AGH séra. Zkumavku důkladně protřepeme a centrifugujeme 1 minutu při 2000 otáčkách. Výsledek hodnotíme makroskopicky. V případě aglutinace se jedná o D^u pozitivní erytrocyty.

1.7.6. Screening protilátek

Screeningové panely se obvykle skládají se tří odlišných erytrocytárních suspenzí. V „trojkrvinkových screeningových panelech“ jsou na jedné nebo více krvinkách přítomny nejdůležitější krevně skupinové antigeny vždy v homozygotní kombinaci. (4)

Screening protilátek se může vyšetřovat klasickou zkumavkovou metodou, dnes je ale častěji prováděna pomocí gelové aglutinace na komerčně vyráběných kartách.

Toto vyšetření se provádí ve třech různých prostředích. Prvním testem je vyšetření v solném prostředí, kdy se stanovují přirozené a imunní protilátky IgM. Druhý test je test v prostředí enzymu, tímto způsobem se stanovují imunní inkompletní protilátky hlavně IgG. Dalším používaným testem je nepřímý Coombsův test. Stanovují se imunní inkompletní protilátky, které nelze prokázat, ani v prostředí enzymu. Zachytí i velmi slabé protilátky a ze tří uvedených testů je nejcitlivější. (8) Používané typové krvinky jsou většinou směsí dvou krvinek obsahující všechny klinicky závazné antigeny. (7)

K aglutinační reakci při solném testu dochází, když se v tomto prostředí dostanou antigeny do vzájemného kontaktu s příslušnými protilátkami, čehož jsou schopny pouze kompletní protilátky IgM. (4) Při vyšetření v solném prostředí se smísí 2 – 10% náplav typových krvinek se sérem dárce a centrifuguje se. (8) Podle typu protilátek přítomných v séru mohou nastat dvě situace. Pokud sérum obsahuje kompletní protilátky třídy IgM, dojde ke vzniku aglutinace. Druhou možností je přítomnost nekompletních protilátek třídy IgG, které nejsou schopny aglutinaci erytrocytů vyvolat. Pokud vyšetřované sérum

obsahuje nekompletní protilátky, je nutné použít pro jejich stanovení enzymový test nebo antiglobulínový test.

Při enzymatických testech se používají enzymy, které mají schopnost natrávit povrch erytrocytů. Tím dojde k většímu přiblížení erytrocytů k sobě navzájem a může dojít k aglutinaci i při malém množství protilátek. V praxi se hlavně používá bromelin. (8) Můžeme však použít i jiné enzymy například papain, trypsin, ficin a jiné proteolytické enzymy. Antigeny některých krevních systémů (Duffy, MNSs, Xg) jsou působením enzymů poškozeny, proto nemohou být příslušné protilátky v tomto prostředí detekovány. Oproti tomu protilátky některých systémů, zejména Rh, Lewis a Kidd, jsou detekovány v tomto prostředí mnohem dříve a síla reakce bývá vyšší. (5) K enzymatickému testu se dnes již používají suspence erytrocytů obohacené o enzym.

Dalšími testy používanými při screeningu nepravidelných protilátek jsou antiglobulinové testy. Zavedl je v klinické medicíně Coombs v roce 1945, proto jsou označovány jako Coombsovy testy. Při těchto testech se používá sérum proti lidskému globulinu takzvané AGH. Jedná se o směs anti-IgG polyklonálních protilátek králičího původu a monoklonálních IgM anti-Cd3 protilátek myšího původu, to umožňuje detekci erytrocytů pokrytých imunoglobulínem nebo složkami komplementu. (5) Principem testů je vazba protilátek z AGH séra na lidské erytrocyty senzibilizované protilátkou, neboť lidské protilátky navázané na erytrocytové membráně pro ně mají antigenní charakter. Tím dojde k překlenutí zeta potenciálu erytrocytů a k následné aglutinaci. Coombsovy testy se dělí na přímý a nepřímý test. Testy se považuje za nejcitlivější a nejspolehlivější k průkazu inkompletních protilátek. Séra AGH jsou schopna v séru prokázat i velmi málo účinné a ve velmi malém množství se vyskytující inkompletní protilátky. (8)

Přímý antiglobulinový test se používá u osob, u kterých se předpokládá že k vazbě protilátek na vlastní krvinky dochází již v jejich krevním oběhu. (8) Tento test se proto využívá pro diagnostiku například hemolytického onemocnění novorozenců nebo u pacientů se získanou hemolytickou anémií. Pro vyšetření přímého Coombsova testu potřebujeme erytrocyty vyšetřovaného jedince. Ty několikrát propereme fyziologickým roztokem. Z posledního suchého sedimentu si připravíme 2 až 3% náplav. Kápneme 2 kapky do zkumavky a přikápneme stejné množství séra AGH. Promícháme a vložíme na 5

minut do termostatu, kde inkubujeme při 37°C. Poté centrifugujeme 1 minutu při 2000 otáčkách. Výsledek testu odečítáme makroskopicky, provedeme kontrolu pod mikroskopem.

Druhým typem antiglobulinových testů je takzvaný nepřímý test. Nepřímý antiglobulinový test se používá k důkazu velmi slabých inkompletních volně cirkulujících protilátek v séru těhotných, dárců krve, příjemců krve. (8) Pomocí tohoto testu stanovujeme protilátky, které nejsou zaměřené proti vlastním erytrocytárním antigenům. Toto vyšetření se provádí až po přidání vhodného antigenu. Potřebujeme vyšetřované sérum nebo plazmu a diagnostické erytrocyty krevní skupiny 0. Do označených zkumavek kápneme 2 až 3 kapky vyšetřovaného séra a přikápneme stejné množství diagnostických erytrocytů skupiny 0 pozitivní. Obsah promícháme a vložíme do termostatu. Zde inkubujeme 45 minut při 37°C. Po inkubaci pereme třikrát až čtyřikrát ve fyziologickém roztoku a k poslednímu suchému sedimentu přikápneme 2 až 3 kapky AGH séra. Zkumavku opět vložíme do termostatu a inkubujeme 3 až 5 minut při 37°C. Po inkubaci centrifugujeme 1 minutu při 2000 otáčkách. Odečítáme makroskopicky. Výsledek zkontrolujeme pod mikroskopem.

Při vyšetření screeningu protilátek na gelových kartách se používá enzymatický test a nepřímý Coombsův test. Karty jsou tvořeny osmi mikrozkušavkami. Každá mikrozkušavka je tvořena sloupcem gelu a reakční komůrkou. Každý sloupec obsahuje polymerizované mikročástice dextranu v pufrovaném médiu, které slouží jako filtr. Mikrozkušavky pro screening protilátek metodou nepřímého antiglobulinového testu obsahují v gelu rozpuštěné sérum AGH. Ostatní mikrozkušavky sloužící pro enzymatický test obsahují neutrální gel. Před samotným provedením vyšetření je nutné oddělit erytrocyty od séra odstředováním. Do mikrozkušavek pipetujeme výrobcem dané množství typových erytrocytů, do mikrozkušavek pro enzymový test se pipetují erytrocyty s přísádkem enzymu, nejčastěji s papainem. Ihned poté pipetujeme do všech mikrozkušavek dané množství séra vyšetřovaného. Kartu inkubujeme 15 minut při 37°C v termostatu. Po inkubaci provedeme centrifugaci. Centrifugujeme 10 minut. Během centrifugace jsou aglutináty červených krvinek v závislosti na jejich velikosti zachyceny na povrchu nebo uvnitř gelového sloupce, tento stav je označován jako pozitivní reakce.

Neaglutinované červené krvinky procházejí ke dnu mikroskopu, tento stav je označován jako negativní reakce. (5)

1.7.7. Určení specifity protilátek

Zjistí-li se protilátka musí být co možná nejpřesněji určena, aby bylo možné připravit pro transfuzi konzery, které neobsahují erythrocyty s antigenem, proti kterému je daná protilátka nalezená u pacienta. Toto určení specifiky probíhá stejně jako při vyhledávání protilátky třístupňovým testem. (3) Pro určení specifiky se používá panel typových krvinek obsahující 8 až 11 vybraných testovacích erythrocytů. Tyto panely tak umožňují přesnou diferenciaci nalezené protilátky.

2. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY

2.1. Cíl práce

Cílem mojí práce je porovnání metod, které jsou v dnešní době používané ke stanovení krevních skupin a k screeningu protilátek. Metody budu srovnávat z několika hledisek. Jednak z hlediska finančních nákladů na jednotlivé metody. A pak také podle pracnosti vyšetření, spolehlivosti a přesnosti daných metod a celkové doby potřebné pro provedení vyšetření danou metodou.

2.2. Hypotézy

Pro práci byly stanoveny tyto hypotézy.

První hypotéza:

Stanovení metodou gelové aglutinace poskytuje stejně přesné a spolehlivé výsledky, jako klasická zkumavková metoda stanovení.

Druhá hypotéza:

Stanovení metodou aglutinace v gelu je méně pracné než stanovení zkumavkovou metodou.

Třetí hypotéza:

Pro rychlé stanovení je vhodnější metoda gelové aglutinace

Čtvrtá hypotéza:

Stanovení metodou gelové aglutinace na kartách je dražší než klasická zkumavková metoda.

3. METODIKA

Při práci byly použity dvě metody stanovení. První metodou byla metoda zkumavková, která byla použita pro stanovení krevních skupin v krevních skupinových systémech ABO a Rh. Druhou metodou bylo vyšetření screeningu protilátek na gelových kartách. Pro stanovení krevních skupin krevně skupinového systému ABO byla použita diagnostická séra a typové erytrocyty od firmy Sanquin. Pro stanovení antigenu D systému Rh byla použita diagnostická séra od firem Sanguin a Immucor. Při vyšetření screeningu protilátek byly použity gelové karty a erytrocyty pro vyšetření nepřímého Coombsova testu od firmy Bio-Rad, erytrocyty pro stanovení v enzymatickém prostředí byly od firmy DiaMed.

Vzorky krve pro vyšetření byly získány od pacientů Biochemicko-hematologické laboratoře Laboma s.r.o.

4. VÝSLEDKY

4.1. Stanovení krevních skupiny v systému AB0

Vyšetření antigenů a pravidelných protilátek AB0 systému v séru a na erytrocytech pacientů klasickou zkumavkovou metodou.

Iniciály	Pohlaví	Ročník	Přední řada			Zadní řada			Podskupina		AB0
			Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Ery A	Ery B	Ery 0	Anti-A ₁	Anti-H	
P.V.	Ž	80	-	+	+	+	-	-	*	*	B
L.H.	Ž	72	-	+	+	+	-	-	*	*	B
M.I.	Ž	78	+	-	+	-	+	-	+	*	A1
K.M.	Ž	77	+	-	+	-	+	-	+	*	A1
K.V.	M	43	+	-	+	-	+	-	+	*	A1
CH.Š.V.	Ž	79	+	-	+	-	+	-	+	*	A1
M.V	Ž	71	+	-	+	-	+	-	+	*	A1
P.V.	Ž	81	+	+	+	-	-	-	-	+	A2B
D.H.	Ž	42	-	+	+	+	-	-	*	*	B
T.L.	Ž	49	+	-	+	-	+	-	+	*	A1
H.P.	M	80	-	-	-	+	+	-	*	*	0
M.P.	M	60	-	+	+	+	-	-	*	*	B
O.N.B	Ž	80	-	+	+	+	-	-	*	*	B
Š.D.	Ž	42	+	+	+	-	-	-	+	*	A1B
H.M.	Ž	82	-	+	+	+	-	-	*	*	B
M.P.	Ž	74	+	-	+	-	+	-	+	*	A1

Vysvětlivky: + pozitivní reakce, - negativní reakce, * nevyšetřuje se

Zdroj: vlastní výzkum

4.2. Stanovení krevní skupiny v systému Rh

Vyšetření přítomnosti antigenu D z Rh systému na erytrocytech pacientů klasickou zkumavkovou metodou.

Iniciály	Pohlaví	Ročník	Anti-D	Anti-D Mix	Rh
P.V.	Ž	80	+	+	P
L.H.	Ž	72	+	+	P
M.I.	Ž	78	-	-	N
K.M.	Ž	77	-	-	N
K.V.	M	43	+	+	P
CH.Š.V.	Ž	79	+	+	P
M.V	Ž	71	+	+	P
P.V.	Ž	81	+	+	P
D.H.	Ž	42	-	-	N
T.L.	Ž	49	+	+	P
H.P.	M	80	+	+	P
M.P.	M	60	+	+	P
O.N.B	Ž	80	+	+	P
Š.D.	Ž	42	+	+	P
H.M.	Ž	82	+	+	P
M.P.	Ž	74	+	+	P

Vysvětlivky: + pozitivní reakce, - negativní reakce, P pozitivní Rh faktor, N negativní Rh faktor

Zdroj: vlastní výzkum

4.3. Screening protilátek

Stanovení nepravidelných imunních protilátek v séru pacientů metodou gelové aglutinace.

Iniciály	Pohlaví	Ročník	Coombs test			Enzymatický test			Závěr
			I	II	III	I	II	III	
L.D.	Ž	74	-	-	-	-	-	-	Bez protilátek
H.J.	Ž	76	-	-	-	+	+	+	Inkompletní protilátky
S.J.	Ž	78	-	-	-	-	-	-	Bez protilátek
K.H.	Ž	83	-	-	-	-	-	-	Bez protilátek
N.Z.	Ž	70	-	-	-	-	-	-	Bez protilátek
P.L.	Ž	75	-	-	-	-	-	-	Bez protilátek
M.P.	Ž	74	-	-	-	-	-	-	Bez protilátek
L.H.	Ž	72	-	-	-	-	-	-	Bez protilátek
P.V	Ž	81	-	-	-	-	-	-	Bez protilátek

Vysvětlivky: - negativní reakce, + pozitivní reakce

Zdroj: vlastní výzkum

4.4. Srovnání metod stanovení AB0 a Rh skupiny a screeningu protilátek

	Zkumavková	Gelová
Vyšetření AB0 a Rh	6 min centrifugace plné krve 5 min přípravné práce a pipetování 3 min inkubace + 1 min centrifugace Celkem- 15 minut	5 min centrifugace plné krve 2 min přípravné práce a pipetování 10 min centrifugace Celkem- 17 minut
Screening (enzym. test a nepřímý Coombs)	5 min centrifugace plné krve 3 min přípravné práce před enzym. testem a pipetování 1 min centrifugace 3 min přípravné práce před Coombs testem a pipetování 45 min inkubace + 1 min centrifugace 6 min propírání 2 min inkubace + 1 min centrifugace Celkem- 68 minut	5 min stáčení plné krve 3 min přípravné práce a pipetování 15 min inkubace 10 min centrifugace Celkem- 33 minut
Obě vyšetření	Celkem- 86 minut	Celkem- 55 minut

Zdroj: vlastní výzkum

Při výběru metod pro vyšetření krevní skupin v AB0 a Rh systémech a pro screening protilátek přihlížejí laboratoře i k ekonomickým hlediskům, která jsou závislá na úhradě vyšetření zdravotními pojišťovnami, ceně diagnostik pro jednotlivá vyšetření a spotřebního materiálu, který je potřebný pro toto vyšetření.

5. DISKUSE

Pojmem krevní skupina označujeme přítomnost nebo nepřítomnost specifických antigenů na povrchu krevních buněk a přítomnost nebo nepřítomnost specifických protilátek proti těmto antigenům v krevním oběhu člověka. Jak z definice vyplývá, máme krevní skupiny erytrocytů, leukocytů i trombocytů. V současné době je známo asi 250 krevních skupin, většina z nich patří do jednoho z 23 krevně skupinových systémů. Kromě těchto systémů existují také krevně skupinové soubory a kategorie antigenů s vysokou frekvencí a kategorie antigenů s nízkou frekvencí výskytu. Tyto skupiny mají význam pro transfúzi pouze tehdy, jsou-li v séru příjemce přítomny protilátky proti těmto antigenům přítomných na erytrocytech dárce.

V dnešní době se v důsledku transfuzí erytrocytů nejčastěji vyšetřují krevní skupiny erytrocytů. Rozložení jednotlivých skupin v určitých skupinových systémech je mezi lidmi různorodé. Rozdíly jsou jednak mezi lidmi navzájem, ale jsou známé i rozdíly mezi jednotlivými rasami a etnickými skupinami. Na světě je nejčastější skupina 0, u nás je nejčastější skupina A. Při nestejnokupinové transfuzi dochází k kontaktu antigenů dárce s protilátkami příjemce a poté dochází k transfuzní reakci a rozpadu erytrocytů pacienta. Tato reakce ohrožuje zdraví a život pacienta a může vést až k úmrtí, proto je nutné vždy před transfuzí vyšetřit krevní skupiny dárce i příjemce. Rozdíl v skupinách může nastat také u těhotných žen, pokud má plod některé antigeny od otce a u matky tyto antigeny chybí. Pokud v takovémto případě dojde k proniknutí erytrocytů plodu do krevního oběhu matky, dochází k tvorbě protilátek, které mohou pronikat zpět do oběhu dítěte a způsobit rozpad jeho erytrocytů. Tento stav může vést až k potratu. Protilátky zůstávají v těle matky a při dalším těhotenství mohou ohrozit i další plod, je proto nutné sledovat těhotné ženy a zjišťovat, jestli netvoří protilátky proti erytrocytům plodu.

Vyšetření antigenů krevně skupinových systémů erytrocytů a jim příslušných protilátek se skládá ze dvou vyšetření- stanovení krevní skupiny v AB0 a Rh systému a screeningu protilátek.

První z vyšetření je stanovení antigenů a protilátek ve dvou nejsilnějších a nejdůležitějších skupinových systémů- systému AB0 a Rh. Systém AB0 má jako jediný

přirozené protilátky vyskytující se i bez předchozí imunizace. V Rh systému se při vyšetření krevních skupin vyšetřuje přítomnost nebo nepřítomnost nejsilnějšího antigenu D. Podle tohoto antigenu rozlišujeme jedince na Rh pozitivní, kteří antigen D mají a na Rh negativní, u kterých tento antigen není. Protilátky Rh systému jsou pouze imunní a vyšetřují se stejně jako ostatní imunní protilátky při screeningu protilátek. Ostatní antigeny Rh systému se vyšetřují pouze tehdy, nastanou-li nějaké komplikace při transfuzi nebo během těhotenství.

Imunní protilátky se vyšetřují druhým vyšetřením tak zvaným screening protilátek. Při screeningu protilátek se vyšetřují imunní protilátky ostatních krevně skupinových systémů, které mají menší antigenní sílu a tím pádem méně často tvoří protilátky. Screening protilátek se skládá z několika testů. Prvním testem je test v solném prostředí, tímto testem se stanovují přirozené a imunní kompletní protilátky. Test se při vyšetření metodou gelové aglutinace nedělá. Dalším testem je takzvaný enzymatický test, kdy se stanovují imunní inkompletní protilátky, které nejsou schopné způsobit aglutinaci v solném prostředí. Pro tento test se používají erythrocyty, jejichž povrch je naleptán enzymem. Poslední test pro screening protilátek je nepřímý Coombsův test. Vyšetřují se jím imunní inkompletní protilátky, které se nedají zjistit ani enzymatickým testem, je nejcitlivější a zachytí i velmi slabé protilátky.

Pro tyto vyšetření se používají typové erythrocyty, se známým obsahem antigenů na povrchu jednotlivých krvinek. Pro stanovení skupin se používají typové erythrocyty předem daných skupin, kdy na povrchu erythrocytů jsou hlavně vyjádřeny antigeny skupinových systémů AB0 a Rh. Celý soubor typových erythrocytů skupiny 0 Rh negativní se nazývá panel typových erythrocytů a používá se hlavně při screeningu protilátek. Dále se při těchto vyšetření používají diagnostická séra obsahující známé protilátky. Tyto séra se získávají od lidí nebo od zvířat. Dále se používají rostlinné výtažky, které se nazývají lektiny. Lidská diagnostická séra se označují jako sangvity a zvířecí se označují jako xenoséra. Séra a lektiny musí mít předepsanou sílu a specifitu reakce.

Obě vyšetření se dají provádět několika metodami. Prvním typem metod je stanovení na kartičkách nebo na sklíčkách, tato metoda se dnes používá pro vyšetření u lůžka pacienta. Druhá metoda je označována jako klasická zkumavková. Další typ metod je

založen na gelové aglutinaci na pevné fázi. Pro tuto metodu se používají komerčně vyráběné plastové nosiče s mikrozkušnicemi. Nejnovější typ metod je stanovení na mikrotitrační destičce. Nejčastěji se provádí metody zkumavková a metoda gelové aglutinace.

Ve své práci jsem se zabývala hodnocením těchto dvou metod. Tyto metody jsem porovnávala z hlediska pracnosti, spolehlivosti a validity a finančního. Pro svou práci jsem si stanovila čtyři hypotézy. První hypotéza zní: „Stanovení metodou gelové aglutinace poskytuje stejně přesné a spolehlivé výsledky, jako klasická zkumavková metoda stanovení.“, druhá hypotéza zní: „Stanovení metodou aglutinace v gelu je méně pracné než stanovení zkumavkovou metodou.“, třetí hypotéza zní: „Pro rychlé stanovení je vhodnější metoda gelové aglutinace.“ a čtvrtá hypotéza zní: „Stanovení metodou gelové aglutinace na kartách je dražší než klasická zkumavková metoda.“

Pro potvrzení nebo vyvrácení mých hypotéz jsem v Biochemicko-hematologické laboratoři Laboma s.r.o. provedla několik stanovení krevní skupin zkumavkovou metodou a vyšetření screeningu protilátek metodou gelové aglutinace zde vyšetřovaných pacientů. Výsledky těchto vyšetření jsem zpracovala do tabulek, které jsou součástí mé bakalářské práce. Mé konečné závěry jsem konzultovala se zdejšími pracovníky.

6. ZÁVĚR

Hodnocení bylo provedeno při vyšetřování náhodně vybraného souboru pacientů. Při práci bylo zjištěno, že mezi zkumavkovou metodou a metodou gelové aglutinace nejsou žádné rozdíly v přesnosti a spolehlivosti výsledků stanovení. Obě metody při dodržení předepsaných pracovních postupů poskytují pravdivé a opakovatelné výsledky.

Díky snazší manipulaci s mikrozkušavkami na plastové kartě je stanovení metodou aglutinace v gelu méně pracnější než klasická zkumavková metoda. Při stanovení na plastových kartách z předem od výrobce označenými mikrozkušavkami je také menší riziko záměny jedné zkumavky za druhou a tak menší riziko vydání nesprávného výsledku.

Vyšetření krevní skupiny metodou gelové aglutinace na pevné fázi je díky obsahu do gelu předem přidaných reagensů rychlejší než klasická zkumavková metoda. Při klasické zkumavkové metodě je nutné do zkumavky nakapat jak vyšetřované sérum nebo erytrocyty tak i diagnostická séra nebo typové erytrocyty. Pokud je pro vyšetření použita gelová karta, odpadá kapání diagnostických sér, které jsou v gelu již přítomny. Díky tomu je stanovení metodou gelové aglutinace na pevné fázi jednodušší a také rychlejší než klasická zkumavková metoda. Při vyšetření screeningu protilátek metodou gelové aglutinace není nutné praní ve fyziologickém roztoku ani přikapávání AGH séra, které je již obsaženo v gelu karty. To celkově zkracuje dobu nutnou pro provedení vyšetření.

Pro větší náročnost výroby plastových nosičů s mikrozkušavkami s gelem je metoda gelové aglutinace na pevné fázi dražší než klasická zkumavková metoda.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Mgr. Ludmila Cuřínová. Krevní transfuze v dějinách medicíny. (online) Platný http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/63_1678.html. Leden 8,2009
2. Mudr. Eduard Dobrý, CSc. a spolupracovníci. Hematologie a transfúzní služba. Praha: Avicenum,1987. 310s. ISBN 73521-08/9
3. Eckstein Reinhold. Imunohematologie a transfúzní lékařství. Přel. Mudr.V.Kulich. 1 vyd. Praha: Diag-Human, 1994. 173s.
4. C.P.Engelfriet, Drs.A.J. Meluenbroek et al. Imunohematologie. Přel. Sylvia Vugts, Mudr.Jan Vaňák CSc. Amsterdam: Sanquin Reagens, 2003. 158s. ISBN 90-5267-029-3
5. Hematologické laboratoř, Onkologické centrum J. G. Mendla, Nový Jičín. Identifikace nepravidelných protilátek. (online) Platný <http://www.mammo-centrum.cz/laboratore/vysetreni-mesice/2007/unor-identifikace-nepravidelnych-protilatek.aspx>. Prosinec 3,2008
6. Peter Kubisz a kolektiv. Hematológia a transfuziológia. 1 vyd. Praha: Grada; Bratislava: Grada Slovakia, 2006. 323 s. ISBN: 80-247-1779-4. ISBN: 80-8090-000-0.
7. Miroslav Pecka, Jaroslav Malý, Jana Dejmková. Přehled laboratorní hematologie III (Hemostáza Imunohematologie). Praha: Galén, 1998. 152 s. ISBN 80-85824-89-2
8. Pecka Miroslav. Základy imunohematologie a transfuziologie. 1 vyd. Hradec Králové: Střední zdravotnická škola a Vyšší zdravotnická škola Hradec Králové, 2005. 139s. ISBN 80-903414-4-6

9. Stefan Silbernagl, Agamemnon Despopoulos. Atlas fyziologie člověka. 6. vyd. 3.vyd. české. Praha: Grada Publishing, 2004. 435s. ISBN: 80-247-0630-X.
10. Krevní skupina. (online)
Platný http://cs.wikipedia.org/wiki/Krevn%C3%AD_skupina. Leden 8, 2009
11. Krevní skupiny a jejich dědičnost. (online)
Platný <http://genetika.wz.cz/skupiny.htm>. Leden 8, 2009
12. Krevní skupiny. (online) Platný <http://hledejreferat.nolimit.cz/unnamed-42.html>.
Leden 8, 2009
13. Příbalový leták k soupravě pro stanovení AB0 a Rh skupin - DG Gel AB0/Rh
14. Příbalový leták k soupravě pro vyšetření screeningu protilátek ScanGel COOMBS + NEUTRAL
15. Mudr. Písačka Martin. Současné poznatky o Rh systému. Transfuze dnes. Praha: 2000, roč 6, č. 3, s.79-87.

8. KLÍČOVÁ SLOVA

Krevní skupinový systém AB0

Krevní skupinový systém Rh

Screening imunních protilátek








Klasická zkumavková metoda

Metoda gelové aglutinace

9. PŘÍLOHY

9.1. Příloha 1

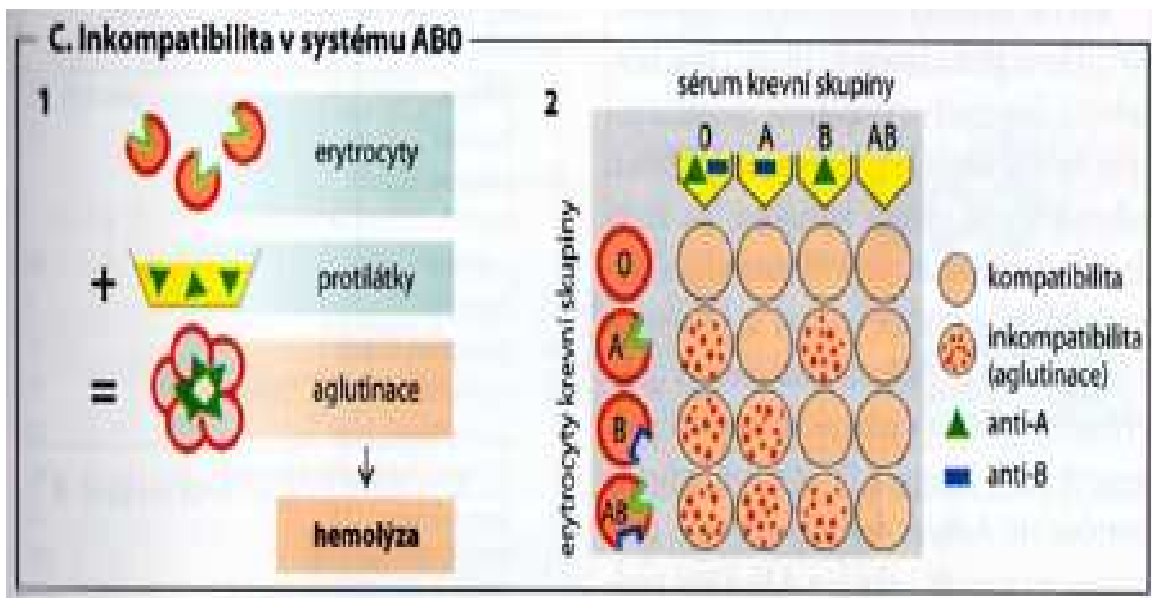
Přehled krevních skupin v AB0 systému

KREVNÍ SKUPINA GENOTYPY	A AA a AO	B BB a BO	AB AB	0 OO
ANTIGENY NA ERYTROCYTU	 A antigeny	 B antigeny	 A a B antigeny	 žádný A, ani B (H)
PROTILÁTKY V KRVÍ	 anti-B	 anti-A	žádná anti-B ani anti-A	 anti-A a anti-B
MŮŽE DOSTAT KREV OD	A a 0	B a 0	A, B, AB a 0	0
MŮŽE DÁT KREV PŘÍJEMCI	A a AB	B a AB	AB	A, B, AB a 0

Zdroj: Imunohematologie- C.P.Engelfriet, Drs. A.J. Meluenbroek (P.C. Ligthart, Drs. A.J.S. Visser, Dr. M.A.M. Overbeek) Nakladatelství: Sanquin Reagens

9.2. Příloha 2

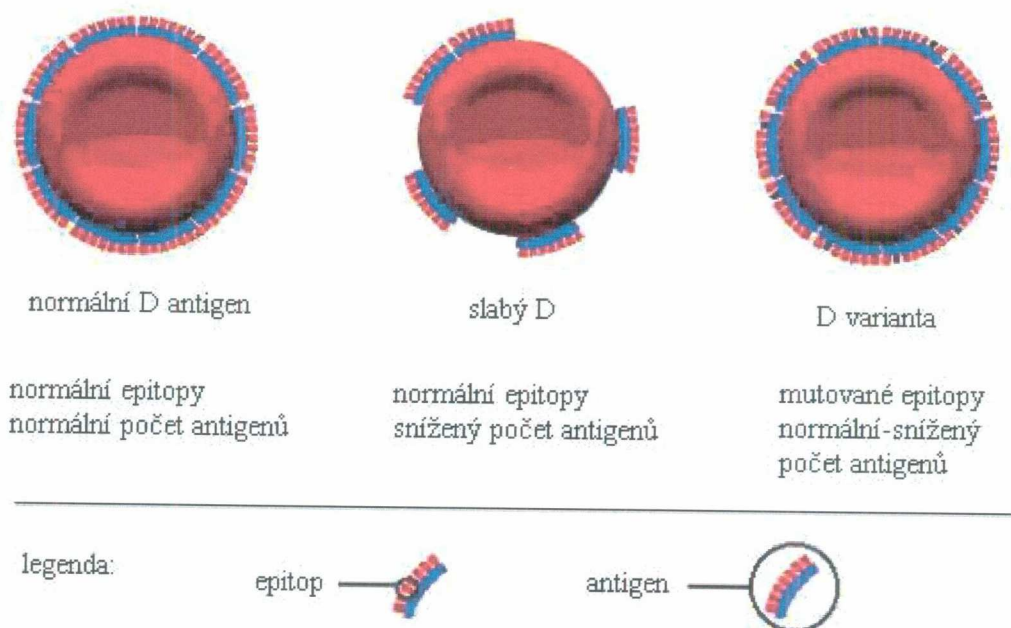
Přehled inkompatibility v systému AB0



Zdroj: Atlas fyziologie člověka-Stefan Silbernagl, Agamemnon Despopoulos (6. vydání) Nakladatelství: Grada

9.3. Příloha 3

Schématické znázornění normálního D antigenu, slabého D antigenu a D varianty



Zdroj: Imunohematologie- C.P.Engelfriet, Drs. A.J. Meluenbroek et al.Nakladatelství-Sanquin Reagens

9.4. Příloha 4

Tabulka vyšetření krevních skupin v AB0 systému

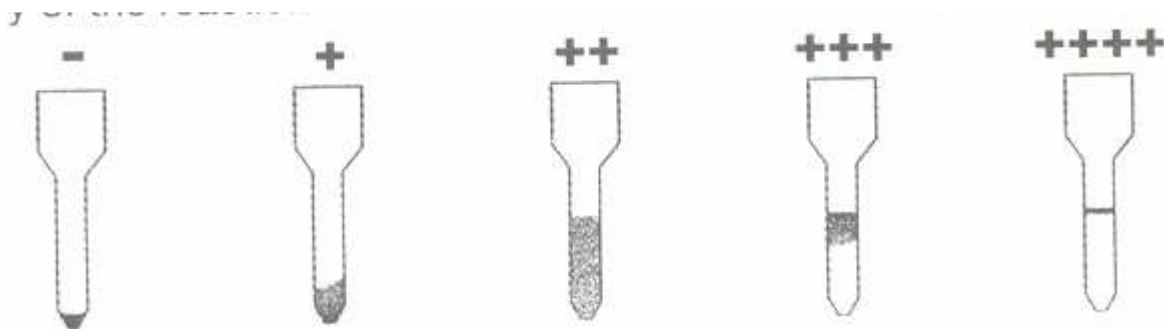
Diagnostická séra+erytrocyty probanda			Typové krvinky+sérum probanda			Krevní skupina
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	A	B	0	
+	-	+	-	+	-	A
-	+	+	+	+	-	B
+	+	+	-	-	-	AB
-	-	-	+	+	-	0

proband-vyšetřovaná osoba

Zdroj: Základy imunohematologie a transfuziologie- Miroslav Pecka Nakladatelství-Střední zdravotnická škola a Vyšší zdravotnická škola Hradec Králové 2005

9.5. Příloha 4

Výsledky vyšetření metodou gelové aglutinace



Zdroj: Příbalový leták k soupravě pro vyšetření screeningu protilátek ScanGel COOMBS + NEUTRAL

9.6. Příloha 5

Odečítání výsledků metodou stanovení gelové aglutinace

Negativní	-	Proužek červených krvinek na spodu gelového sloupce, žádné viditelné aglutináty ve zbytku sloupce.
Pozitivní	+/-	Ojedinelé aglutináty malých rozměrů v dolné polovině gelového sloupce.
	1+	Aglutináty malých rozměrů v gelovém sloupci.
	2+	Aglutináty malých nebo středních rozměrů v gelovém sloupci.
	3+	Aglutináty středních rozměrů v horní polovině gelového sloupce.
	4+	Proužek aglutinovaných červených krvinek na vrcholu gelového sloupce.

Zdroj: Příbalový leták k soupravě pro stanovení AB0 a Rh skupin - DG Gel AB0/Rh