Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Předtransfuzní vyšetření – zkouška slučitelnosti erytrocytárních transfuzních přípravků na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s.

Bakalářská práce

Autor práce: Lucie Tesařová

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: prim. MUDr. Petr Biedermann

Datum odevzdání práce: 3. 5. 2013

Abstrakt

Předtransfuzní vyšetření – zkouška slučitelnosti erytrocytárních transfuzních přípravků na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s.

Krev je tělní tekutinou, kterou se zatím přes veškerý pokrok nepodařilo nahradit žádnými jinými umělými přípravky. První zmínky o transfuzi nacházíme již u starých Egypťanů, Asyřanů, Židů i Římanů. První historicky zaznamenaný pokus o krevní transfuzi popsal historik a právník Stephano Infessura roku 1492. Na území našeho státu byla vykonána první známá transfuze krve teprve v 19. století. Provedl ji pražský lékař Antonín Erpek roku 1879.

Předtransfuzní vyšetření je soubor imunohematologických vyšetření prováděných před podáním transfuze krve pacientovi. Cílem předtransfuzního vyšetření je zajistit příjemci účinnou substituci, při které budou transfundované erytrocyty dostatečně dlouho přežívat v jeho krevním oběhu a nedojde k jejich destrukci. Základním principem všech předtransfuzních vyšetření je laboratorní potvrzení, že je krev příjemce slučitelná s krví dárce. Komplex předtransfuzních vyšetření před podáním erytrocytárního transfuzního přípravku povinně zahrnuje vyšetření krevní skupiny příjemce, screeningu antierytrocytárních protilátek příjemce, popř. doplněného identifikací protilátek, a vlastní zkoušky kompatibility transfuzního přípravku. Všechna tato vyšetření se provádějí aglutinačními metodami. Zkouška kompatibility je reakce séra/plazmy pacienta s erytrocyty dárce, která slouží k potvrzení, že je krev příjemce slučitelná s krví dárce. Může být vyšetřena buď serologicky (na sklíčku, ve zkumavce, sloupcovou gelovou aglutinací, metodami pevné fáze) nebo elektronicky (strategie type and screen, elektronická zkouška kompatibility). Platnost zkoušky kompatibility je 72 hod., počítáno od doby odběru vzorku příjemce krevní transfuze.

Moje práce se zabývá vyšetřením vlastní zkoušky kompatibility transfuzního přípravku, literárním porovnáním jednotlivých metod a porovnáním provedení metody sloupcové gelové aglutinace (LISS/NAT) manuálně a na automatu Techno TwinStation,

včetně porovnání provozně-ekonomického hlediska. Praktická část této práce byla zpracována na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s.

Literárním porovnáním metod zkoušky kompatibility jsem dospěla k závěru, že nejcitlivější metodou používanou k vyšetření zkoušky kompatibility, je nepřímý antiglobulinový test (NAT) provedený sloupcovou gelovou aglutinací nebo metodami pevné fáze. Moje zjištění odpovídá Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP.

Výsledky této bakalářské práce potvrzují správnost volby vedení TRS provádět vyšetření zkoušky kompatibility metodou sloupcové gelové aglutinace (LISS/NAT). Výhody sloupcové gelové aglutinace oproti zkumavkovým metodám spočívají v tom, že se jedná o rychlou metodu, s menší spotřebou reagencií i vzorku, s možností standardizace, automatizace, dokumentace. V neposlední řadě metoda vykazuje vyšší citlivost, což zvyšuje bezpečnost krevní transfuze pro pacienta.

Vyšetření zkoušky kompatibility metodou sloupcové gelové aglutinace (LISS/NAT) bylo provedeno manuálně a na automatu Techno TwinStation u 52 vzorků pacientů, celkem 118 testů. Výsledky vyšetření byly shodné bez ohledu na zvolený způsob provedení. Ani z provozně-ekonomického hlediska se oba typy provedení tohoto vyšetření výrazněji neliší (manuální cca 24 Kč, automatizované cca 26 Kč). Při manuálním provedení nelze vyloučit chyby lidského faktoru, které jsou v případě automatizace eliminovány. Další výhodou automatu je dohledatelnost všech prvků zapojených do analytického procesu, které jsou archivovány a zůstanou přístupné po provedení testu. Výhodou manuálního provedení zkoušky slučitelnosti je kratší celkový čas vyšetření (cca 30 – 35 min) oproti automatizovanému (cca 45 – 60 min dle počtu vzorků). Nevýhodou automatizovaného provedení zkoušky kompatibility na automatu Techno TwinStation je to, že není možné v průběhu pipetování přidávat další vzorky.

Abstract

Pre-transfusion measures - compatibility testing before transfusion of red cell product in the Blood establishment and blood bank of Nemocnice České Budějovice, a. s.

Blood is a body fluid which, despite all the scientific progress, still cannot be replaced by any other artificial product. The first records of transfusion were found in the ancient Egyptian, Assyrian, Jewish and Roman societies. The first historically recorded attempt at blood transfusion was described by a historian and lawyer Stephano Infessura 1492. The first known blood transfusion in the Czech Republic was performed in 1879 by Prague physician Anthony Erpek.

Pre-transfusion testing is a set of immunohematology examination performed prior to blood transfusion to the patient, which aims to ensure effective substitution for the patient, during which the transfused RBCs will survive long enough in recipient's bloodstream and will not be destroyed. The basic principle of the whole pre-transfusion testing is laboratory confirmation that the recipient's blood is compatible with the donor's blood. The complex of pre-transfusion testing before administration of RBCs includes methods of mandatory testing of the recipient's blood group, antibody screening, possibly identification of special antibodies, and the cross match test itself. All these tests are performed using the agglutination method. Compatibility test "cross match" is a reaction between donor's and recipient's serum, which is used for confirmation that the recipient's blood is compatible with the donor's blood. It can be examined either serologically (on a slide, in a tube, by gel column agglutination, by methods of solid phase) or electronically (type and screen strategy, electronic test of compatibility). Validity of the compatibility test is 72 hours, counting from the moment of sampling of recipient's blood.

My thesis deals with the examination of the actual test of the compatibility of the transfusion product, literary comparison of various methods and comparison of the manual performance of the column gel agglutination method (LISS/NAT)

and performance with the use of the Techno TwinStation machine. My work also includes comparison of an operational perspective and an economic perspective. The practical part of this work was carried out in Blood establishment and blood bank of Nemocnice České Budějovice, a. s.

With the use of literary comparison of methods of compatibility test, I conclude that the most sensitive method used to investigate the compatibility test is the indirect anti-globulin test (NAT) performed using column gel agglutination or solid phase methods. My recommendation corresponds to the findings of Společnost pro transfuzní lékařství ČLS JEP.

The thesis confirms that the cross match testing via using the gel column agglutination method (LISS/NAT) was the best choice made by the Blood establishment and blood bank. Benefits of the gel column agglutination compared to the tube methods are the speed, smaller consumption of reagents and blood samples, the possibility of standardization, automation and documentation. Finally, the method has higher sensitivity, which increases the safety of blood transfusion for the patient.

Examination of compatibility testing using the gel column agglutination method (LISS/NAT) was done in 52 patients manually and using the Techno TwinStation (a total of 118 tests). Examination results were identical regardless the chosen method. There was also no significant difference concerning the operational and economic costs of the two methods (manual was about 24 CZK, automated was about 26 CZK). In manual performance human errors cannot be eliminated, whereas in automation these errors are eliminated. Another advantage of automation is the traceability of all the elements involved in the analytical process, which are archived and will remain accessible after the test. The advantage of the manual compatibility tests is shorter total examination time (about 30 - 35 minutes compared to about 45 – 60 minutes when using automated method; depending on the number of samples). The disadvantage of automated method of compatibility testing using the Techno TwinStation machine is the impossibility to add more samples during pipetting.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2013 .....

Lucie Tesařová

Poděkování

Upřímně děkuji svému vedoucímu prim. MUDr. Petru Biedermannovi za vedení a odbornou pomoc při zpracování této bakalářské práce a svým kolegyním a kolegům z Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s. za umožnění zpracování praktické části této bakalářské práce.

Dále děkuji svému manželovi Martinovi za podporu a trpělivost.

Obsah

Seznam použitých zkratek 10
Úvod 11
1 Teoretická část 12
1.1 Historie krevní transfuze 12
1.2 Základní pojmy 15
1.3 Předtransfuzní vyšetření 17
1.3.1 Krevní skupiny 18
1.3.2 Screening protilátek 21
1.3.3 Zkouška kompatibility 22
1.3.4 Vyhodnocení výsledků předtransfuzního vyšetření 23
1.3.5 Denní kontroly kvality 25
1.3.6 Komplikace transfuzí 25
1.4 Metody zkoušky kompatibility 28
1.4.1 Sklíčkové a zkumavkové metody 28
1.4.2 Testy na mikrotitrační destičce 29
1.4.3 Sloupcové metody 29
1.4.4 Metody pevné fáze 31
1.4.5 Type and screen 31
1.4.6 Elektronická zkouška kompatibility (EKP) 32
1.4.7 Automatizace 33
2 Cíl práce 35
3 Metodika 36
3.1 Charakteristika souboru 36
3.2 Preanalytická část 36
3.3 Analytická část 36
3.3.1 Spotřební materiál, reagencie, přístroje a technické vybavení 36
3.3.2 Příprava materiálu 37
3.3.3 Manuální provedení 37

3.3.4 Automatizace 38
3.4 Postanalytická část 39
4 Výsledky 40
4.1 Porovnání jednotlivých metod zkoušky kompatibility 40
4.2 Porovnání provedení metody sloupcové gelové aglutinace 42
4.3 Získané výsledky metody sloupcové aglutinace 43
4.4 Porovnání provozně-ekonomického hlediska metody sloupcové gelové aglutinace (LISS/NAT) zpracované manuálně a na automatu Techno TwinStation 49
4.5 Zkouška kompatibility na TRS Nemocnice České Budějovice, a. s. 50
5 Diskuze 51
6 Závěr 53
7 Seznam použité literatury 54
8 Klíčová slova 58
9 Přílohy 59

Seznam použitých zkratek

AIHA	autoimunní hemolytická anémie
AHG, AGH	antihumanum globulinum (antiglobulinové sérum)
CPD-A	citrate phosphate dextrose adenine (antikoagulační roztok)
ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
ČR	Česká republika
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (antikoagulační roztok)
EHK	externí hodnocení kvality
EKP	elektronická zkouška kompatibility (elektronický křížový pokus)
ET	enzymatický test
HIV	human immunodeficiency virus (virus lidské imunodeficience)
HTR	hemolytická potransfuzní reakce
LFA	low frequency antigen (antigen s nízkou frekvencí výskytu)
LIS	laboratorní informační systém
LISS	low ionic strenght salt solution (solný roztok o nízké iontové síle)
LISS/NAT	nepřímý antiglobulinový test s použitím erytrocytů resuspendovaných v roztoku o nízké iontové síle
KP	zkouška kompatibility (křížový pokus)
NAT	nepřímý antiglobulinový test
PAT	přímý antiglobulinový test
PBS	pufrovaný fyziologický roztok pH 6,98
PC	personal computer
RPR	rapid plasma reagin neboli RRR (rychlá reaginová reakce) - test k diagnostice syfilis
SPRCA	solid phase red cell adherence (metoda pevné fáze)
TRS	transfuzní oddělení
TP	transfuzní přípravek
ÚVN	Ústřední vojenská nemocnice
VDRL	veneral disease research laboratory - test k diagnostice syfilis

Úvod

Krev je tělní tekutinou, kterou se zatím přes veškerý pokrok nepodařilo nahradit žádnými jinými umělými přípravky. Pokusy o její využití k léčbě sahají hluboko do minulosti. Bez znalostí krevního oběhu, krevních skupin a imunologických zákonů byly tyto pokusy většinou neúspěšné. K velkému rozvoji transfuzí došlo až během 20. stol. s objevem krevních skupin, konzervace krve a plastových vaků pro odběry krve.

Předtransfuzní vyšetření je soubor imunohematologických vyšetření prováděných před podáním transfuze krve pacientovi. Bez jeho důsledného provedení by došlo k vážnému ohrožení příjemce krevní transfuze. Na začátku 20. stol. se před podáním transfuze provádělo jen vyšetření krevní skupiny dárce a příjemce, postupně se přidalo vyšetření zkoušky kompatibility mezi krví dárce a příjemce a v 80. letech 20. stol. ještě povinné vyšetření antierytrocytárních protilátek u příjemce krevní transfuze. Všechna tato vyšetření se provádějí aglutinačními metodami, dříve na sklíčku, později ve zkumavkách, nyní moderními metodami sloupcové gelové aglutinace nebo pevné fáze.

Moje práce se zabývá vyšetřením vlastní zkoušky kompatibility transfuzního přípravku, literárním porovnáním jednotlivých metod a porovnáním provedení metody sloupcové gelové aglutinace (LISS/NAT) manuálně a na automatu Techno TwinStation, včetně porovnání provozně-ekonomického hlediska.

Téma předtransfuzního vyšetření jsem si vybrala proto, že pracuji na TRS v laboratoři krevní banky, kde se předtransfuzní vyšetření provádí jako hlavní vyšetření a kde jsem se podílela na zavádění automatizace do provozu.

1 Teoretická část

1.1 Historie krevní transfuze

První zmínky o transfuzi nacházíme již u starých Egypťanů (osvěžující koupele), Asyřanů, Židů i Římanů (pití krve mladých gladiátorů). Dodnes se však nenašly doklady, zda se ve skutečnosti transfuze opravdu prováděly.

První historicky zaznamenaný pokus o krevní transfuzi popsal historik a právník Stephano Infessura roku 1492, když papež Inocenc VIII. upadl do komatu a na návrh židovského lékaře mu darovali krev na záchranu života tři desetiletí chlapci. Jako odměna byl každému chlapci slíben dukát, papež zemřel a tři mladí dárci krve rovněž.

V 16. století vymyslel italský lékař Geronimo Cardano systém dvou trubic, jejichž pomocí se mohla převádět krev z tepny dárce do žíly příjemce.

Důležitým mezníkem byl objev krevního oběhu v roce 1616 anglickým lékařem Wiliamem Harveyem. První historicky doložený krevní převod provedl v Oxfordu fyziolog Richard Lower na pokusných psech v roce 1666. Roku 1667 byla Jeanem Baptistem Denisem podána první úspěšná transfuze člověku - aplikace beránčí krve nemocnému šestnáctiletému chlapci, který transfuzi přežil a uzdravil se. Další pokusy s transfuzemi zvířecí krve člověku však nebyly úspěšné a byly v Anglii, Francii a Itálii zakázány v roce 1678 jak světskými, tak církevními úřady.

Dalších 150 let trvalo, než se výzkum v oblasti transfuzí znovu obnovil a metoda se rozvinula do dnešní podoby. Myšlenku léčit vykrvácené lidi transfuzemi krve opět oživil londýnský profesor fyziologie a porodnictví James Blundell v roce 1818. Při své práci vycházel z výsledků svých předchůdců a při transfuzi užil správně krve zdravých lidí. Po příslušné experimentální přípravě vykonal 10 transfuzí u žen, které vykrvácely při porodu. Ve většině případů se mu podařilo rodičky zachránit před smrtí. V roce 1824 James Blundell vydává knihu o transfuzi – zdůrazňuje nutnost podání pacientovi pouze lidské krve. Blundellovy úspěchy znovu zvedly zájem o transfuze krve, a tak se jejich otázkami začali zabývat odborníci ve většině evropských zemí. Jedním z prvních lékařů, který poukázal na potřebu zabránit srážení krve při transfuzi,

byl Vasilij Vasilijevič Suturgin v roce 1865. Srážení krve se pokoušel zabránit šleháním krve pomocí jemné ocelové tyčinky. Současně jako první dokázal, že defibrinovaná krev se může pro transfuzi skladovat při teplotě 0 °C až +4 °C po dobu 7 dnů. Byl tedy jedním z prvních zakladatelů konzervace krve.

Na území našeho státu byla vykonána první známá transfuze krve v 19. století. Provedl ji pražský lékař Antonín Erpek roku 1879. Používal při ní ovčí krev v poměrně malém množství (asi 150 ml). Provedl 4 transfuze, z nichž 2 byly úspěšné, jedna neúspěšná a jedna skončila smrtí příjemce. Transfuze krve provedené v 19. století dokázaly s konečnou platností nemožnost transfuze zvířecí krve v množstvích, která jsou potřebná k léčení nemocných. Ukázalo se, že úspěšná je pouze transfuze krve lidské! Avšak i tato transfuze byla provázena komplikacemi. Komplikace způsobovalo jednak srážení krve, ale také tehdy ještě záhadné vzájemné shlukování krvinek poté, co se navzájem smísila krev některých lidí. Rozřešení záhady a odstranění těchto často smrtelných komplikací přineslo až 20. století.

Roku 1901 objevil vídeňský patolog a sérolog Karl Landsteiner, že shlukování některých lidských krvinek s některými lidskými séry je přirozenou vlastností lidské krve. Tento jev nazval izoaglutinací. Podle pravidelného výskytu izoaglutinace rozdělil lidi do tří skupin, které označil A, B, C.

V roce 1902 objevili Alfred von Decastello a Adriano Sturli případy, kdy krev nebylo možné zařadit do žádné ze tří skupin, které popsal Landsteiner. První, kdo správně roztřídil lidskou krev do čtyř skupin, byl český psychiatr Jan Janský. Krevní skupiny označil číslicemi I, II, III, IV. K podobným závěrům došel nezávisle na svých předchůdcích také Američan W. L. Moss v roce 1910. V tomto roce došlo také k „přejmenování“ krevních skupin na A, B, AB, 0, jak je známe dnes. Poznatky o krevních skupinách byly poprvé využity v praxi při podávání transfuzí, které prováděl americký hematolog Reuben Ottenberg.

Objev krevních skupin odstranil první hlavní překážku v úspěšné aplikaci transfuzí. Ukázalo se, že transfuze krve v rámci stejné skupiny je bezpečná, ovšem za předpokladu, že se odstraní i druhá velká překážka a to srážení krve.

V letech 1914 - 1918 došlo k první světové válce, velký počet raněných si vyžádal naléhavou potřebu transfuze a tedy i konzervace krve k nepřímé transfuzi. Jurevič a Rozengart v Rusku, Hustin v Belgii, Agote a Lewisohn v Americe objevili protisrážlivý a přitom pro lidský organismus neškodný účinek citrátu sodného. Tato chemikálie je používána dodnes. V roce 1916 přídavek glukózy dokonce umožnil krev po odběru několik dnů skladovat a vytvářet tak jisté zásoby.

Roku 1939 Karl Landsteiner ve spolupráci s A. S. Wienerem popsali nový skupinový systém erytrocytů, z praktického hlediska velmi důležitý, Rh systém. Systém byl pojmenován podle opice Macacus Rhesus, jejíž krvinky byly v pokusech použity. Poznání Rh systému osvětlilo některé dříve nevysvětlitelné potransfuzní reakce pacientů. Po roce 1946 byly objevovány další antigenní systémy erytrocytů, např. Kell, Duffy, Kidd, Lutheran a jiné pro transfuzní praxi méně významné skupinové systémy.

Za druhé světové války vznikají organizace Národní transfuzní služby, nejprve v tehdejším Sovětském svazu a v Americe (Chicago), v ČR až roku 1948.

V dalších letech byly objeveny i jiné látky pro prodloužení skladování a zabránění srážení krve a techniky oddělení krvinek od krevní plazmy a její samostatné zmražení pro dlouhodobé skladování.

Za zlomový rok v transfuziologii je možno považovat rok 1950, kdy Carl Walter a W. P. Murphy představují plastové vaky pro odběry krve, které nahrazují skleněné lahve.

Pro zvýšení bezpečnosti transfuze krve pro pacienty bylo třeba začít dárce krve testovat na infekční markery. V ČR bylo zahájeno testování dárců v 50. letech 20. století netreponemovými testy na syfilis (VDRL, RPR), roku 1971 testování na hepatitidu B, roku 1985 byl vyroben první screeningový test pro detekci viru HIV, který se rutinně v ČR u dárců krve vyšetřuje od roku 1987. Jako zatím poslední se v ČR roku 1992 zařazují testy na hepatitidu C a v roce 1996 je zahájeno testování i antigenu p24 – u vyšetření HIV. [1, 2, 3, 4].

1.2 Základní pojmy

Transfuzní lékařství se zabývá přípravou kvalitních krevních přípravků a bezpečnou hemoterapií. Její součástí je *imunohematologie*, vědní obor, který studuje vlastnosti krve z hlediska zákonitostí imunitních reakcí probíhajících ve zdravém a nemocném organizmu. [4]

Antigen je složitá organická molekula, která se většinou nachází na buněčné membráně. Je to látka, kterou imunitní systém rozpozná a reaguje na ni. Odpovědí je tvorba protilátky a její vazba na uvedený antigen. Nejvýznamnějšími antigeny jsou proteiny a různé komplexní polysacharidy, ale také lipidy a lipoproteiny. Malá oblast molekuly antigenu, která je rozpoznána imunitními mechanizmy, se nazývá epitop. Schopnost antigenu vyvolat imunitní odpověď nazýváme imunogenita, schopnost reagovat s protilátkou antigenicita. Tyto vlastnosti závisí na velikosti antigenu, jeho tvaru a umístění antigenních determinant na povrchu erytrocytu. [4, 5]

Protilátky, imunoglobuliny, jsou součástí gamaglobulinové frakce lidského séra. Rozeznáváme protilátky přirozené, které vznikly jako reakce na antigeny membrán různých bakterií, rostlin a jiných organizmů, a protilátky imunní, které vznikají v procesu imunizace po prodělání nemocí, v těhotenství nebo po umělém kontaktu s antigenem (transfuze). Tehdy mluvíme o aloimunních protilátkách. [4] Aloprotilátky se mohou tedy v krvi vyskytovat jen proti tomu antigenu, který se nevyskytuje na vlastních krvinkách. [6] Protilátky namířené proti buňkám vlastního organizmu nazýváme autoprotilátky. V nízkých koncentracích se vyskytují fyziologicky, jejich výskyt stoupá s věkem. Pokud se autoprotilátky vyskytují v séru/plazmě ve zvýšené koncentraci, jsou diagnostickým znakem autoimunitních onemocnění, tj. chorob, kde se imunitní reakce vyvine proti součástem vlastního těla. [7]

Principem imunohematologických testů je *aglutinační reakce*. V první fázi reakce erytrocytárního antigenu s protilátkou dojde ke spojení protilátky a antigenu, k tzv. senzibilizaci erytrocytu. Aby následně vznikla hemaglutinace je nutné, aby se protilátka navázala ještě na jiný erytrocyt, tzn., aby překlenula vzdálenost

7 - 8 nm, která odpovídá průměru erytrocytu. Pomocí aglutinace je možné vyšetřovat antigeny na erytrocytech (tzv. krevní skupiny) i protilátky proti erytrocytům v séru či plazmě. V přímé aglutinaci se uplatní ty protilátky, které jsou schopné překlenout vzdálenost mezi erytrocyty. [8] Erytrocyty od sebe oddělují odpudivé síly způsobené rozdílem v elektrickém potenciálu mezi negativně nabitými erytrocyty a pozitivními ionty v okolním prostředí, tzv. zeta potenciál. [6] K průkazu protilátek, které přímo neaglutinují erytrocyty, ale pouze je senzibilizují, se používají antiglobulinové testy (AGH testy, Coombsovy testy). Aby bylo možné takovéto protilátky prokázat, přidává se do reakce další protilátka proti původní, senzibilizující protilátce. Tento anti-imunoglobulin (AHG sérum) následně zajistí vzájemné spojení jednotlivých senzibilizovaných erytrocytů a vizualizuje aglutinační reakci. [8]

Přímý antiglobulinový test (PAT) detekuje erytrocyty senzibilizované protilátkou *in vivo* v organizmu. Používá se při průkazu imunitního typu hemolýzy u pacientů po transfuzích, transplantacích, u potransfuzních reakcí, u hemolytického onemocnění novorozence, u pacientů s projevy autoimunity (AIHA).

Nepřímý antiglobulinový test (NAT) slouží k průkazu protilátky proti erytrocytům, která se nachází volně v séru/plazmě a kterou lze prokázat pomocí AHG séra až po inkubaci vyšetřovaného séra s antigeny erytrocytů. Je to test, který prokazuje klinicky významné nepravidelné protilátky proti erytrocytům, určuje kompatibilitu erytrocytů při předtransfuzním vyšetření a lze jím vyšetřovat antigeny některých krevních skupin. AHG sérum musí být komplexní, tzn., že musí obsahovat složku anti-IgG a anti-C3 proto, aby detekovalo protilátky IgG i protilátky závislé na komplementu. [8]

Při reakci erytrocytárního antigenu s protilátkou vzniká v organizmu *hemolytická reakce*. Její rychlost a intenzita závisí na vlastnostech antigenu, protilátky a imunitního systému jedince. Při podání inkompatibilní transfuze mohou vzniknout (v závislosti na vlastnostech antigenu a protilátky) intravaskulární hemolytické reakce, extravaskulární hemolytické reakce nebo pozdní hemolytické reakce. [4]

1.3 Předtransfuzní vyšetření

Cílem předtransfuzního vyšetření je zajistit příjemci účinnou substituci, při které budou transfundované erytrocyty dostatečně dlouho přežívat v jeho krevním oběhu a nedojde k jejich destrukci.

Základním principem všech předtransfuzních vyšetření je laboratorní potvrzení, že je krev příjemce slučitelná (kompatibilní) s krví dárce. Původní zkoušky kompatibility se skládaly z velké a malé křížové zkoušky, kdy při velké se „křížilo“ sérum pacienta s erytrocyty dárce, při malé byla kombinace opačná a erytrocyty příjemce se „křížily“ se sérem dárce. Testy byly prováděné v různých prostředích (s vysokým obsahem proteinů, s přidáním antiglobulinových sér) při různých teplotách.

Dnešní imunohematologická vyšetření prováděná před transfuzí erytrocytů zajišťují pacientovi relativně bezpečnou transfuzi, eliminují nebo alespoň minimalizují nežádoucí reakce, přitom jsou při rychlém provedení dostatečně jednoduchá, senzitivní a specifická.

Komplex předtransfuzních vyšetření před podáním erytrocytárního transfuzního přípravku povinně zahrnuje vyšetření krevní skupiny příjemce, screeningu antierytrocytárních protilátek příjemce, popř. doplněného identifikací protilátek, a vlastní zkoušky kompatibility transfuzního přípravku. Vyšetření krevní skupiny a screeningu antierytrocytárních protilátek u dárce je součástí imunohematologického vyšetření krevního vzorku dárce po odběru. [8]

Stupně naléhavosti požadavku na předtransfuzní vyšetření:

- STANDARDNĚ - transfuzní přípravek je k dispozici podle data na žádance, po provedení kompletního předtransfuzního vyšetření. Doba odezvy do 24 hodin.
- STATIM - vyšetření mají přednost před vyšetřováním vzorků ve standardním režimu a jejich výsledky jsou neprodleně zadány do LIS a následně hlášeny telefonicky žadatelům vyšetření. Transfuzní přípravek je připraven k vydání co nejdříve po provedení kompletního předtransfuzního vyšetření v závislosti na typu a dostupnosti transfuzního přípravku a na počtu požadovaných jednotek

či dávek. Na žádance musí být zřetelně vyznačen požadavek STATIM. Doba odezvy do 90 minut.

- VITÁLNÍ INDIKACE - transfuzní přípravek je vydán ihned bez provedení předtransfuzního laboratorního vyšetření.
    a) Neznámá krevní skupina AB0, RhD: vydává se transfuzní přípravek skupinově univerzální - erytrocyty: 0 RhD negativní, pokud možno i Kell negativní.
    b) Známá krevní skupina AB0, RhD: provede se ověření krevní skupiny, vydávají se přednostně stejnoskupinové transfuzní přípravky.

    Následně se provede kompletní předtransfuzní vyšetření, o jeho výsledku je dodatečně informován žadatel vyšetření. Naznačuje-li výsledek vyšetření, že předběžně vydané přípravky by mohly být inkompatibilní (nález nepravidelných protilátek, pozitivní zkouška kompatibility), je nutno ihned uvědomit žadatele vyšetření, dle možností zastavit transfuzi nevhodných přípravků a dosud nepodané nahradit vhodnými.

    Krevní vzorek pro předtransfuzní vyšetření musí být odebrán zásadně před podáním transfuzního přípravku. [9, 10]

1.3.1 Krevní skupiny

Krevní skupinové systémy erytrocytů jsou staré nejméně několik milionů let, a proto je imunitní systém omezen v tvorbě protilátek proti některým původcům chorob s podobnými antigenními vlastnostmi. Na vytváření krevní skupiny se může podílet různý genetický podklad s různě účinnými alelami. [11] Krevní skupiny jsou dědičné vlastnosti dané pro celý život. Jsou přebírány od rodičů prostřednictvím genů. [3]

Na erytrocytech vznikají antigeny krevních skupin již během zárodečného života, po 5. týdnu antigeny AB0 systému, po 8. týdnu antigeny Rh systému. [12, 13] Antigeny AB0 jsou prokazatelné již u 6 týdenních embryí, nejsou však ještě plně rozvinuty. Při porodu dosahují přibližně 20 - 30 % maxima. Plnohodnotné antigeny se objevují

v prvním a druhém roce života jedince. Plné funkčnosti a antigenicity dosahují však až v 18. - 20. roce života. [6]

Po chemické stránce jsou antigeny krevních skupin buď glykoproteiny, glykolipidy nebo lipoproteiny. Dědičnost všech dosud známých krevních systémů probíhá přesně podle Mendelových zákonů. [12, 13]

AB0 systém

V transfuzní praxi patří k nejdůležitějším krevně skupinovým systémům, protože se v séru zdravých jedinců pravidelně nacházejí protilátky proti antigenům chybějících na erytrocytech. Proto je také nejnebezpečnější. Krevně skupinové antigeny A a B jsou cukerné struktury obvykle umístěné ve velkém množství na povrchu erytrocytu. Vytvářejí se z prekurzoru, H antigenu, který má sám o sobě antigenní vlastnosti. Antigeny AB0 systému jsou přítomny nejen na erytrocytární membráně, ale vyskytují se rovněž volně v plazmě a jiných tělních tekutinách. V AB0 systému rozeznáváme 4 fenotypy: A, B, AB, 0 a 6 genotypů: AA, A0, BB, B0, AB, 00. V séru zdravého jedince se pravidelně vyskytují protilátky anti-A a/nebo anti-B. Zpravidla jsou tyto protilátky třídy IgM zvané rovněž jako aglutininy. Pokud není na erytrocytech přítomen aglutinogen A, je v séru této osoby vždy přítomen anti-A aglutinin. Jestliže není přítomen aglutinogen B, je v séru vždy přítomen anti-B aglutinin. Anti-A a anti-B protilátky nejsou přítomny u novorozenců, jejich tvorba začíná od 3. do 6. měsíce po narození. [3]

Tab. 1: Krevní skupiny AB0

KREVNÍ SKUPINA	Aglutinogeny na erytrocytech	Aglutininy v séru/plazmě
A	A	anti-B
B	B	anti-A
AB	A, B	žádné
0	žádné	anti-A, anti-B

Zdroj: Vybrané kapitoly: Transfuzní lékařství a imunohematologie [12]

Klinický význam:

- anti-A a anti-B protilátky jsou vždy přítomny, pokud chybí odpovídající antigen
- IgM protilátky vázající komplement způsobují intravaskulární hemolýzu
- anti-A a anti-B protilátky vždy způsobují hemolytickou potransfuzní reakci
- anti-H protilátka se vyskytuje ve 2 formách: jako aglutinin reagující v chladu u jedince, jehož erytrocyty obsahují málo H antigenu nebo u 0_h jedince, jehož erytrocyty vůbec neobsahují H antigen. V chladu reagující anti-H je slabá protilátka, která není častá. U skupiny 0_h zcela chybí H antigen, proto je anti-H pravidelnou protilátkou, která reaguje od 4 °C do 37 °C, váže komplement a tím pádem může způsobit intravaskulární hemolýzu. [3]

Rh systém

Byl objeven Landsteinerem a Wienerem v roce 1939. V séru králíka, imunizovaného erytrocyty opice Macacus Rhesus, byla nalezena protilátka, která aglutinovala erytrocyty 84 % lidí. Protilátka reagovala s antigenem na povrchu lidských a také opičích erytrocytů, který byl označen jako Rh faktor. Později byla zjištěna souvislost mezi tímto faktorem a imunizací Rh negativních jedinců, kterým byla transfundována Rh pozitivní krev. Původní termín Rh faktor a anti-Rh protilátka byly později přejmenovány na antigen D a anti-D protilátku. Antigen D je po AB0 antigenech nejvýznamnějším erytrocytárním antigenem. Na rozdíl od A a B skupiny se v séru Rh negativních jedinců nevyskytuje pravidelná protilátka anti-D. K vytvoření této protilátky dochází až následkem imunizace, obvykle po krevní transfuzi nebo během těhotenství – přibližně u 75 % Rh negativních jedinců. K D antigenu neexistuje antitetický antigen, ale k označení Rh negativního fenotypu se používá písmeno d.

Ve 40. letech 20. století byly popsány i další antigeny Rh systému: C, c, E, e, které jsou podstatně méně imunogenní než D antigen. Imunogenita Rhesus antigenů klesá v pořadí: D, c, E, C, e. Antigeny Rh systému jsou kódovány dvěma geny uloženými v těsné blízkosti na krátkém raménku chromozomu 1. Jsou to: gen *RHD*, který kóduje antigen D, gen *RHCE*, který kóduje antigeny Cc, Ee. Blízkost genů umožňuje při meióze výměnu genetického materiálu mezi *RHD a RHCE* na homologních

chromozomech. Výsledkem jsou hybridní geny obsahující genetický materiál z obou genů. Jejich produktem jsou variantní a slabé antigeny RhD a různé odchylky v antigenech C, c a E, e. [14]

Protilátky proti antigenům C, c, E, e jsou následkem transfuze vytvořeny přibližně jen v 4,5 % případů. Není tedy nezbytně nutné podávat standardně pacientům C, c, E, e kompatibilní krev. [3]

Vyšetření AB0 krevních skupin se provádí jako vyšetření aglutinogenů a vyšetření aglutininů. Aglutinogeny stanovíme pomocí diagnostických antisér (anti-A, anti-B, anti-AB), aglutininy stanovíme pomocí typových erytrocytů (A1, B).

Vyšetření Rh faktoru (antigenu RhD) se provádí pomocí diagnostického antiséra anti-D.

1.3.2 Screening protilátek

Vyšetření nepravidelných protilátek proti erytrocytům bylo k předtransfuznímu vyšetření povinně zařazeno v 80. letech 20. stol. Metoda musela obsahovat test v solném prostředí, enzymový test a techniku NAT. [15]

V současné době se nepravidelné protilátky proti erytrocytům prokazují screeningovým testem, ve kterém se vyšetřované sérum/plazma pacienta inkubuje s diagnostickými erytrocyty. Test musí být provedený metodou, která detekuje klinicky významné protilátky. Doporučené je provedení NAT s použitím erytrocytů resuspendovaných v roztoku o nízké iontové síle (LISS) a s inkubací při 37 °C. [8, 16] Další možnou metodou je enzymatický test. ET je doplňková technika, pouze vzácně citlivější než NAT (některé Rh protilátky). Jeho provedení může být jednostupňové (v reakci erytrocyty + enzym /bromelin, papain/ + sérum/plazma), nebo citlivější dvoustupňové (v reakci pouze enzymaticky upravené erytrocyty /ficin, papain/ + sérum/plazma). ET se nepovažuje za rutinní metodu pro vyšetření screeningu protilátek. [16]

Screening antierytrocytárních protilátek je důležitý, protože samotnou zkouškou kompatibility nejsou vždy detekovány všechny důležité protilátky. Např. pokud je dárce heterozygotní pro antigen, proti kterému je v séru pacienta slabá protilátka, může být reakce falešně negativní. Výhoda zkoušky kompatibility oproti screeningovému testu je v tom, že jí mohou být zjištěny protilátky proti antigenům s nízkou frekvencí (LFA), protože na diagnostických erytrocytech nejsou LFA zpravidla přítomny. [3]

V rámci předtransfuzního vyšetření lze pro vyšetření screeningu protilátek a zkoušky kompatibility použít krevní vzorek do 72 hodin od jeho odběru. Pokud ale došlo u příjemce k potransfuzní reakci, užívá se pro další předtransfuzní vyšetření vždy čerstvý vzorek. [16]

1.3.3 Zkouška kompatibility

Zkouška kompatibility (křížový pokus, zkouška slučitelnosti, test kompatibility, cross match) je reakce séra/plazmy pacienta s erytrocyty dárce, která slouží k potvrzení, že je krev příjemce slučitelná s krví dárce. [17]

Zkouška kompatibility může být vyšetřena buď serologicky (na sklíčku, ve zkumavce, sloupcovou gelovou aglutinací, metodami pevné fáze) nebo elektronicky (strategie type and screen, elektronická zkouška kompatibility). [12]

Na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s. provádíme v současné době zkoušku kompatibility serologicky, sloupcovou gelovou aglutinací (LISS/NAT). Další možnou metodou zkoušky kompatibility je enzymový test, který ale není standardním postupem a rutinně se tedy neprovádí. [9]

Pro vyšetření zkoušky kompatibility (krevní skupiny, screeningu protilátek) je požadován odběr do zkumavky s EDTA 6 ml (fialová vakueta) a vyplněná žádanka s požadavkem na objednání erytrocytárních transfuzních přípravků podepsaná lékařem, který transfuzi ordinuje (viz Příloha 1). [18] Obojí pak putuje do laboratoře krevní banky, kde je vyšetření provedeno buď manuálně nebo na automatu Techno TwinStation.

Platnost zkoušky kompatibility je nejdéle 72 hodin, počítáno od doby provedení odběru vzorku pacienta. V případě potřeby transfuze pro daného pacienta po uplynutí této lhůty je nutno provést zkoušku kompatibility z nového vzorku odebrané krve a na základě nové žádanky. Platnost zkoušky kompatibility lze prodloužit na 7 dnů u pacientů, kde nebyla prokazatelně v posledních 28 dnech podána transfuze erytrocytů a trombocytů. Tento anamnestický údaj musí být uvedený na žádance jasnou formou. [9]

1.3.4 Vyhodnocení výsledků předtransfuzního vyšetření

1. Negativní výsledek při screeningovém vyšetření antierytrocytárních protilátek a zkoušce kompatibility potvrzuje kompatibilitu přípravku. Výsledek však musí být interpretován z pohledu, který připouští existenci protilátky, která nebyla zachycena v daném testu. Pokud je podezření na hemolýzu, je vhodné provést doplňující vyšetření včetně určení PAT.
2. Pozitivní výsledek při screeningovém vyšetření antierytrocytárních protilátek a také při zkoušce kompatibility může být při přítomnosti aloprotilátek nebo autoprotilátek v séru/plazmě příjemce. Nález je nutné před podáním transfuze objasnit.
    - Přítomnost aloprotilátky: screeningové vyšetření protilátek je obvykle pozitivní, zkouška kompatibility může i nemusí být negativní. Aloprotilátku je nutné identifikovat a podle její klinické významnosti vybrat pro transfuzi antigen negativní erytrocyty (viz Příloha 6). Je důležité odlišit autoprotilátky od aloprotilátek, protože při autoprotilátkách není nezbytně nutné zjišťovat jejich specifitu na rozdíl od aloprotilátek, kdy je identifikace bezpodmínečně nutná pro výběr transfuze. K odlišení typu protilátek slouží doplňující vyšetření typu elučních a adsorpčních testů.

      Příčinou nálezu aloprotilátek u příjemce může být výjimečně také transfuze plazmy v minulosti, která obsahuje protilátku dárcovského typu, která nebyla při vyšetření dárce krve nalezena.

Principem *elučních testů* je uvolnit protilátku z vazby na povrchové antigeny erytrocytů. Používá se řada různých technik, např. změna pH, působení tepla, mrazu a jiných fyzikálních nebo chemických činidel. Lze tak dosáhnout dvojího účinku – získat erytrocyty zbavené protilátky nebo získat eluovanou protilátku, kterou lze následně prokázat a specifikovat pomocí diagnostických erytrocytů.

Adsorbce je proces, jehož cílem je navázat protilátku na předem zvolený typ erytrocytů a opakovaným vysycováním těmito krvinkami protilátku z plazmy odstranit. Metoda se obvykle používá k odlišení autoprotilátek od aloprotilátek nebo k rozlišení směsi protilátek.

- Přítomnost autoprotilátky:

  Chladové autoprotilátky vedou k problémům hlavně při vyšetření krevní skupiny, ale mohou komplikovat také screeningové vyšetření protilátek nebo zkoušku kompatibility.

  Tepelné autoprotilátky komplikují vyšetření antierytrocytárních protilátek a zkoušku kompatibility. Pozitivní bývá také PAT. Důležité je odlišit autoprotilátky od aloprotilátek, identifikovat aloprotilátky, správně určit fenotypy krevních skupin a k transfuzi vybrat vhodné erytrocyty. Zajistit kompatibilní transfuzi pro pacienty s autoprotilátkami tepelného typu bez dalších vyšetření (adsorpce a eluce) většinou nebývá možné. I protilátky proti různým lékům nebo aditivům obsaženým v reagenciích mohou být příčinou pozitivní reakce při screeningovém vyšetření protilátek.

3. Negativní výsledek při screeningovém vyšetření protilátek a pozitivní výsledek zkoušky kompatibility může být způsobený klinicky významnými protilátkami v séru/plazmě příjemce:
   - protilátky proti antigenům s nízkou frekvencí výskytu
   - imunoglobuliny vázané na erytrocyty transfuzního přípravku (je vhodné provést PAT s dárcovskými erytrocyty)
   - chybu při výběru erytrocytového transfuzního přípravku s inkompatibilní krevní skupinou AB0

- protilátky proti leukocytům
- některé anti-A1 protilátky mohou reagovat při 37 °C a k transfuzi je nutné použít erytrocyty krevní skupiny A2

4. Pozitivní výsledek při screeningovém vyšetření protilátek a negativní výsledek zkoušky kompatibility. Příčinou může být u příjemce protilátka anti-H, kterou zachytí diagnostické erytrocyty krevní skupiny 0, avšak nereaguje s erytrocyty A1. Protilátky nemívají klinický význam. Také slabě exprimované antigeny na erytrocytech dárce nemusí zkouška kompatibility zachytit přesto, že protilátka u příjemce byla zjištěna. [8, 9]

1.3.5 Denní kontroly kvality

Každá laboratoř musí mít stanovený systém vnitřní kontroly, který zahrnuje denní kontrolu reagencií, vizuální kontrolu používaných reagencií a materiálů, kontrolu laboratorních zařízení.

Na TRS Nemocnice České Budějovice, a. s. se denní kontroly kvality řídí Doporučením Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP (viz Příloha 2). [16]

1.3.6 Komplikace transfuzí

Nežádoucí účinky po podání krevní transfuze jsou nazývány nežádoucími reakcemi. Nežádoucí reakce se v závislosti na charakteru a rozsahu klinických projevů dělí na závažné a ostatní, ve vztahu k časové souvislosti s podáním transfuze se dělí na reakce akutní a pozdní. Klinické projevy akutní reakce se objevují do 24 hodin od aplikace transfuze. Nově je za akutní reakci považován výskyt projevů do 6 hodin od podání transfuze. Pozdní reakce se mohou objevit po několika dnech, týdnech i měsících. Nejčastějšími klinickými projevy nežádoucích reakcí bývá horečka, třesavka a kopřivka. Při zjišťování příčiny potransfuzních reakcí musí být priorita věnována odhalení případné intravaskulární hemolýzy. [8]

Klinicky nejzávažnějším typem potransfuzní reakce je *hemolytická potransfuzní reakce* (HTR). HTR lze klasifikovat podle rychlosti nástupu na akutní (časnou), která se objevuje do 24 hodin od počátku podání transfuze a pozdní, která se objevuje obvykle 5 až 7 dnů po transfuzi. Podle převládajícího místa destrukce rozlišujeme HTR intravaskulární, která je charakterizována velkou hemoglobinurií a hemoglobinémií a HTR extravaskulární, která je charakterizována poklesem hemoglobinu. Akutní HTR se obvykle pojí s intravaskulární destrukcí erytrocytů a pozdní HTR se obvykle pojí s extravaskulární destrukcí erytrocytů.

Patofyziologie HTR má tři fáze. Protilátky se váží na erytrocytární antigeny a mohou vést k částečné nebo úplné aktivaci komplementu, což může vést k lýze krvinky. Senzibilizované erytrocyty interagují s aktivovanými fagocyty a dochází k produkci mediátorů zánětu. Průběh reakce závisí na třídě a podtřídě protilátky a její schopnosti aktivovat komplement. IgM protilátky často aktivují komplement a vedou k akutní lýze krvinek. Podtřídy protilátek IgG mají rozdílnou schopnost vázat komplement: IgG3>IgG1>IgG2>IgG4. Průběh reakce dále závisí na množství protilátky v plazmě, teplotním optimu protilátky, počtu a hustotě vazebných míst na erytrocytech a na množství transfundovaných erytrocytů.

Akutní HTR vzniká nejčastěji po podání AB0 inkompatibilní transfuze s četností přibližně 1:30 000 transfundovaných jednotek. Chyby, které vedou k podání inkompatibilního transfuzního přípravku, vznikají na klinickém oddělení (chybné údaje na vzorku, chybná identifikace pacienta, nesprávně provedený nebo odečtený bed side test, chybná volba transfuzního přípravku v urgentní situaci), v laboratoři (špatně značená sekundární zkumavka, špatně interpretovaný výsledek, špatně zapsaný výsledek) a rovněž v zařízení transfuzní služby (chyby vedoucí k špatnému označení transfuzního přípravku).

Klinické příznaky akutní HTR se mohou projevit již po podání 20 ml AB0 inkompatibilní krve a mohou to být:

- horečka, třesavka
- bolest v místě vpichu, v břiše, v zádech
- hypotenze, tachykardie

- úzkost, neklid
- nauzea, zvracení
- dušnost
- zarudnutí

U pacientů v bezvědomí může být prvním příznakem HTR výrazný pokles tlaku nebo neztišitelné krvácení z operační rány a rozvoj disseminované intravaskulární koagulopatie.

K HTR z poškození transfuzního přípravku může dojít z následujících příčin:

- bakteriální kontaminace
- nadměrné zahřátí transfuzního přípravku nebo jeho poškození chladem
- přidávání léků nebo roztoků do transfuzního přípravku
- mechanické poškození erytrocytového transfuzního přípravku

Pozdní HTR vzniká obvykle jako důsledek sekundární imunitní odpovědi po opětovném podání erytrocytů s příslušným antigenem příjemci, který byl primárně imunizován těhotenstvím nebo dřívější transfuzí. Objevuje se zhruba 5 až 10 dnů po transfuzi. Mezi klinické projevy pozdní HTR patří horečka, event. žloutenka. Laboratorně může být zjištěn pokles hemoglobinu a hemoglobinurie. Často ale probíhá bez zřetelných klinických příznaků a laboratorně je zjištěna pouze pozitivita PAT.

Pozdní HTR po orgánové transplantaci je způsobena B-lymfocyty, které přejdou z dárcovského orgánu do krevního oběhu příjemce a mohou vést k paměťové odpovědi a tvorbě protilátek proti erytrocytárním antigenům příjemce. Obvykle jsou namířeny proti antigenům AB0 a Rh systému. Hemolýza se objevuje za 7 až 10 dnů po transplantaci (ledviny, srdce, plíce) a vymizí zhruba za měsíc. [12]

1.4 Metody zkoušky kompatibility

1.4.1 Sklíčkové a zkumavkové metody

Zkouška kompatibility na sklíčku v solném prostředí – připraví se 10 % suspenze erytrocytů dárce a příjemce v PBS (pufrovaný fyziologický roztok pH 6,98) a na jednom sklíčku se smíchá sérum příjemce se suspenzí krvinek dárce a na druhém sklíčku se smíchá sérum dárce se suspenzí krvinek příjemce. Po dobu nejméně 5 minut se sklíčky kývavě pohybuje, případná aglutinace se odečítá nejprve makroskopicky a poté mikroskopicky. [19]

Zkouška kompatibility ve zkumavce se prováděla stejným způsobem jako na sklíčku, sérum příjemce se „křížilo“ se suspenzí krvinek dárce a sérum dárce se suspenzí krvinek příjemce. Navíc ale kromě solného prostředí PBS se jako další test používalo koloidní prostředí a metoda nepřímého antiglobulinového testu (NAT). [20] Koloidní prostředí představovalo směs 20 % albuminu s AB sérem v poměru 1:1 [21], přínos tohoto testu spočíval v tom, že u některých pacientů byl jedinou metodou, kterou bylo možno prokázat inkompletní protilátky. [19] V případě NAT je třeba erytrocyty dárce 3x proprat v PBS, potom z nich připravit 3 - 5 % suspenzi v PBS a do zkumavky kápnout 2 kapky suspenze erytrocytů dárce a 2 kapky séra příjemce. Zkumavka se nechá inkubovat 60 minut při 37 °C v termostatu. Po uplynutí doby inkubace se zkumavka opět 3x propere v PBS a poté se přidá kapka AHG séra (sérum obsahuje protilátky proti lidským sérovým globulinům, které se připojí na IgG molekuly navázané na erytrocytech, čímž vytvoří přemostění a aglutinaci erytrocytů), po centrifugaci se odečítá aglutinace erytrocytů – nejdříve makroskopicky, poté mikroskopicky. [22] Pro hodnocení aglutinací ve zkumavce je zavedený systém pro stanovení síly reakce, a to pro makroskopické i mikroskopické odečítání. [4]

V NAT se prováděly navíc tzv. „mezikřižáky“ (např. při počtu 3 krevních konzerv se postupovalo tak, že sérum z první konzervy se „křížilo“ s krvinkami druhé a třetí konzervy. Sérum z druhé konzervy se „křížilo“ s krvinkami třetí konzervy, apod.).

V 80. letech 20. století je u vyšetření zkoušky kompatibility upuštěno od reakce séra dárce s krvinkami příjemce a tím pádem i od mezikřižáků.

1.4.2 Testy na mikrotitrační destičce

Jedná se pouze o modifikaci zkumavkových testů, s použitím metody NAT. Mikrotitrační destička obsahuje 96 jamek ve tvaru U. Do nich se napipetuje 25 µl séra pacienta a 50 µl 3 % suspenze erytrocytů dárce v PBS, poté se destička nechá inkubovat 60 minut při teplotě 37 °C. Po proběhlé inkubaci se destička 3x propere v PBS a následně se přidá 25 µl AHG séra, centrifuguje se a odečte se aglutinace makroskopicky, eventuálně pomocí readeru. [2]

1.4.3 Sloupcové metody

Koncem 80. let 20. století byla vyvinuta první generace sloupcových testů, které byly založeny na metodě NAT. Nazýváme je sloupcovou nebo také gelovou aglutinační metodou. Při této metodě musí být vyšetřované erytrocyty resuspendovány v LISS (solný roztok s nízkou iontovou koncentrací, díky kterému se mohou molekuly protilátek silněji vázat k antigenům erytrocytů) – iontová koncentrace je velmi kritická, proto je nutné používat správná množství LISS a séra. Aglutinace senzibilizovaných erytrocytů resuspendovaných v LISS je docílena v gelovém sloupci pomocí antiglobulinového séra, které musí mít anti-IgG a anti-C3 aktivitu. Erytrocyty a sérum se inkubují v inkubační části na povrchu gelu (viz Příloha 3), po inkubaci se sloupec centrifuguje, což způsobí prostup erytrocytů gelem, který má funkci síta. Senzibilizované erytrocyty aglutinují následkem reakce s antiglobulinovým sérem, které je v gelu přítomno, a tyto aglutináty zůstávají po centrifugaci v gelovém materiálu. Erytrocyty, které nejsou senzibilizovány, nereagují s antiglobulinovým sérem v gelu a prostupují jím na dno sloupce. Pomocí centrifugace jsou erytrocyty odděleny od séra a tím od nenavázaných protilátek, které zůstávají v inkubační části sloupce.

Z tohoto důvodu není nutné promývání erytrocytů po jejich inkubaci se sérem ve sloupci, díky čemuž je tento test časově méně náročný.

Ve všech sloupcově aglutinačních systémech jsou mikrosloupce upevněny na malých praktických kartách. Každá karta obsahuje 6 – 8 mikrozkumavek. [3, 23]

Sloupcový test druhé generace není založen na aglutinaci senzibilizovaných erytrocytů, ale na přímé vazbě senzibilizovaných erytrocytů na gelovou matrix uvnitř sloupce. Tento testovací systém je označován jako sloupcová nebo gelová afinitní metoda. Imunoafinitní gelový sloupec obsahuje aktivní, imunoreaktivní fázi v médiu s vysokou hustotou. Senzibilizované erytrocyty jsou fixovány přímo na aktivní fázi ve sloupci. Tato imunoreaktivní fáze obsahuje protein G nebo protein G a protein A, anti-IgM protilátku a anti-C3d složku fixovanou na gelovou matrix. Protein G je bílkovina izolovaná z buněčné stěny Streptokoka, která se váže s vysokou afinitou k lidskému IgG. Senzibilizované erytrocyty zůstanou ve vrchní části sloupce, zatímco všechny nesenzibilizované erytrocyty migrují během centrifugace směrem ke dnu sloupce. [3]

Odečítání výsledků reakcí v testech sloupcové aglutinace má standardizovaný způsob hodnocení (viz Příloha 4) od 4+ reakce jako nejsilnější, přes reakce typu dvojí populace, kdy nacházíme směs antigenně odlišných typů erytrocytů, až k negativní reakci (viz Příloha 5). [4]

Metoda sloupcové aglutinace přinesla několik výhod:

- rychlá metoda
- menší spotřeba reagencií i vzorku
- není potřeba promývat senzibilizované erytrocyty
- zvýšení citlivosti
- standardizace
- možnost automatizace
- dokumentace – výsledky mohou být dobře interpretovány i později a mohou být odečítány pomocí readeru [3]

1.4.4 Metody pevné fáze

SPRCA (Solid Phase Red Cell Adherence) je technika, kdy jedna z komponent reakce antigen-protilátka je vázána na pevném nosiči, a po proběhnutí reakce s volným antigenem/protilátkou je ukončení této reakce signalizováno pomocí erytrocytů, které mohou být buď součástí reakce antigen-protilátka, nebo mohou být přidány jako indikátor buněk. Tuto metodu lze modifikovat a využít k různým serologickým testům, včetně zkoušky kompatibility. [24]

SPRCA vhodná pro zkoušku kompatibility je založená na metodě NAT, AHG sérum tedy musí mít anti-IgG a anti-C3 aktivitu. Tento test je prováděn na mikrotitračních destičkách nebo na jednotlivých stripech. Dna jednotlivých „U“ jamek jsou pokryta antiglobulinovým sérem. Do jamek je přidána vyšetřovaná plazma a dárcovské erytrocyty. Po inkubační fázi při 37 °C a následné centrifugaci buď krvinky adherují na dno jako homogenní zabarvená vrstva (pozitivní reakce), nebo sedimentují na hlubší střední část dna a vytváří tmavý ostře ohraničený terčík (negativní reakce). [3, 8, 25]

1.4.5 Type and screen

Tato strategie zahrnuje tři testy, které společně zaručují spolehlivou analýzu kompatibility transfuzního přípravku. Jsou to:

1. Určení AB0 krevní skupiny a RhD antigenu jak u příjemce, tak u dárce.
2. Testování, zda jsou v séru příjemce přítomny nepravidelné erytrocytární protilátky proti erytrocytům dárce.
3. Kontrola AB0 kompatibility. Tento test může být proveden dvěma způsoby:
    - křížovým pokusem mezi sérem příjemce a erytrocyty dárce v solném roztoku při pokojové teplotě, bez antiglobulinové fáze
    - AB0 typování erytrocytů jak příjemce, tak dárce pomocí monoklonálních anti-A a anti-B reagencií

Je důležité, aby byly vždy provedeny všechny tři testy. Tato strategie byla jako první použita v holandských nemocnicích. [3]

1.4.6 Elektronická zkouška kompatibility (EKP)

Tuto praxi mohou používat pracoviště s validovaným informačním systémem a s vedenými záznamy o vyšetřeních příjemce i dárce. Spočívá v tom, že výběr krve pro transfuzi provede počítač. Podmínkou pro použití této metody je, aby u příjemce nebyly nalezeny nepravidelné protilátky proti erytrocytům a aby souhlasila krevní skupina příjemce i dárce. Bezpečnost procesu je dále podmíněna tím, že musí být k dispozici záznamy o dřívějších imunohematologických vyšetřeních a aktuální vyšetření s nimi musí souhlasit. Vše kontroluje validovaný informační systém, který při rozporech neumožní výdej přípravku. [8]

Nejdelší zkušenosti s EKP má Fakultní nemocnice v Uppsale, která tuto metodu používá již od roku 1983, díky čemuž mají propracovaný celý systém, který je navíc plně v souladu s místními Národními pokyny (National Guides). [26]

V roce 2001 v Holandsku proběhla studie na téma používání validovaného informačního systému pro EKP. Do 30 zemí/center byl odeslán dotazník, zda a jakým způsobem používají validovaný informační systém pro EKP. Odpověď přišla od 17 z nich. Bylo zjištěno, že tento validovaný informační systém se používá pouze v ≈ 50 % zemí/center, od nichž byly získány odpovědi, a pouze v jedné zemi (Švédsko) se používá plošně. V ostatních zemích, ačkoli zde jsou také oficiální požadavky pro jeho použití, je validovaný informační systém použit pouze v části center nebo nemocnic. V některých zemích/centrech, kde dosud použit není, se s jeho použitím počítá v blízké budoucnosti. Ve všech zemích/centrech se EKP nepoužívá v případech, kdy jsou v séru/plazmě příjemce nalezeny antierytrocytární protilátky nebo byly zjištěny již dříve. Dva shodné výsledky krevní skupiny jsou všeobecně nutné s výjimkou případů za určitých okolností v Nemocnici Bronovo, Oddělení klinické chemie a hematologie v Nizozemí. Ve Velké Británii a většině laboratoří Nizozemí se vyžaduje automatizované vyšetření krevní skupiny a screeningu antierytrocytárních

protilátek. Kromě toho musí automatizovaný systém zahrnovat pozitivní identifikaci vzorku (čárovými kódy) a elektronický přenos dat do LIS. Souhrnem lze říci, že validovaný informační systém není všeobecně používán, ačkoli se očekává nárůst jeho použití. Požadavky pro používání EKP jsou poměrně standardizované, s výjimkou požadavku na používání automatizovaného vyšetření krevní skupiny a screeningu antierytrocytárních protilátek. [27]

V ČR mají zkušenosti s elektronickou zkouškou kompatibility v ÚVN Praha.

1.4.7 Automatizace

Zatímco zkumavkové metody lze provádět výhradně manuálně, u ostatních metod je možné využít prvky automatizace, která výrazně omezuje vznik chyby lidského faktoru, jež je nejčastější příčinou potransfuzní mortality a morbidity. [28]

Použití zcela automatizovaných systémů je nejúčinnější strategie pro dosažení dvou hlavních cílů v oblasti imunohematologie:

1. Snížení potransfuzního rizika spojeného s lidskou chybou (identifikace vzorku, výběr správného činidla, provedení testu, interpretace výsledků a zápis dat do LIS).
2. Musí být zajištěna sledovatelnost (dohledatelnost) všech prvků zapojených do analytického procesu, které mohou být archivovány a zůstanou přístupné po provedení testů. [29]

Rozhodnutí o pořízení automatizovaného systému na pracoviště transfuzní služby závisí na typu konkrétního pracoviště, typu poskytovaných služeb, provozních nákladech, prostorové dostupnosti, personální kompetenci a službách prodejce. Pracoviště transfuzní služby s nižší pracovní zátěží mohou často preferovat poloautomatizované systémy spíše než plně automatizované. Hlavními problémy poloautomatizovaných systémů jsou nižší úroveň bezpečnostních prvků než jsou k dispozici u plně automatizovaných systémů a rozsah lidských chyb v důsledku manuálních kroků jako je označování vzorků, ředění, doplňování činidel a interpretace výsledků. Nepropojení poloautomatizovaných systémů s LIS v některých zařízeních může vést k dalším chybám při manuálním přepisu dat.

S ohledem na výše uvedená fakta, poloautomatizované systémy mohou být vhodné pro malá pracoviště transfuzní služby, nicméně pro pracoviště s vysokou pracovní zátěží, je plně automatizovaný systém vždy lepší volba. [30]

2 Cíl práce

1. Literární shrnutí dřívějších a současných metod, porovnání jejich výhod a nevýhod, význam pro klinickou praxi.
2. Praktické osvojení principů zkoušky slučitelnosti pomocí metod sloupcové aglutinace.
3. Vyhodnocení získaných výsledků metody sloupcové aglutinace prováděné manuálně a na automatu Techno, porovnání provozně-ekonomického hlediska.
4. Diskuze získaných dat.

3 Metodika

3.1 Charakteristika souboru

Praktická část bakalářské práce byla vypracována na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s. v období 19. 4. - 21. 5. 2012. Během sledovaného období bylo vyšetřeno 52 vzorků s požadavkem zkoušky kompatibility, celkem 118 testů. Každý vzorek byl vyšetřen jednak manuální metodou a jednak na automatu Techno TwinStation.

3.2 Preanalytická část

Preanalytická část byla provedena v souladu s Doporučením Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP. [9, 16]

3.3 Analytická část

3.3.1 Spotřební materiál, reagencie, přístroje a technické vybavení

- Aglutinační a Wassermannovy zkumavky
- Stojánky na zkumavky
- Jednorázové 3 ml pipety
- Špičky k pipetám
- Rukavice
- Buničitá vata
- ID karty LISS/Coombs kombinované s AHG polyspec. DiaMed/Bio-Rad
- ID Dilunet 2 (modifikovaný LISS) – DiaMed/Bio-Rad
- Promývací roztok A (Wash solution) - DiaMed/Bio-Rad
- Promývací roztok B (Wash solution) - DiaMed/Bio-Rad

- Laboratorní centrifuga na centrifugaci zkumavek
- Centrifuga DiaMed/Bio-Rad ID 1202
- Inkubátor DiaMed/Bio-Rad DG 223
- Stojan na zkumavky a ID karty DiaMed/Bio-Rad
- ID pipetor FP-2, FP-3, FP-4, EP-5
- Zásobník s rozplňovačem na ID Diluent 2
- Imunohematologické zařízení Techno TwinStation
- PC [18, 31]

3.3.2 Příprava materiálu

Zkumavka se vzorkem pacienta se centrifuguje 5 minut při 5000 otáčkách/min., aby se oddělila krevní plazma od krvinek.

Jako vzorek dárce se použije zkumavka s CPD-A, která je uložena u vaku transfuzního přípravku nebo segment pevně spojený s vakem. [10, 18]

3.3.3 Manuální provedení

Vyšetření zkoušky kompatibility se standardně provádí metodu LISS/NAT.

K vyšetření se používají reagencie od firmy DiaMed/Bio-Rad. Vlastní postup vyšetření: z krevního vzorku konzervy dárce připravíme 1 % suspenzi v ID Diluentu 2. Použijeme ID karty LISS/Coombs kombinované s AHG polyspec. Vyznačíme jméno pacienta, čísla krevních konzerv. Do každé mikrozkumavky kápneme 50 µl 1 % suspenze erytrocytů v ID Diluentu 2 + 25 µl plazmy pacienta. ID karty inkubujeme 15 minut při 37 °C v inkubátoru DiaMed/Bio-Rad DG-223, centrifugujeme v centrifuze DiaMed/Bio-Rad ID 1202 10 minut při 905 otáčkách/min. Poté odečteme případnou aglutinaci.

Hodnocení reakcí:

- Pozitivní – aglutinované erytrocyty vytváření na povrchu gelu linku nebo jsou rozptýleny v gelu (reakce + až ++++, v některých případech +/- nebo stopové reakce)
- Negativní – kompaktní sediment erytrocytů na dně gelové zkumavky [10, 18, 31]

3.3.4 Automatizace

V laboratoři krevní banky se začal automatický imunohematologický systém firmy DiaMed/Bio-Rad – automat Techno TwinStation s řídícím softwarem Maestro (viz Příloha 6) testovat v roce 2006. To přineslo potřebu pracovat s nesrážlivou krví (od pacientů – vakuety s EDTA, od dárců – vakuety s CPD-A).

Imunohematologický analyzátor Techno TwinStation zahrnuje plně pozitivní identifikaci primárních zkumavek, reagencií a ID karet čárovými kódy, kontrolu dávkování séra nebo plazmy, elektronickou detekci úrovně hladiny vzorků reagencií a diluentů, detekci promývacích roztoků a odpadu pomocí plováků, detekce sraženiny při nasávání erytrocytů, nasávání a promytí fluidního obvodu. Zároveň probíhá automatická kontrola parametrů testů (objemy, teplota, čas), čísla šarží a dat exspirací reagencií.

Techno TwinStation se skládá ze vzorkového karuselu s kapacitou 36 vzorků, z karuselu pro reagencie s kapacitou až 24 reagencií, 2 pipetovacích jehel a 2 centrifug s inkubátory na sobě navzájem nezávislými. Dále jsou k dispozici 2 obvody pro diluenty a roztoky k promývání (Wash Solution A a B). Techno TwinStation pracuje výhradně s reagenciemi firmy DiaMed/Bio-Rad.

Vlastní postup vyšetření: do LIS zadáme požadavky pro vyšetření zkoušky kompatibility a poté požadavek odešleme do softwaru Maestro. Do vzorkového karuselu umístíme jednotlivé vzorky od dárce a příjemce v libovolném pořadí čárovým kódem do výřezu, do centrifug umístíme ID karty a spustíme vyšetření na analyzátoru tlačítkem START. Všechny operace jsou ovládány pomocí dotykového monitoru.

Vyšetření proběhne automaticky, na obrazovce se zobrazí jednotlivé úkony a orientační časový údaj ukončení práce v jednotlivých částech přístroje (identifikace pomocí čárových kódů, příprava 0,8 % náplavů erytrocytů dárce v ID Dileuntu 2, pipetování, inkubace, centrifugace, fotometrické odečtení výsledků a jejich interpretace). Zjištěné výsledky validujeme a provedeme export dat do LIS. [18, 31]

Hlavními výhodami analyzátoru jsou:

- Jednoduchá obsluha
- Přátelský software
- Spolehlivost
- Validní výsledky
- Cena jeho provozu je adekvátní vůči spektru vyšetření, která provádí

3.4 Postanalytická část

Postanalytická část byla provedena v souladu s Laboratorní příručkou Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s. [10]

4 Výsledky

4.1 Porovnání jednotlivých metod zkoušky kompatibility

Tab. 2: Literární srovnání metod zkoušky kompatibility 1

Serologické testy – dle provedení	**Výhody**	**Nevýhody**
Sklíčkové metody	Rychlá, levná metoda, použití plné krve	Málo citlivá metoda, nespecifické reakce, nutné mikroskopické odečtení, horší manipulace se sklíčky
Zkumavkové metody	Levná metoda, stále považována za zlatý standard imunohematologie, není potřeba speciálních pomůcek a reagencií (polo/automatické pipety, inkubátor a centrifuga, ředící roztok na suspenzi erytrocytů)	Použití suspenze erytrocytů – variabilita koncentrací; nesprávný poměr erytrocytů a séra/plazmy, vymývání protilátek s nízkou afinitou v průběhu promývání, nespecifické reakce, nutné mikroskopické odečtení, horší manipulace se zkumavkami, delší čas potřebný k vyšetření
Testy na mikrotitrační destičce	Citlivější než zkumavková metoda, dávkování reagencií pipetou – dodržení poměru erytrocytů a séra/plazmy	Potřeba mikrotitračních destiček, vícekanálové pipety k promývání, centrifugy na mikrotitrační destičky, polo/automatické pipety; použití suspenze erytrocytů – variabilita koncentrací; vymývání protilátek s nízkou afinitou v průběhu promývání, nespecifické reakce, delší čas potřebný k vyšetření
Sloupcové gelové metody	Rychlá metoda, menší spotřeba reagencií i vzorku, není potřeba promývat senzibilizované erytrocyty, zvýšení citlivosti,	Použití suspenze erytrocytů – variabilita koncentrací, potřeba speciálních pomůcek a reagencií

Serologické testy – dle provedení	Výhody	Nevýhody
	standardizace, možnost automatizace, dokumentace – výsledky mohou být dobře interpretovány i později a mohou být odečítány pomocí readeru	(polo/automatické pipety, inkubátor a centrifuga, diagnostické karty, ředící roztok na suspenzi erytrocytů), dražší metoda
Metody pevné fáze	Rychlá metoda, menší spotřeba reagencií i vzorku, není potřeba promývat senzibilizované erytrocyty, zvýšení citlivosti, standardizace, možnost automatizace, dokumentace	Použití suspenze erytrocytů – variabilita koncentrací, potřeba speciálních pomůcek a reagencií (polo/automatické pipety, inkubátor a centrifuga, ředící roztok na suspenzi erytrocytů, mikrotitrační destičky s navázaným AHG sérem), dražší metoda

Zdroj: Autor

Tab. 3: Literární srovnání metod zkoušky kompatibility 2

Serologické testy – dle metody	Výhody	Nevýhody
Solný test	Nejlehčí a nejlevnější metoda, odhalí inkompatibilitu v AB0 systému, zkumavky se po nakapání reagencií mohou ihned centrifugovat, event. inkubovat při dané teplotě dle typu vyšetření	Malá citlivost, ovlivnění výsledků přítomností chladových protilátek u některých pacientů, k vyšetření zkoušky kompatibility se dnes již nepoužívá
Koloidní prostředí	Albuminové molekuly nahradí pozitivně nabité molekuly vody, dojde k poklesu zeta potenciálu a zmenší se vzdálenost mezi erytrocyty, což vede k přiblížení erytrocytů mezi sebou a usnadnění aglutinace	Malá citlivost, ovlivnění výsledků přítomností chladových protilátek a protilátek proti albuminu u některých pacientů, k vyšetření zkoušky kompatibility se dnes již nepoužívá

Serologické testy – dle metody	Výhody	Nevýhody
NAT	AHG sérum se připojuje na IgG molekuly navázané na erytrocytech, vytvoří přemostění mezi nimi a tím zesílí aglutinaci erytrocytů,	Anti-C3 složka AHG séra zachytí také protilátky klinicky nevýznamné, např. chladového typu
Enzymatický test	Vlivem enzymu dochází k zesílení reaktivity některých protilátek (v systému Rh, Kidd, Lewis)	U některých krevních skupin může dojít vlivem enzymu k deterioraci antigenů a ke snížení jejich reaktivity (M, Duffy), k vyšetření zkoušky kompatibility se standardně nepoužívá

Zdroj: Autor

4.2 Porovnání provedení metody sloupcové gelové aglutinace

Tab. 4: Porovnání provedení metody sloupcové gelové aglutinace

Sloupcová gelová aglutinace	Manuální provedení	Techno TwinStation
Jednotlivé kroky vyšetření	• příprava 1 % náplavu erytrocytů dárce v ID Diluentu 2 • popsání diagnostických karet údaji a odtržení fólií • pipetování (50 µl náplavu erytrocytů dárce + 25 µl séra/plazmy pacienta) • transport do termostatu • transport do centrifugy • odečtení aglutinace • zapsání výsledků do laboratorní knihy a LIS	• načtení čárových kódů vzorků, reagencií a diagnostických karet • perforace diagnostických karet • vlastní příprava 0,8 % náplavu erytrocytů dárce v ID Diluentu 2 • pipetování, inkubace, centrifugace • fotometrické odečtení aglutinace • převod výsledků do LIS
Výhody	Kratší čas vyšetření (30 - 45 min) – vhodná metoda pro statimová vyšetření	Značně omezuje riziko vzniku chyb lidského faktoru, jednoduchá obsluha, úspora jednoho pracovního místa v laboratoři

Sloupcová gelová aglutinace	Manuální provedení	Techno TwinStation
Nevýhody	Možnost vzniku chyb lidského faktoru; manuální transport napipetovaných ID karet do termostatu a centrifugy, měření času inkubace, není primární zápis výsledků – laborant/ka musí provést zápis do laboratorní knihy	Delší čas vyšetření (45 – 60 min) – vhodná metoda pro rutinní vyšetření, nelze v průběhu pipetování přidávat další vzorky (v případě automatu Techno TwinStation)

Zdroj: Autor

4.3 Získané výsledky metody sloupcové aglutinace

Tab. 5: Souhrn výsledků metody sloupcové aglutinace při manuálním a automatizovaném provedení

Test	Číslo pacienta	Číslo TP	Manuální metoda DiaMed/Bio-Rad	Techno TwinStation DiaMed/Bio-Rad	Výsledek	Převod do LIS
KP	xx106355	xx003573	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003008	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106354	xx200390	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004286	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106394	xx003518	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106395	xx003745	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx200358	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003740	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106397	xx200360	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003556	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003653	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106333	xx003595	negativní	negativní	kompatibilní	OK

Test	Číslo pacienta	Číslo TP	Manuální metoda DiaMed/Bio-Rad	Techno TwinStation DiaMed/Bio-Rad	Výsledek	Převod do LIS
KP	xx106335	xx002950	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003032	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106340	xx003603	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106339	xx003594	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106302	xx003121	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx002986	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003088	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106301	xx003737	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003997	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx200397	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004057	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106283	xx200412	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx200398	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx200413	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106357	xx004247	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004287	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106348	xx200374	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003884	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106485	xx004525	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004527	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004526	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004531	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106476	xx003691	negativní	negativní	kompatibilní	OK

Test	Číslo pacienta	Číslo TP	Manuální metoda DiaMed/Bio-Rad	Techno TwinStation DiaMed/Bio-Rad	Výsledek	Převod do LIS
		xx003716	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003635	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003631	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106609	xx200412	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx200398	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx200413	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106641	xx003653	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106610	xx003556	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003823	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106608	xx004136	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004142	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004222	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004231	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106620	xx004464	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004254	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004370	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106636	xx004280	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004420	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004321	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004250	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004305	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106635	xx003357	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003342	negativní	negativní	kompatibilní	OK

Test	Číslo pacienta	Číslo TP	Manuální metoda DiaMed/Bio-Rad	Techno TwinStation DiaMed/Bio-Rad	Výsledek	Převod do LIS
KP	xx106638	xx004273	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106640	xx003874	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106639	xx003603	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106644	xx003518	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003444	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106689	xx004343	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004339	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106688	xx004631	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004619	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106745	xx004719	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004707	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106746	xx003546	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003616	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106783	xx200336	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003868	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003920	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106784	xx004524	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004522	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004532	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106785	xx003931	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003973	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx003878	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx106786	xx200308	negativní	negativní	kompatibilní	OK

Test	Číslo pacienta	Číslo TP	Manuální metoda DiaMed/Bio-Rad	Techno TwinStation DiaMed/Bio-Rad	Výsledek	Převod do LIS
KP	xx107604	xx005032	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx005056	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx005064	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx107605	xx005044	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx005039	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx107608	xx004952	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004950	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx107603	xx004035	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004109	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx107607	xx005195	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx005163	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx107610	xx005127	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx005082	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx005238	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx107611	xx004762	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx107680	xx005023	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx107676	xx004543	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004497	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004458	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004475	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx200438	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx107674	xx004506	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004604	negativní	negativní	kompatibilní	OK

Test	Číslo pacienta	Číslo TP	Manuální metoda DiaMed/Bio-Rad	Techno TwinStation DiaMed/Bio-Rad	Výsledek	Převod do LIS
KP	xx107694	xx004748	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004743	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx107696	xx004731	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004737	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx004735	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx108004	xx005587	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx005688	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx107697	xx004972	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx108003	xx005597	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx005600	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx108002	xx005457	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx005524	negativní	negativní	kompatibilní	OK
KP	xx108001	xx005215	negativní	negativní	kompatibilní	OK
		xx005161	negativní	negativní	kompatibilní	OK

Zdroj: Autor

4.4 Porovnání provozně-ekonomického hlediska metody sloupcové gelové aglutinace (LISS/NAT) zpracované manuálně a na automatu Techno TwinStation

Cenu vyšetření jedné zkoušky kompatibility jsem spočítala orientačně z nákladů na reagencie a spotřební materiál, obecně se počítá s 10 % ztrátou reagencií. Do konečné hodnoty nebyla započtena práce zdravotnického personálu, elektrická energie, náklady na mytí laboratorního nádobí a promývání automatu promývacími roztoky. Byl použit ceník k 31.12.2012.

K manuálnímu vyšetření je třeba 0,5 ml ID Diluentu 2, 1 ks jednorázové 3 ml pipety, 2 ks špiček k pipetám, 1 jamka z ID karty LISS/Coombs kombinované s AHG polyspec.

K automatickému vyšetření je třeba 1 ml ID Diluentu 2, 1 jamka z ID karty LISS/Coombs kombinované s AHG polyspec.

Tab. 6: Cena vyšetření jedné zkoušky kompatibility

Sloupcová gelová aglutinace (LISS/NAT)	**Manuální provedení**	**Techno TwinStation**
Cena/ 1 KP	24,35 ≈ 24 Kč	25,69 ≈ 26 Kč

Zdroj: Autor

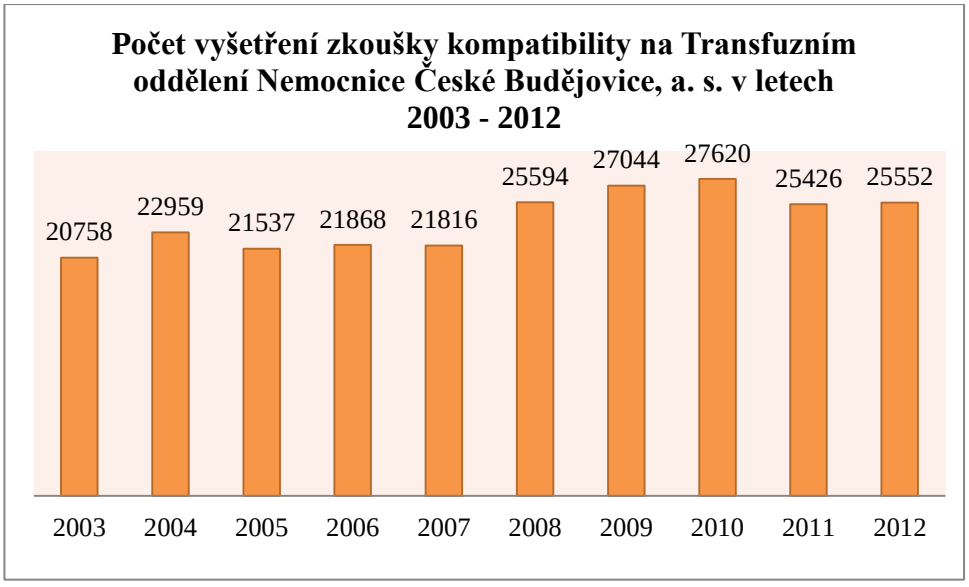
4.5 Zkouška kompatibility na TRS Nemocnice České Budějovice, a. s.

Tab. 7: Počet vyšetření zkoušky kompatibility na TRS 2003 - 2012

Rok	Počet vyšetření zkoušky kompatibility
2003	20758
2004	22959
2005	21537
2006	21868
2007	21816
2008	25594
2009	27044
2010	27620
2011	25426
2012	25552

Zdroj: LIS Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s.

Graf 1: Počet vyšetření zkoušky kompatibility na TRS 2003 - 2012



Zdroj: Autor

5 Diskuze

V bakalářské práci jsem se zabývala vyšetřením zkoušky kompatibility erytrocytárních transfuzních přípravků. Metody pro toto vyšetření musí zachytit AB0 inkompatibilitu transfuzního přípravku a přítomnost klinicky významných protilátek v séru/plazmě příjemce krevní transfuze. Porovnávala jsem různé metody vyšetření, jejich výhody a nevýhody. Tyto údaje jsem zpracovala do tabulek, které jsou součástí mé bakalářské práce.

Různá pracoviště transfuzní služby se vzájemně liší v používaných metodách provedení zkoušky kompatibility. Tímto tématem se zabývala studie v Severní Americe v letech 2005 – 2010. Data byla analyzována Microsoft (Redmond, Washington) Excel software. Výsledky ukázaly, že v laboratořích Severní Ameriky je pro vyšetření zkoušky kompatibility používání zkumavkových a gelových metod rovnoměrně rozložené, ale stále častěji se přechází od zkumavkových testů k těm gelovým. [32]

Literárním porovnáním metod zkoušky kompatibility jsem dospěla k závěru, že nejcitlivější metodou používanou k vyšetření zkoušky kompatibility je nepřímý antiglobulinový test (NAT) provedený sloupcovou gelovou aglutinací nebo metodami pevné fáze. Moje zjištění odpovídá Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP - metoda LISS/NAT považována za referenční techniku a hranice citlivosti LISS/NAT brána jako standardní nepodkročitelné minimum a na základě dlouhodobých výsledků externí kontroly kvality je zřejmé, že lepších výsledků dosahují robustnější metodiky sloupcové aglutinace a pevné fáze a tudíž by měly být preferovány. [9, 16]

Výsledky mé bakalářské práce potvrzují správnost volby vedení TRS provádět vyšetření zkoušky kompatibility metodou sloupcové gelové aglutinace (LISS/NAT). Výhody sloupcové gelové aglutinace oproti zkumavkovým metodám spatřuji v tom, že je to rychlá metoda, s menší spotřebou reagencií i vzorku, odpadají kroky promývání senzibilizovaných erytrocytů, dobré možnosti standardizace, automatizace, dokumentace – výsledky mohou být dobře interpretovány i později a mohou být

odečítány pomocí readeru. V neposlední řadě metoda vykazuje vyšší citlivost, což zvyšuje bezpečnost krevní transfuze pro pacienta.

Výsledky zkoušky kompatibility metodou sloupcové gelové aglutinace (LISS/NAT) jsem porovnávala při jejím provedením manuálním a provedením na automatu Techno TwinStation. Výsledky vyšetření byly shodné bez ohledu na zvolený způsob provedení.

Na TRS Nemocnice České Budějovice, a. s. je k předtransfuznímu vyšetření přijato cca 60 % vzorků v režimu STANDARDNĚ a cca 40 % vzorků v režimu STATIM. V praxi se jako výhodný ukazuje postup vzorky v režimu STANDARDNĚ vyšetřit na automatu Techno TwinStation a vzorky v režimu STATIM, které je třeba zpracovat neprodleně, vyšetřovat manuálně. Důvodem je časová úspora.

Při manuálním provedení nelze vyloučit chyby lidského faktoru (identifikace vzorku, výběr správného činidla, provedení testu, interpretace výsledků a zápis dat do laboratorní knihy a LIS), které jsou v případě automatizace eliminovány. Další výhodou automatu je dohledatelnost všech prvků zapojených do analytického procesu, které jsou archivovány a zůstanou přístupné po provedení testu. [32] Dohledatelnost výsledku vyšetření každého vzorku včetně kontrol, názvu a čísla šarže reagencií a identifikace pracovníka, který vyšetření provedl a kontroloval, je nutná nejen v případě automatizace, ale i v případě manuálního provedení vyšetření. [16]

6 Závěr

Metoda nepřímého antiglobulinového testu (LISS/NAT) je dostatečně citlivá pro vyšetření zkoušky kompatibility erytrocytárních transfuzních přípravků. Její použití je považováno za standardní nepodkročitelné minimum.

Oběma typy provedení (manuální, automatizované) metody sloupcové gelové aglutinace (LISS/NAT) byla vyšetřena zkouška kompatibility u 52 vzorků pacientů, celkem 118 testů. Výsledky zkoušky kompatibility byly ve všech případech negativní, což potvrzuje, že není rozhodující, zda bylo vyšetření zkoušky kompatibility metodou sloupcové gelové aglutinace (LISS/NAT) provedeno manuálně či automatizovaně, výsledky jsou plně srovnatelné.

Z provozně-ekonomického hlediska se oba typy provedení tohoto vyšetření výrazněji neliší (manuální cca 24 Kč, automatizované cca 26 Kč).

Výhodou manuálního provedení zkoušky slučitelnosti je kratší celkový čas vyšetření (cca 30 – 35 minut), ale zůstává riziko vzniku chyb způsobených lidským faktorem.

Výhodou automatizovaného provedení zkoušky kompatibility na automatu Techno TwinStation je výrazné omezení vzniku chyb lidského faktoru, jednoznačná interpretace výsledků, jejich archivace a následný převod do LIS, sledovatelnost (dohledatelnost) všech prvků zapojených do analytického procesu. Dále také ušetření jednoho pracovního místa. Nevýhodou zůstává delší čas potřebný k vyšetření (cca 45 – 60 minut dle počtu vzorků) a nemožnost v průběhu pipetování přidávat další vzorky.

7 Seznam použité literatury

1. Moore, P. *Krev a spravedlnost: příběh pařížského lékaře, který se v 17. století stal průkopníkem krevní transfuze*. Praha: BB/art s.r.o., 2005. 256 s. ISBN 80-7341-465-1.
2. Hrubiško, M., a kol. *Hematologie a krevní transfúze II*: *Krevní transfúze*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1983. 206 s. ISBN 08-056-83.
3. Engelfriet, C. P., Meulenbroek, A. J., et al. *Imunohematologie*. 1. vydání. Amsterodam: Sanquin Blood Supply Foundation, 2003. 142 s. ISBN 90-5267-029-3.
4. Fábryová, V., a kol. *Imunohematológia a transfúzna medicína pre prax*. 1. vydání. Bratislava: Grada, 2012. 224 s. ISBN 978-80-8090-002-1.
5. Hořejší, V., Bartůňková, J. *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Triton, 2009. 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.
6. Pecka, M. *Základy imunohematologie a transfuziologie*. 1. vydání. Hradec Králové: Střední zdravotnická škola a Vyšší zdravotnická škola Hradec Králové, 2005. 139 s. ISBN 80-903414-4-6.
7. Bartůňková, J., Paulík, M., a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. vydání. Praha: Grada, 2011. 168 s. ISBN 978-80-247-3533-7.
8. Penka, M., Tesařová, E., a kol. *Hematologie a transfuzní lékařství II: Transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada, 2012. 192 s. ISBN 978-80-247-3460-6.
9. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství č. STL2011_08 Předtransfuzní laboratorní vyšetření. Dostupné z: <http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>
10. Laboratorní příručka Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s. Dostupné z: <http://www.nemcb.cz/_data/files/NCB_TRS_SME_12_002%20Laboratorni%20prirucka.pdf>

11. Pecka, M., Malý, J., Dejmková, J. *Přehled laboratorní hematologie III: Hemostáza. Imunohematologie*. 1. vydání. Praha: Galén, 1998. 152 s. ISBN 80-85824-89-2.
12. Tesařová, E., a kol. *Vybrané kapitoly*: *Transfuzní lékařství a imunohematologie*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství nelékařských zdravotnických oborů Brno, 2007. 112 s.
13. Eckstein, R. *Imunohematologie a transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Diag Human, 1994. 173 s.
14. PÍSAČKA, M. Ústní sdělení na Pracovním dnu STL s tématem imunohematologie, Praha, 30. 10. 2008.
15. Dobrý, E., Kvasnička, J., a kol. *Hematologie a transfuzní služba*: *Zdravotnické aktuality 211*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1987. 310 s. ISBN 73521-08/9.
16. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství č. STL2011_07 Základní imunohematologická laboratorní vyšetření červené řady – Obecné zásady a technické postupy. Dostupné z: <http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>
17. Řeháček, V., Masopust, J., a kol. *Transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada, 2013. 240 s. ISBN 978-80-247-4534-3.
18. Standardní operační postupy Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s.
19. Kout, M., Májský, A., Herzog, P. *Vyšetřovací metody v imunohematologii*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1975. 342 s. ISBN 08-052-75.
20. Dobrý, E., Novák, J., a kol. *Transfuzní služba*: *Zdravotnické aktuality 185*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1976. 188 s.
21. Dobrý, E., Novák, J., a kol. *Transfusní služba*: *Zdravotnické aktuality 157*. 1. vydání. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1964. 151 s.
22. Hule, V., Hrubiško, M. *Hematologie a krevní transfúze 2*: *Krevní transfúze*. 1. vydání. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1969. 198 s. ISBN 80-064-69.

23. Duguid, J.K., Bromilow, I.M. New technology in hospital blood banking [online]. *J Clin Pathol*. 46:585–588. 1993 Jul; 46(7):585-8 [cit. 2013-03-01]. DOI: 10.1136/jcp.46.7.585.
Dostupné z: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8157739>
24. Ching, E. Solid Phase Red Cell Adherence Assay: A tubeless method for pretransfusion testing and other applications in transfusion science [online]. *Transfus Apher Sci*. 2012 Jun; 46(3):287-91 [cit. 2013-03-01]. DOI: 10.1016/j.transci.2012.03.018.
Dostupné z: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22475547>
25. Sandler, S. G., Langeberg, A., Rumsey, D. H., Novak S. C. A solid phase and microtiter plate hemagglutination method for pretransfusion compatibility testing [online]. *Haematologia*. 2000; 30(3):149-57 [cit. 2013-03-01]. DOI: 10.1163/156855900300109143.
Dostupné z: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11128107>
26. Chapman, J. F., Milkins, C., Voak, D. The computer crossmatch: a safe alternative to the serological crossmatch [online]. *Transfus Med*. 2000 Dec; 10(4):251-6 [cit. 2013-03-02]. DOI: 10.1046/j.1365-3148.2000.00274.x.
Dostupné z: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123808>
27. Engelfreit, C. P., Reesink, H. W., Krusius, T., Wendel, S., Fontäo-Wendel, R., Hoffer, I., Medgyesi, G., Tadokoro, K., Pisacka, M., Kühnl, P., Schwartz, D. W., Mayr, W. R., Schönitzer, D., Lin, C. K., James, V., Castel, A., Hazenberg, C. A., Letowska, M., Solheim, B. G., Guerts, M., Ghosh, S., Flanagan, P., Epstein, J., Säfwenberg, J., Riccardi, D., Sirchia, G. The use of the computer cross-match [online]. *Vox Sang*. 2001 Apr; 80(3):184-92 [cit. 2013-03-02]. DOI: 10.1046/j.1423-0410.2001.00032.x. Dostupné z:
< http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11449959>
28. South, S. F., Casina, T. S., Li, L. Exponential error reduction in pretransfusion testing with automation [online]. *Transfussion*. 2012 Aug; 52(8):81S-87S [cit. 2013-03-03]. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2012.03816.x.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22882101>

29. Morelati, F., Barcellini, W., Manera, M. C., Paccapelo, C., Revelli, N., Villa, M. A., Marconi, M. New technologies in immunohaematology [online]. *Blood Transfus*. 2007 Apr; 5(2):58-65 [cit. 2013-03-01]. DOI: 10.2450/2007.0006-07. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204755>
30. Bajpai, M., Kaur, R., Gupta, E. Automation in immunohematology [online]. *Asian J Transfus Sci*. 2012 Jul; 6(2):140-4 [cit. 2013-03-03]. DOI: 10.4103/0973-6247.98914.
Dostupné z: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22988378>
31. Materiály firmy DiaMed/Bio-Rad. Dostupné z: < http://www.eurexmedica.cz/>
32. Downes, K. A., Shulman, I. A. Pretransfusion testing practices in North America, 2005-2010: an analysis of the College Of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program J-survey data, 2005-2010 [online]. Arch Pathol Lab Med. 2012 Mar; 136(3):294-300 [cit. 2013-03-04]. DOI: 10.5858/2011-0127-CPR.1.
Dostupné z: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22372905>

8 Klíčová slova

imunohematologie

předtransfuzní vyšetření

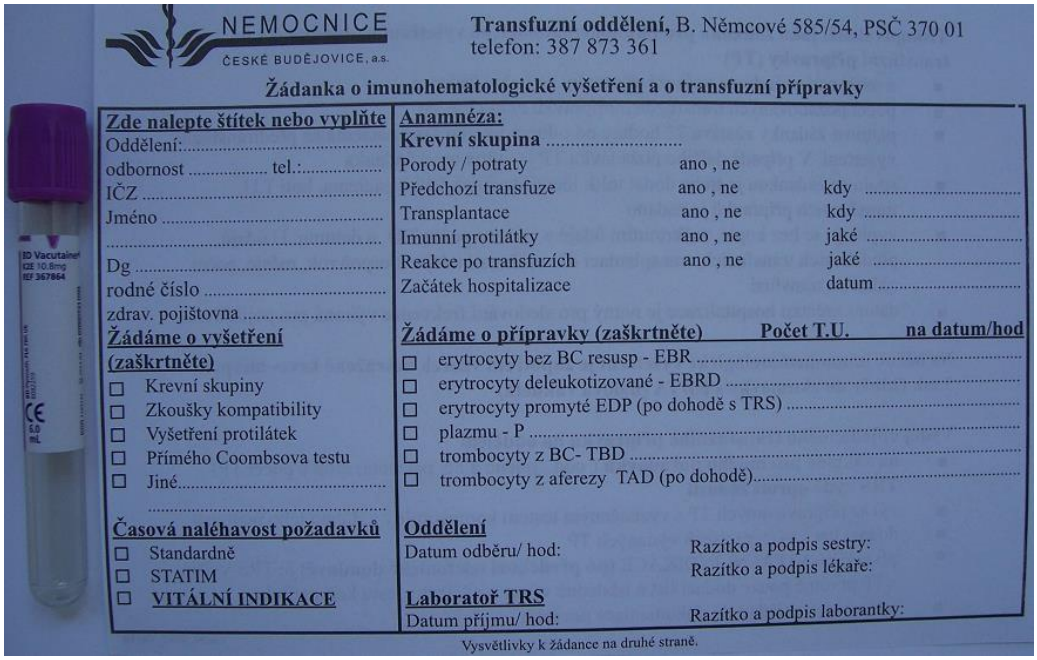
sloupcová gelová aglutinace

transfuze

zkouška kompatibility

9 Přílohy

Příloha 1: Žádanka a zkumavka pro předtransfuzní vyšetření



NEMOCNICE ČESKÉ BUDĚJOVICE, a.s.

Transfuzní oddělení, B. Němcové 585/54, PSČ 370 01
telefon: 387 873 361

Žádanka o imunohematologické vyšetření a o transfuzní přípravky

Zde nalepte štítek nebo vyplňte
Oddělení:.....
odbornost ..... tel.:.....
IČZ .....
Jméno .....
.....
Dg .....
rodné číslo .....
zdrav. pojišťovna .....

Žádáme o vyšetření (zaškrtněte)
☐ Krevní skupiny
☐ Zkoušky kompatibility
☐ Vyšetření protilátek
☐ Přímého Coombsova testu
☐ Jiné.....
.....

Časová naléhavost požadavků
☐ Standardně
☐ STATIM
☐ **VITÁLNÍ INDIKACE**

Anamnéza:
Krevní skupina .....

Porody / potraty	ano , ne	
Předchozí transfuze	ano , ne	kdy .....
Transplantace	ano , ne	kdy .....
Imunní protilátky	ano , ne	jaké .....
Reakce po transfuzích	ano , ne	jaké .....
Začátek hospitalizace		datum .....

Žádáme o přípravky (zaškrtněte) **Počet T.U.** **na datum/hod**
☐ erytrocyty bez BC resusp - EBR .....
☐ erytrocyty deleukotizované - EBRD .....
☐ erytrocyty promyté EDP (po dohodě s TRS) .....
☐ plazmu - P .....
☐ trombocyty z BC- TBD .....
☐ trombocyty z aferezy TAD (po dohodě).....

Oddělení
Datum odběru/ hod: Razítko a podpis sestry:
Razítko a podpis lékaře:

Laboratoř TRS
Datum příjmu/ hod: Razítko a podpis laborantky:

Vysvětlivky k žádance na druhé straně.

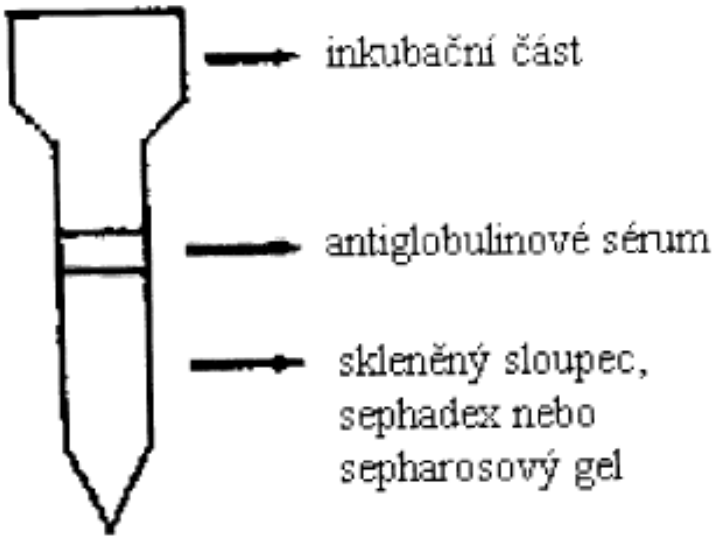
Zdroj: Autor

Příloha 2: Denní kontrola kvality imunohematologické diagnostiky

Parametr	Kontrolovaný materiál	Kontrolní materiál	Četnost kontrol
Stanovení antigenů AB0	Diagnostická séra anti-A, anti-B, event. anti-AB	1x erytrocyty 0, A_1, B	Min. 1x denně, pokud není změna sér
Stanovení protilátek anti-A, -B	Diagnostické erytrocyty A_1, B.	Známé sérum/plazma s anti-A, anti-B (krevní skupina 0)	Min. 1x denně, pokud není změna erytrocytů
Stanovení antigenu D	Diagnostická séra anti-D.	1x erytrocyty RhD pozitivní, RhD negativní	Min. 1x denně, pokud není změna sér
Stanovení fenotypu Rh a ostatních systémů	Diagnostická séra pro testování dalších erytrocytových antigenů.	*Pozitivní kontrola:* erytrocyty s daným antigenem v heterozygotním zastoupení (kde je to aplikovatelné). Výsledkem musí být jasná aglutinační reakce s erytrocyty nesoucími antigen odpovídající specifitě protilátky. *Negativní kontrola:* bez daného antigenu. Výsledkem musí být negativní reakce.	Min. 1x denně
Screening protilátek pacienti	Diagnostické erytrocyty pro screening protilátek proti erytrocytům.	*Pozitivní kontrola:* sérum/plazma se známou aloprotilátkou (např. protilátka anti-D s nízkým titrem; event. doplnit anti-Fy^a nebo anti-K apod.) *Negativní kontrola:* např. AB sérum; sérum/plazma bez protilátek proti erytrocytům	Min. 1x denně
KP	-	-	EHK

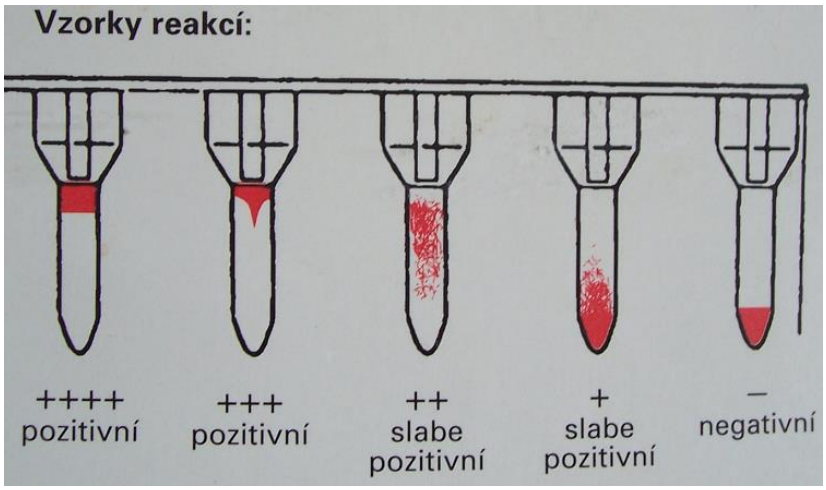
Zdroj: Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP. [16]

Příloha 3: Schematické zobrazení gelového sloupce



Zdroj: Imunohematologie. [3]

Příloha 4: Hodnocení reakcí sloupcové gelové aglutinace



Zdroj: Materiály firmy DiaMed/Bio-Rad. [31]

Příloha 5: Zkouška kompatibility – negativní výsledek

Zdroj: Autor

Příloha 6: Imunohematologický analyzátor Techno TwinStation firmy DiaMed/Bio-Rad

Obr. 1: Uzavřený analyzátor Techno TwinStation

Zdroj: Autor

Obr. 2: Otevřený analyzátor Techno TwinStation

Zdroj: Autor

Příloha 7: Klinická závažnost protilátek proti erytrocytům

Specifita	Klinická závažnost	Výběr transfuzního přípravku
anti-A, anti-B	Vždy ano	AB0 kompatibilní
Rh protilátky (reagující v NAT) anti-D, -C,-c,-E,-e	Ano	Negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
anti –Cw		Negativní test kompatibility Ve směsi s jinou protilátkou negativní pro daný antigen
Kell protilátky (anti-K, -k)	Ano	Negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
anti-Kpa	vzácně	Negativní test kompatibility Ve směsi s jinou protilátkou negativní pro daný antigen
Duffy protilátky (anti-Fya, -Fyb)	Ano	Negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
Kidd protilátky (anti-Jka, -Jkb)	Ano	Negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
anti-S, -s, -U	Ano	Negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
anti-A1, -P1, -N	Vzácně	Negativní test kompatibility
anti-M (nereagující při 37 °C)	Vzácně	Negativní test kompatibility
anti-M (reagující při 37 °C)	Někdy ano	Negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
anti-Lea, -Lea+b	vzácně	Negativní test kompatibility
anti-Leb	ne	Lze ignorovat
anti-Lua	Vzácně	Negativní test kompatibility
Protilátky s vysokým titrem a nízkou aviditou (HTLA)	nepravděpodobná	Podle doporučení specializované či referenční laboratoře
Protilátky proti antigenům s nízkou/vysokou frekvencí	Podle specifity	Podle doporučení specializované či referenční laboratoře

Zdroj: Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP. [9]