



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**Nespecifické pozitivní reakce u předtransfúzního
vyšetření**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Martina Hanzlíková

Vedoucí práce: MUDr. Petr Biedermann

České Budějovice 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Nespecifické pozitivní reakce u předtransfúzního vyšetření 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 12. 8. 2021

.....

Martina Hanzlíková

Poděkování

Děkuji vedoucímu práce MUDr. Petru Biedermannovi za odbornou pomoc při zpracování bakalářské práce a svým kolegyním z Transfúzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. za pomoc a umožnění zpracování praktické části této bakalářské práce.

Dále velký dík mé kamarádce a kolegyni Mgr. Lucii Tesařové za konzultace a odbornou pomoc. A všem doma za podporu a trpělivost.

Nespecifické pozitivní reakce u předtransfúzního vyšetření

Abstrakt

Předtransfúzní vyšetření je souborem imuno hematologických vyšetření před podáním transfúzního přípravku pacientovi. Cílem tohoto vyšetření je zajištění bezpečné a účinné podání transfúze příjemci. Komplex vyšetření před podáním krevního přípravku povinně zahrnuje vyšetření krevní skupiny příjemce, screening antierytrocytárních protilátek příjemce a test kompatibility transfúzního přípravku. Vyšetření se provádí aglutinační metodou a při screeningu se v některých případech používá i enzym.

S reakcemi *in vitro*, které nejsou způsobeny protilátkami v krevních skupinových systémech, se setkáváme při vyšetření antigenů erytrocytů nebo při vyšetření před podáním transfúze včetně testu kompatibility. Takové anomálie mohou vést k pozitivnímu nálezu protilátek a následného odkladu výdeje transfúzního přípravku. Mnoho těchto nespecifických reakcí je způsobeno reakcí erytrocytů příjemce transfúzního přípravku s příslušným enzymem používaným při vyšetřování enzymatického testu, přítomností chladových protilátek, specifickou léčbou nádorového onemocnění nebo i špatným laboratorním postupem.

Předmětem mé práce je určit podíl nespecifických pozitivních reakcí u předtransfúzního vyšetření, dále v jakém počtu se nespecifické pozitivní reakce v rutinním provozu vyskytují, jaký je význam vyšetřování screeningu protilátek v enzymatickém testu a jaká je časová prodleva a finanční náročnost při vyšetření screeningu v enzymatickém testu.

V práci popisují pracovní postupy při předtransfúzních vyšetření a další imuno hematologické metody. Uvádím zde i přehled skupinových systémů se stručným popisem klinicky významných nepravidelných protilátek, nejčastější nespecifické reakce vyskytující se v enzymatickém testu, dále i stručný popis analyzátoru IH-500 používaného na Transfúzním oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s.

V časovém období od 1. 9. 2015 - 31. 12. 2020 bylo na TO NEMCB vyšetřeno 405 vzorků pozitivních pouze v enzymatickém testu. 106 z nich bylo při opakovaném testování negativní, 208 vzorků bylo nejasné specifity a 91 vzorků mělo specifickou protilátku. Cílem mé práce bylo zjistit o jaké nespecifity při předtransfúzním vyšetření se jedná a určit nejčastější specifické protilátky vyskytující se pouze v enzymatickém testu. Mezi nejčastěji zachycené nespecifity byly reakce zachycené působením používaného enzymu, autoprotilátky, chladové protilátky a jiné nespecifické reakce.

TO NEMCB screening nepravidelných protilátek v enzymatickém testu u předtransfúzního vyšetření od roku 2012 rutinně neprovádí. TO NEMCB vyšetřuje ET u polytransfundovaných pacientů, u pacientů s již známou protilátkou a u pacientů s nežádoucí reakcí po transfúzi. Důležité je vyšetřit screening nepravidelných protilátek u polymorbidních pacientů, u pacientů s onkologickými diagnózami, po transplantacích, kdy dochází k útlumu imunitního systému a protilátky se mohou vytvořit rychleji. Zásadní věcí je řádné vyplnění anamnézy pacienta na žádance a včasné informování laboratoře z oddělení.

Klíčová slova

Enzymatický test; screening protilátek; předtransfúzní vyšetření; transfúze; nepravidelná protilátka; nespecifická pozitivní reakce.

Non-specific positive reaction in pre-transfusion examination

Abstract

Pre-transfusion examination is a set of immunohematological examinations before administration of a transfusion preparation to a patient. The purpose of this examination is to ensure safe and effective transfusion to the recipient. The pre-administration examination of the blood product must include an examination of the recipient's blood type, screening of the recipient's anti-erythrocyte antibodies, and a transfusion product compatibility test.

The test is performed by the agglutination method and in some cases the enzyme is used in the screening. In vitro reactions that are not caused by antibodies in blood group systems are encountered in erythrocyte antigen testing or in pre-transfusion testing, including compatibility testing.

Such anomalies can lead to a positive antibody finding and consequent delay in the delivery of the transfusion product. Many of these non-specific reactions are caused by the reaction of the erythrocytes of the transfusion recipient with the appropriate enzyme used in the enzymatic test, the presence of cold antibodies, the specific treatment of cancer, or even poor laboratory practice.

The subject of my bachelor thesis is to determine the proportion of non-specific positive reactions in pre-transfusion examination, the number of non-specific positive reactions in routine operation, the importance of antibody screening in enzymatic tests and the time lag and cost of screening in enzymatic tests.

In this thesis I describe working procedures for pre-transfusion examinations and other immunohematological methods. I also present an overview of group systems with a brief description of clinically significant irregular antibodies, the most common non-specific reactions occurring in the enzymatic test, as well as a brief description of the IH-500 analyzer used in the Transfusion Department of Hospital České Budějovice, a. s. (TO NEMCB).

Between 9/2015 and 12/2020, 405 samples were examined positive only in the enzymatic test at TO NEMCB. 106 of them were negative in retesting, 208 samples had unclear specificity and 91 samples had specific antibody.

The aim of my research was to find out the types of non-specificities in the pre-transfusion examinations and to determine the most common specific antibodies occurring only in the enzymatic test (ET).

Among the most frequently detected non-specificities were reactions detected by the enzyme used, autoantibodies, cold antibodies and other non-specific reactions. TO NEMCB has not routinely screened for irregular antibodies in an enzymatic test in pre-transfusion testing since 2012. TO NEMCB investigates ET in polytransfused patients, in patients with a known antibody, and in patients with a transfusion adverse reaction. It is important to screen for the irregular antibodies in case of polymorbid patients, patients with oncological diagnoses, patients after transplantations, when the immune system is weakened and antibodies can form faster. The prerequisite is to properly fill in the patient's medical history on his/her patient's request and to inform the laboratory from a particular department in a timely manner.

Keywords

Enzymatic test; antibody screening; pre-transfusion examination; transfusion; irregular antibody; non-specific positive reaction

Obsah

ÚVOD	10
1. Teoretická část	12
1.1 Historie krevní transfúze.....	12
1.2 Základní pojmy v imuno hematologické laboratoři.....	15
1.3 Předtransfúzní vyšetření	20
1.4 Krevní skupiny.....	22
1.5 Vyšetření nepravidelných protilátek proti erytrocytům.....	28
1.5.1 Screening protilátek v enzymatickém testu	29
1.6 Nespecifické reakce u předtransfúzního vyšetření	29
1.6.1 Nespecifické protilátky v enzymatickém testu	33
2. Cíl práce a hypotézy	37
3. Metodika	38
3.1 Příjem vzorku a žádanky o předtransfúzní vyšetření.....	38
3.2 Předtransfúzní vyšetření při pozitivním screeningu protilátek.....	39
3.2.1 Vyšetření krevní skupiny AB0/RhD.....	39
3.2.2 Screening nepravidelných protilátek proti erytrocytům a následná identifikace.....	48
3.2.3 Identifikace antierytrocytárních protilátek metodou gelové aglutinace	55
3.2.4 Manuální vyšetření kompatibility transfúzního přípravku obsahující erytrocyty metodou gelové aglutinace	61

4.	Výsledky	65
4.1	Výsledky protilátek v ET vyšetřených Laboratoří TO NEMCB	67
4.2	Nespecifické reakce v ET	69
4.3	Protilátky jasné specifity	72
4.4	Časová a finanční náročnost vyšetření nespecifických reakcí	75
5.	Diskuze	78
6.	Závěr	81
7.	Seznam literatury	82
8.	Seznam příloh a obrázků	87
9.	Seznam zkratk	89
10.	Přílohy	91

ÚVOD

Předmětem mé bakalářské práce je význam nespecifických pozitivních reakcí u předtransfúzního vyšetření, v jaké míře ovlivňují délku trvání předtransfúzního vyšetření, od příjmu vzorku na transfúzní oddělení, až po vydání transfúzního přípravku pacientovi.

V teoretické části se zabývám historií krevní transfúze, krevními systémy a jejich významem, rozdílem mezi tepelnými a chladovými protilátkami a jejich významem při podání transfúze. Dále se ve své práci zabývám laboratorními metodami, které se používají u předtransfúzního vyšetření a identifikaci antierytrocytárních protilátek. Právě identifikace antierytrocytárních protilátek je stěžejní pro určení specifické a nespecifické reakce. Předtransfúzní vyšetření před podáním erytrocytárního transfúzního přípravku na Transfúzním oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s. (TO NEMCB) zahrnuje metody vyšetření krevní skupiny, RhD faktoru, screeningu antierytrocytárních protilátek nepřímým antiglobulinovým testem metodou LISS-NAT a vlastním testem kompatibility transfúzního přípravku. Stěžejním bodem mé práce je význam vyšetření screeningu antierytrocytárních protilátek v enzymatickém testu u předtransfúzního vyšetření.

1. 3. 2011 vydala Společnost pro transfúzní lékařství ČLS JEP doporučení č. STL2011_07 Základní imunohematologická laboratorní vyšetření červené řady - Obecné zásady a technické postupy, podle kterých se enzymatický test ve screeningu antierytrocytárních protilátek nepovažuje za rutinní metodu, ale pouze jako doplňková metoda. V rutinním provozu se screening antierytrocytárních protilátek v enzymatickém testu na TO NEMCB neprovádí od roku 2012. Enzymatický test je test doplňkový ve vybraných případech při upřesnění identifikace protilátek, potransfúzních reakcí nebo u chronických pacientů s dlouhodobou transfúzní substitucí.

TO NEMCB jako spádové pracoviště Jihočeského kraje vyšetřuje identifikace antierytrocytárních protilátek ze vzorků zaslaných z bývalých okresních nemocnic a gynekologických ambulancí, které vzorky zasílají do soukromých laboratoří. Tato

pracoviště většinou stále rutinně vyšetřují screening antierytrocytárních protilátek metodou nepřímého antiglobulinového testu LISS-NAT a metodou enzymatického testu (ET).

Na teoretickou část navazuje část laboratorní, kde jsou zpracované výsledky vyšetření nespecifických reakcí u předtransfúzního vyšetření na speciální laboratoři TO NEMCB v období 1. 9. 2015 - 31. 12. 2020. V původním zadání mé bakalářské práce bylo období 1. 9. 2015 - 31. 12. 2017, ale protože jsem studium prodloužila, aktualizovala jsem výsledky až do konce roku 2020, tzn. období od 1. 9. 2015 - 31. 12. 2020.

Cílem mé práce je zjistit, jak velký je podíl nespecifických reakcí u předtransfúzního vyšetření na TO NEMCB z celkového počtu vyšetřených pozitivních vzorků, dále jaký je dílčí podíl jednotlivých nespecifických reakcí - působení chladových protilátek, reakcí příjemce transfúzního přípravku s příslušným enzymem používaným v enzymatickém testu a dalších negativních vlivů, které mohou způsobit nespecifické reakce u předtransfúzního vyšetření a tím prodloužit dobu k podání kompatibilního transfúzního přípravku příjemci. Do celkového počtu nespecifických reakcí nebyly započítány diskrepance krevní skupiny AB0 RhD, které jsou většinou způsobené onemocněním pacienta (např. leukémie), léčbou (transfúze, transplantace kostní dřeně), ale i věkem (novorozenci).

Toto téma jsem si vybrala proto, že pracuji na TO NEMCB v laboratoři krevní banky, kde se předtransfúzní vyšetření rutinně provádí. Každá nespecifická pozitivní reakce prodlužuje dobu podání krevní transfúze a ohrožuje tím pacienta na životě.

1. Teoretická část

1.1 Historie krevní transfúze

Význam krve, životodárné tekutiny, si lidé uvědomovali již před dávnými dobami, když si všimli, že ztráta krve rovná se ztrátě života. Léčba pomocí krve, krevní transfúze a s ním související dárcovství krve má dlouhou a zajímavou historii. S vývojem lidstva se vyvíjela i krevní transfúze. Záznamy o transfúzích je možné nalézt už ve staroegyptských, starořeckých a římských písemných památkách.

První historicky zaznamenaný pokus o převod krve nemocnému byl zapsán historikem a právníkem jménem Stefano Infessura v roce 1492. Papež Inocenc VIII. upadl do komatu a lékař Infessura doporučil jako způsob léčby krev tří desetiletých chlapců. Za odměnu měli chlapci dostat dukát. Tehdy se ještě nic nevědělo o krevním oběhu, tak byla krev podána papežovi ústně. Samozřejmě nepřežil ani jeden. (Penka, Tesařová, 2012)

V 16. století sestavil italský lékař Geronimo Cardano systém dvou trubic, pomocí nichž se přiváděla krev z tepny dárce do žíly příjemce.

První důkazy o skutečně vykonaných transfúzích jsou ze 17. století, po objevení krevního oběhu anglickým lékařem a anatomem Wiliamem Harveyem v roce 1616. Díky němu se začaly rozvíjet první pokusy o převod krve. Roku 1638 Francis Potter provedl sérii pokusů o transfúzi krve na psech. První historicky doloženou úspěšnou transfúzi ze zvířete na zvíře provedl anglický anatom Richard Lower mezi dvěma psy. Stříbrnou trubicí spojil krční tepnu psa-dárce a krční žílou krvácejícího psa- příjemce. První technicky úspěšnou a ověřenou transfúzi, jejímž příjemcem byl člověk, provedl francouzský lékař Jean Baptiste Denis, lékař Ludvíka XIV., v Paříži r. 1667. Profesor matematiky a filosofie použil k transfúzi jehněčí krev. Pacientem byl psychicky nemocný patnáctiletý hoch, který v důsledku častého pouštění žílou trpěl chudokrevností. Věřilo se, že beránčí krev chlapci prospěje a vyléčí chlapcovu duševní chorobu. Mladík přežil, ale další Denisovy pokusy o převody zvířecí krve nemocným

byly neúspěšné. (Netoušek, 1945) Nakonec byly transfúze zvířecí krve nemocným na sklonku sedmdesátých let 17. století v Anglii, Itálii i Francii zakázány.

Návrat medicíny k transfúzím byl až v roce 1816 díky profesorovi porodnictví a filosofie Jamesi Blundellovi. K problematice převodů krve přistoupil velmi zodpovědně s myšlenkou transfúze s pouze lidskou krví. Blundell sám provedl deset transfúzí, nejčastěji rodičkám s poporodním krvácením. K převodům používal praktické injekční stříkačky. Provedl řadu úspěšných transfúzí, ale i některé skončily nezdarem a pacient zemřel. Blundell své názory na krevní transfúze pouze lidské krve roku 1824 zveřejnil, i když jeho zásady znamenaly v dosavadním pohledu na krevní převody převrat, praxe se moc nezměnila a stále mnoho lékařů používalo k transfúzi beráncí krev. O Blundellovi lze hovořit jako o člověku, který se zasloužil o techniku krevního převodu. (Bobek, 1963)

V českých zemích se v této době transfúze vůbec neprováděly. Roku 1879 se doktor Antonín Erpek pokusil zachránit život čtyřem umírajícím ženám na pražském gynekologickém oddělení. K transfúzi použil zvířecí krev. Ve třech případech ženy trpěly těžkými potransfúzními komplikacemi, v jednom případě došlo k úmrtí pacientky. (Penka, Tesařová, 2012)

Stále hlavní příčinou neúspěšných krevních převodů byla neznalost krevních skupin. K jejich objevu došlo začátkem 20. století. Pokud je pacientovi podána nekompatibilní (neslučitelná) krev, dochází k aglutinaci (shlukování červených krvinek) a následné hemolýze (poškození krvinky a destrukci). Tento jev poprvé popsal německý fyziolog Leonard Landois, domníval se však, že hemolýzu má za následek neznámé onemocnění. V roce 1900 si Karl Landsteiner všiml, že červené krvinky se shlukují vlivem cizího krevního séra. Provedl sérii pokusů, aby mohl své tvrzení potvrdit. V začátcích objevů krevních skupin pracoval jen s malými počty vzorků krve zdravých lidí – konkrétně svých kolegů a svou vlastní. Krevní vzorky odstředil, propral ve fyziologickém roztoku. Pak zkoumal vzájemné reakce krvinek na různá séra, až identifikoval tři hlavní skupiny. Označil je podle přítomnosti antigenů na jejich erytrocytových membránách A, B, C.

Landsteiner neobjevil čtvrtou krevní skupinu, kvůli tomu, že okruh zkoumaných a vyšetřovaných vzorků byl úzký. (Hrubíško et al., 1983)

Nezávisle na Landsteinerovi pracoval i český psychiatr Jan Jánský, který v roce 1907 popsal čtyři krevní skupiny. Označil je podle aglutinačních vlastností I, II, III, IV. Američan Wiliam Moss existenci čtyř krevních skupin v roce 1910 potvrdil. (Schott, 1994) V tomto roce došlo k participaci na pojmenování krevních skupin A, B, AB, 0. Poznatky o krevních skupinách byly poprvé využity v praxi při podávání transfúzí americkým hematologem Reubenem Ottenbergem.

Roku 1927 Karl Landsteiner spolu s Levinem objevil další krevně skupinový systém MN. V roce 1939 došlo k velmi důležitému objevu dalšího erytrocytárního skupinového systému, Rh. Karl Landsteiner ve spolupráci s A. S. Wienerem Rh systém pojmenovali podle opice *Macacus rhesus*, jejíž krvinky byly při pokusech použity. (Penka, Tesařová, 2012)

Objev krevních skupin odstranil hlavní překážku bránící úspěšnému převodu krve, ovšem bylo ještě potřeba vyřešit přirozenou vlastnost krve a to je srážení. Problém se srážením byl odstraněn roku 1914 v Rusku Jurevičem Rozengartem, Hustinem v Belgii a Agotem a Lewisohnem v Americe, když objevili lidskému tělu neškodný protisrážlivý citrát sodný. Tato chemická látka pomohla odstranit původní poměrně nebezpečné přirozené (nativní) transfúze a nahradila je bezpečnější nepřímou transfúzí krve. Takto upravenou krev bylo možné i několik dnů skladovat. Citrát sodný se používá při výrobě transfúzních přípravků dodnes. Rous a Turner zjistili, že přidáním glukosy je možné skladovat krev s citrátem sodným až na 14 dní. Tyto objevy byly s úspěchem využity v první světové válce, kdy velký počet raněných si vyžádal velkou potřebu krve. (Hrubíško et al., 1983)

V roce 1950 Carl Walter a W. P. Murphy představují plastové vaky pro odběry krve, které nahrazují skleněné láhve. (Penka, Tesařová, 2012)

V Československu roku 1948 byla založena Národní transfúzní služba, začala se budovat síť transfúzních stanic, nejdříve v krajích, pak i v okresech.

V současné době rozeznáváme 329 antigenů, z nich je 292 řazených do 33 systémů krevních skupin, dále do kolekcí a sérií antigenů s nízkou, resp. vysokou frekvencí výskytu. (Řeháček, Masopust, 2013)

1.2 Základní pojmy v imuno hematologické laboratoři

Antigen je z chemického hlediska složitá organická makromolekula, která je schopna vyvolat imunitní odpověď. Oblasti na povrchu antigenu, které organismus rozpoznává jako cizí, se označují jako antigenní determinanty nebo epitopy. Na ně se navazují protilátky. Jeden antigen často obsahuje více epitopů (vazebných míst). Komplexy antigenu s protilátkami se nazývají imunokomplexy. Antigeny jsou různé chemické struktury, nejčastěji proteiny (glykoproteiny), lipidy (fosfolipidy, glykolipidy) a sacharidy (polysacharidy). V imuno hematologii nacházejí buněčné antigeny uplatnění hlavně jako antigeny krevních skupin (aglutinogeny). (Smetana et al., 1992)

Klinický význam erytrocytárních antigenů je podmíněn výskytem:

Aloprotilátek (jsou namířeny proti chybějícím erytrocytárním antigenům) a jejich schopnostmi:

- vyvolat destrukci erytrocytů podaných transfúzí (hemolytická potransfúzní reakce)
- prostoupit placentou a vyvolat hemolytické onemocnění plodu/novorozence (HON)

Autoprotilátek (jsou namířeny proti vlastním antigenům) a jejich schopnostmi vyvolat destrukci vlastních erytrocytů (AIHA). (Čermáková et al., 2008)

Antigeny krevních skupin se nachází na povrchu buněčné membrány erytrocytů a mají zde různé funkce:

- transportní kanály pro vodu, močovinu, ionty
- regulace systému komplementu

- enzymatická aktivita
- receptory pro bakterie, viry a parazity
- obrana proti patogenům
- jsou nutné pro život erytrocytů a udržení jejich morfologických vlastností

(Tesařová et al., 2007)

V imunohematologii jsou přirozené protilátky (anti-A, anti-B) nazývány aglutininy. Jedná se o glykoproteiny přítomné v séru a tělních tekutinách, které organismus tvoří jako odpověď na antigen. Protilátky jsou tvořeny plazmatickými buňkami, což je konečné stadium lymfocytu B. Po setkání s příslušným antigenem se lymfocyt B začne dělit, až z něj vznikne klon plazmatických buněk, které produkují protilátky proti antigenu, který reakci vyvolal. Povrchové molekuly typické pro lymfocyty B jsou CD19 a CD20. (Bartůňková, Paulík, 2011)

Vlivem působení protilátek dochází k neutralizaci, opsonizaci a aktivaci komplementu. Neutralizace znamená blokování aktivity toxinů, virů a dalších mikroorganismů tak, že se protilátka váže na ty epitopy, které jsou odpovědné za toxické účinky, vniknutí organismů do buněk nebo jejich přilnutí k buňkám. To, že se protilátky váží (opsonizují) na povrch mikroorganismů a antigenů, umožňuje a zkvalitňuje jejich pohlcení fagocyty a atakování NK-lymfocyty. Aktivace komplementu klasickou cestou je způsobena vazbou protilátky na antigen. To přispívá k opsonizaci, chemotaxi fagocytů a rozvoji zánětlivé reakce a u citlivých mikroorganismů může docházet až k osmotické lýze membranolytickým komplexem komplementu. (Hořejší et al., 2017)

Protilátky můžeme rozdělit z hlediska několika kritérií:

- podle původu - lidské, zvířecí (xenoséra), rostlinné (lektiny), monoklonální (jsou produktem jednoho klonu plazmatických buněk, jsou jednoho izotopu a mají stejnou specifitu), polyklonální (jsou produktem různých klonů lymfocytů a mají různou specifitu)

- podle specifity - specifické (reagují obvykle s jedním antigenem), polyspecifické (reagují se všemi či většinou antigenů)
- podle antigenu - aloprotilátky (jsou namířeny proti antigenům, která na vlastním erytrocytu chybí, tedy proti antigenům jiného organismu), autoprotilátky (jsou namířeny proti antigenům, která se na vlastním erytrocytu vyskytují, je to projev autoimunitního onemocnění)
- podle způsobu vzniku - přirozené pravidelné (vznikají přirozeně, bez setkání organismu s antigeny erytrocytů, např. anti-A, anti-B), přirozené nepravidelné (vznikají přirozeně, bez setkání organismu s antigeny erytrocytů, např. anti-H, anti-A1, anti-P1), imunní (vznikají v těhotenství, po transfúzi, po transplantaci, např. anti-D, anti-K)
- podle serologické reakce - komplement (krvinky aglutinují přímo, většinou třídy IgM), inkompletní (většinou třídy IgG nebo IgA, k aglutinaci je třeba jim pomoci snížením negativního náboje krvinek a tím přiblížení krvinek k sobě), lysiny (po navázání na antigen na sebe váží komplement, aktivují ho a vyvolávají hemolýzu krvinek)
- podle optimální teploty při reakci - chladové (4°C), tepelné (37°C), pokojové (20-24°C)

(Sakalová et al., 1995)

Protilátky jsou chemicky glykoproteiny, zvané imunoglobuliny (Ig). Ig mají strukturu molekuly uspořádané do tvaru Y. Rozvětvená část Ig se nazývá variabilní, na ni se váže antigen. Variabilní část určuje specifitu protilátky, tj. proti jakému antigenu je namířena. Druhá část Ig se nazývá konstantní (fragment Fc). Částí Fc se protilátka váže na buňky, které mají pro ni receptor (granulocyty, NK buňky, makrofágy). (Bartůňková, Paulík, 2011)

Všechna vyšetření prováděna v imunohematologické laboratoři jsou založena na aglutinační reakci. Aglutinace se používá k vyšetření krevních skupin, při průkazu

protilátek, u testů kompatibility. K aglutinaci dochází, když jsou erytrocyty, které mají na svém povrchu antigen, shlukované protilátkami, což lze pozorovat prostým okem. Aglutinace má dvě fáze. V první fázi dochází k senzibilizaci erytrocytu, kdy je protilátka fyzikálními silami svou Fab částí připojena k antigenu erytrocytové membrány. Tato fáze je reverzibilní a ovlivňuje ji koncentrace antigenu a protilátky a řada jiných faktorů (teplota, pH, čas). Druhá fáze aglutinace je pomalejší a charakterizovaná vytvořením pevných chemických vazeb senzibilizovanými erytrocyty. Protilátky vzájemně spojují antigenní receptory jednotlivých erytrocytů a vytváří se tak mnoho kombinací těchto spojení. Výsledkem je aglutinace erytrocytů. (Engelfriet et al., 2003)

Aglutinační testy je možné provádět sklíčkovou metodou, zkumavkovým testem, metodou pevné fáze nebo technikou sloupcové aglutinace.

Antiglobulinové testy (AGH testy, Coombsovy testy) jsou nejdůležitějšími imunohematologickými testy. Používají se k průkazu protilátek, které přímo neaglutinují erytrocyty výše popsaným způsobem, pouze erytrocyty senzibilizují. Aby bylo možné tyto protilátky prokázat, přidává se do reakce další protilátka proti původní, senzibilizující protilátce. Tento anti-imunoglobulin (AHG sérum, antiglobulinové sérum detekující lidskou protilátku) následně zajistí vzájemné spojení jednotlivých senzibilizovaných erytrocytů a vizualizuje aglutinační reakci. (Penka, Tesařová, 2012)

Přímý antiglobulinový test (PAT) slouží k detekci in vivo senzibilizace pomocí polyspecifického antiglobulinového séra (AHG; anti-IgG+anti-C3d). Provádí se zkumavkovým testem nebo sloupcovou aglutinací. (Řeháček, Masopust, 2013)

Používá se při průkazu imunitního typu hemolýzy u pacientů po transfúzích, transplantacích, u potransfúzních reakcí, u hemolytického onemocnění novorozence a u pacientů s projevy autoimunity (AIHA). (Penka, Tesařová, 2012)

Nepřímý antiglobulinový test (NAT) slouží k průkazu protilátky proti erytrocytům, která se nachází volně v séru nebo v 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 předtransfúzním vyšetření a lze jím vyšetřovat antigeny některých krevních skupin. AHG sérum používané v antiglobulinových testech musí být komplexní, tzn., že musí obsahovat složku anti-IgG a anti-C3 proto aby detekovalo protilátky IgG i protilátky závislé na komplementu, kterými jsou všechny patologické chladové protilátky. (Delaflor-Weiss et al., 2005)

K průkazu senzibilizujících protilátek lze použít i enzymové testy, jejichž provedení není sice povinné, je však vhodné např. při vyšetření potransfúzních reakcí a u pacientů opakovaně transfundovaných s velkým rizikem imunizace. Z enzymů je nejčastěji používaný papain, bromelin a ficin. (Penka, Tesařová, 2012)

Screening protilátek je prováděn u všech předtransfúzních vyšetření a u těhotných. Základem je nepřímý antiglobulinový test (zkumavková technika většinou již nahrazována testy sloupcové aglutinace a pevné fáze), doplňkovým testem je enzymový test (polytransfundovaní pacienti, nejasné nálezy, vyšetřování potransfúzních reakcí, aj.)

Sloupcová nebo také gelová aglutinační metoda. Při této metodě musí být erytrocyty suspendovány 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 suspendovaných v LISS je docílena v gelovém sloupci pomocí antiglobulinového séra. Erytrocyty a sérum se inkubují v inkubační části na povrchu gelu, 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 přítomné, a tyto aglutináty zůstávají po centrifugaci v gelovém materiálu. Erytrocyty, které nejsou senzibilizovány, nereagují s antiglobulinovým sérem v gelu a prostupují tímto gelem 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. Ve všech sloupcově aglutinačních systémech jsou mikrosloupcy upevněny na malých praktických kartách (Engelfriet et al., 2003)

Metoda LISS/NAT je považována za referenční techniku – hranice citlivosti LISS/NAT je brána jako standardní nepodkročitelné minimum. (Doporučení STL, 2011)

Sloupcová aglutinace je mnohem citlivější oproti zkumavkové metodě (větší záchyt klinicky významných protilátek, jednodušší interpretace výsledku, možnost uschování identifikační karty). (Kandasamy et al., 2018)

Test kompatibility (TK), někdy označován též zkouška slučitelnosti, zkouška kompatibility nebo křížový pokus, je reakce erytrocytů vybraného transfúzního přípravku v nepřímém antiglobulinovém testu (zkumavkový test, sloupcová aglutinace, pevná fáze) s plazmou/sérem příjemce. (Řeháček, Masopust, 2013)

1.3 Předtransfúzní vyšetření

Cílem předtransfúzního vyšetření je zajistit příjemci účinnou substituci, při které budou transfundované erytrocyty dostatečně dlouho přežívat v krevním oběhu a nedojde k jejich destrukci. Základním principem všech předtransfúzních vyšetření je laboratorní potvrzení, že je krev příjemce slučitelná s krví dárce. Původní testy kompatibility se sestávaly z velké a malé křížové zkoušky. Při velké se „křížilo“ sérum pacienta s erytrocyty dárce, při malé byla kombinace opačná a erytrocyty příjemce se „křížily“ se sérem dárce. Testy byly prováděny v různých prostředích (s vysokým obsahem proteinů, s přidáním antiglobulinových sér) při různých teplotách.

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

Komplex předtransfúzních vyšetření se skládá z:

- určení krevní skupiny ABO a RhD příjemce
- screeningového vyšetření nepravidelných protilátek proti erytrocytům v séru nebo plazmě příjemce

- výběru vhodného transfúzního přípravku včetně testu kompatibility (slučitelnosti).

Vyšetření krevní skupiny a nepravidelných protilátek proti erytrocytům u dárce krve je součástí imunohematologického vyšetření krevního vzorku po odběru. Předtransfúzní vyšetření se provádí vždy před podáním transfúzního přípravku obsahující erytrocyty. (Penka, Tesařová, 2012)

Screening nepravidelných antierytrocytových protilátek je prováděn u všech předtransfúzních vyšetření, u těhotných a dárců krve.

Cílem je:

- zachytit co nejvíce klinicky významných protilátek
- zachytit co nejméně klinicky nevýznamných protilátek
- zabránit potransfúzním reakcím či zkrácenému přežívání erytrocytů způsobenému aloprotilátkami proti erytrocytům, omezit riziko hemolytického onemocnění plodu/novorozence

(Masopust, Písačka, 2016)

Stupně naléhavosti požadavku na předtransfúzní vyšetření:

STANDARDNĚ – transfúzní přípravek je k dispozici po kompletním předtransfúzním vyšetření, do 24 hodin a podle data na žádance.

STATIM – vyšetření mají přednost před vyšetřováním vzorků ve standardním režimu, výsledky jsou neprodleně zaneseny do laboratorního informačního systému (LIS). Transfúzní přípravek vyšetřovaný ve statim režimu je připraven k expedici na oddělení co nejdříve po kompletním předtransfúzním vyšetření. Doba odezvy je 2 hodiny.

VITÁLNÍ INDIKACE – transfúzní přípravek je vydán okamžitě bez předtransfúzního vyšetření. Pokud je krevní skupina příjemce neznámá (AB0, RhD), vydává se skupinově univerzální přípravek erytrocyty 0 RhD negativní, Kell negativní. Pokud je

krevní skupina známá, provede se její kontrola pomocí diagnostických sér ve zkumavce a vydají se přednostně stejnoskupinové transfúzní přípravky.

Po expedici transfúzních přípravků z vitální indikace se provede kompletní předtransfúzní vyšetření. Výsledek je žadateli vyšetření dodatečně telefonicky nahlášen.

Krevní vzorek na předtransfúzní vyšetření musí být pacientovi, u kterého chce lékař transfúzi aplikovat, odebrán zásadně před podáním transfúzního přípravku. (Doporučení STL, 2015; Laboratorní příručka, 2019)

1.4 Krevní skupiny

Krevní skupiny jsou určité vlastnosti organismu a podle jejich výskytu je můžeme rozdělit do skupinových systémů. (Fábryová, 2012)

Krevní skupiny jsou dědičné, jejich dědičný přenos podmiňují geny zděděné od svých rodičů. (Hrubiško et al., 1983)

Antigeny krevních skupin jsou glykoprotein nebo glykolipidy zabudované v membráně erytrocytů. Rozeznávají se pomocí specifických protilátek. Antigeny se vyskytují i na jiných buňkách organismu. Erytrocytární antigeny mají v buňce různé funkce, např. udržují tvar erytrocytu, účastní se transportu v buňce, uplatňují se při adhezi, slouží jako receptory pro ligandy, regulují komplement. (Penka, Tesařová, 2012)

AB0 systém

V transfúzní praxi patří k nejdůležitějším krevně skupinovým systémům, protože se v séru zdravých jedinců pravidelně nacházejí protilátky proti antigenům chybějícím na erythrocytech. Proto je také nejnebezpečnější. Skupinový systém tvoří 3 alelové geny na lokusu 9 chromosomu - A, B, 0.

Prekurzor antigenu H, který má antigenní vlastnosti a vytváří krevně skupinové antigeny A a B. To jsou organické makromolekuly (glykoproteiny a glykolipidy) ve velkém množství obsaženy na povrchu erythrocytů. Cukernou složkou glykoproteinu jsou oligosacharidy. A, B, H antigeny nejsou přímým produktem genu, ten kóduje vznik

transferázy. Transferáza-enzym katalyzuje přenos a připojení molekuly specifického monosacharidu, tento monosacharid je zodpovědný za výslednou krevní skupinu. Krevní skupinu A určuje přítomnost N-acetyl-galaktozamin, krevní skupinu B D-galaktóza a vlivem genu H se syntetizuje H-transferáza specifická pro fukózu. L- fukóza je specifický monosacharid pro krevní skupinu 0. (Kubizs, 2006)

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 pacienta se pravidelně vyskytují protilátky anti-A a/nebo anti-B. Pokud není na erythrocytech přítomna krevní skupina A, je v séru této osoby vždy přítomna anti-A protilátka. Jestliže není přítomna krevní skupina B, je v séru vždy přítomna anti-B protilátka. (viz Tabulka 1) Zpravidla jsou tyto protilátky třídy IgM zvané rovněž jako aglutininy. Anti-A a anti-B protilátky nejsou přítomny u novorozenců, jejich tvorba začíná od 3. do 6. měsíce po narození.

Tabulka 1 – Krevní skupiny AB0

Krevní skupina	Antigeny na erythrocytech	Protilátky v séru
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A a B	Žádné
0	Žádné	Anti-A,anti-B

Zdroj: Vybrané kapitoly: Transfúzní lékařství a imunohematologie (Tesařová et al., 2007)

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 potransfúzní reakci.
- anti-H protilátka se vyskytuje ve 2 formách: jako aglutinin reagující v chladu u jedince, jehož erytrocyty obsahují málo H antigenu nebo u 0h jedince, jehož erytrocyty vůbec neobsahují H antigen. V chladu reagující anti-H je slabá protilátka, která není častá. U skupiny 0h 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.

Antigen H je nejvíce obsažen na erytrocytech KS 0, A2, B, A2B, A1, A1B. Od nejvyšší k nejnižší hodnotě. Diagnostické erytrocyty ve screeningu a IP jsou krevní skupiny 0, proto bude reakce s anti-H ve všech testech pozitivní. (Engelfriet et al., 2003)

Rh systém

Je to druhý nejvýznamnější systém objevený roku 1939 Landsteinerem a Wienerem. V séru králíka po imunizaci krvinkami opice *Macacus rhesus* byla nalezena protilátka, která reagovala jak s opičím antigenem, tak i s většinou lidských erytrocytů. Později byla zjištěna spojitost mezi tímto faktorem a imunizací Rh negativních jedinců, kterým byla aplikována transfúze Rh pozitivní krve. Rh faktor a anti-Rh protilátka byly později přejmenovány na antigen D a anti-D protilátku.

Antigen D patří spolu s antigeny C, c, E a e k nejvýznamnějším a nejznámějším antigenům Rh systému. Jedinci na jejichž erytrocytech je D antigen přítomný se označují jako RhD pozitivní, jedinci s chybějícím D antigenem jako RhD negativní. „Proti Rh antigenům se nevytváří přirozené protilátky (vzácně bývá anti-E), vznik Rh protilátek předpokládá antigenní stimulaci imunitního systému jedince např. transfúzí nebo těhotenstvím. (Penka, Tesařová, 2012).

Nejčastěji jsou to protilátky inkompletní IgG, pronikají placentou a způsobují HON a hemolytické potransfúzní reakce. Nejčastějšími typy aloprotilátek jsou anti-D, anti-C, anti-E, anti-c. Některé typy Rh protilátek se mohou vyskytovat u autoimunitní hemolytické anémie jako autoprottilátky. (Sakalová et al., 1995)

RhD negativní jedinci by neměli být transfundováni RhD pozitivními erytrocyty. Zcela zásadní je dodržovat toto opatření u žen ve fertilním věku a zamezit tím možné imunizaci. U RhD negativních mladých žen je vhodné respektovat i ccee fenotyp. (Penka, Tesařová, 2012)

Antigeny C, c, E, e jsou méně imunogenní než antigen D a jejich protilátky proti C, c, E, e se po aplikaci transfúze vytvoří pouze v 4,5% případech, a to pokud příslušné antigeny u pacienta chybí a jsou přítomny na erytrocytech dárce. Některé Rh antigeny jsou kódovány jinými alelami lokusu. Důležitý je antigen Cw, téměř všechny Cw pozitivní erytrocyty mají C antigen. V ČR je výskyt tohoto antigenu u 6-7 % lidí, v Evropě kolem 2 %. (Tesařová et al., 2007)

Je žádoucí, aby byl Cw antigen přítomný v diagnostických erytrocytech při vyšetření předtransfúzního screeningu pro identifikaci protilátky anti-Cw. (Engelfriet et al., 2003)

Kell systém

Tento významný skupinový systém Kell tvoří dvě základní alely K (Kell) a k (Cellano). Kell je první ze systémů objevený pomocí antiglobulinového testu u pacienta Kellehera. Je to klinicky významný systém, jehož protilátky (nejčastěji anti-K) mají potenciál vyvolat těžké potransfúzní reakce a HON.

Antigen K (KEL1) se v kavkazské populaci vyskytuje v 9%, častější je u populace Sinajského a Arabského poloostrova (až 25%). Je to velmi imunogenní struktura (po anti-Rh protilátkách je anti-K protilátka nejčastější). (Řeháček, Masopust, 2013)

Antigen k (Cellano) se nachází u 99,8% populace. Aloimunizace anti-k je velmi vzácná, protilátku si může vytvořit jedinec s genotypem KK, což představuje 0,2% populace. (Sakalová et al., 1995)

Skupinový systém Kidd

Kidd systém se zkráceně nazývá Jk a byl objeven v roce 1951. Systém tvoří alelický pár antigen Jka, Jkb a JK3. U Jk(a-b-) jedinců není antigen JK3 přítomný. Kidd antigeny se objevují už v časném vývoji plodu. Jsou slabšími imunogeny než Rh antigeny a antigeny AB0 systému. (Engelfriet et al., 2003)

Protilátky tohoto systému bývají velmi nebezpečné a to pro svou těžkou detekovatelnost (po imunizaci transfúzí nebo graviditou se mění síla nálezu, reakce zeslabují nebo reagují jen homozygotní krvinky) a pro velkou hemolytickou účinnost (byly popsány těžké akutní hemolýzy a hemolytické potransfúzní reakce pozdního typu s těžkým průběhem). (Řeháček, Masopust, 2013)

Skupinový systém Lewis

Tyto antigeny nejsou součástí erytrocytární membrány, ale absorbují se na membránu erytrocytu z plazmy. Antigeny jsou produkovány tkáňovými buňkami vyskytující se v tělesných tekutinách včetně plazmy. Dva z hlavních antigenů Lea (LE1) a Leb (LE2) nejsou alelické. (Masopust, Písačka, 2016)

Antigeny Lewis systému jsou syntetizované podobně jako ABH antigeny specifickou transferázou. Na erytrocytech novorozenců antigeny Lewis chybí, síla antigenu se může podle zdravotního stavu pacienta lišit (těhotenství, infekce *Helicobacterem pylori*, maligní onemocnění).

Protilátky anti-Lea a anti-Leb se nachází převážně u jedinců Le(a-b-), jsou chladové povahy, při 37°C nebývají aktivní a jsou považovány za klinicky nevýznamné protilátky. (Penka, Tesařová, 2012)

Skupinový systém MNSs

Tento systém byl po antigenech AB0 druhým rozpoznáním skupinovým systémem. Antigeny jsou glykoproteiny obsahující kyselinu sialovou, označují se tedy jako sialoglykoproteiny. Patří sem antigeny M, N, S, s a antigen U (v černošské populaci).

Protilátky anti-M a anti- N nemají klinickou významnost a spolu s protilátkami proti antigenům Lewis patří k tzv. "přirozeným protilátkám". Anti-M se nachází celkem často a je chladové povahy, obvykle nereaguje při 37°C. Naopak anti-S a anti-s reaguje při 37°C v AHG testu a jsou klinicky významné. (Penka, Tesařová, 2012)

Skupinový systém Duffy

Systém Duffy byl pojmenován po prvním pacientovi, u kterého byla protilátka proti antigenu Fya detekována. Nejdůležitějšími antigeny jsou Fya a Fyb. Vyskytují se na endotelových buňkách, ledvinách, plicích, tlustém střevě, slezině a thymu. Na leukocytech a trombocytech se Fya a Fyb nevyskytují. (Masopust, Písačka, 2016)

Antigeny systému Duffy se uplatňují u zánětlivých reakcí, jsou totiž receptory pro chemokiny. V malarických oblastech je rozšířený fenotyp Fy(a-b-), který zajišťuje rezistenci erytrocytů na malarickou infekci a slouží jako přirozený obranný mechanismus proti nemoci.

Protilátky proti antigenům Duffy nejsou časté, vznikají při těhotenství nebo imunizací transfúzemi. Reagují v NAT, jsou součástí směsi aloprotilátek a třídy IgG, komplement aktivovat mohou. (Penka, Tesařová, 2012)

Skupinový systém Lutheran

V současnosti je známých 19 antigenů tohoto systému, nejdůležitější je vysokofrekvenční antigen Lub a méně častý Lua. Antigeny jsou glykoproteiny se zesilujícím účinkem až s věkem, proto se neuplatňují u HON.

Klinický význam protilátek není příliš velký, nejsou časté. Jedná se o protilátky třídy IgM reagující při nižších teplotách. (Penka, Tesařová, 2012; Řeháček, Masopust, 2013)

P systém

Byl objeven roku 1927 Landsteinerem a Levinem. Tento systém obsahuje pouze několik antigenů, běžně se vyšetřuje jeden antigen P1. Chybění P1 antigenu se nazývá P2 (antigen P2 a protilátka anti-P2 tudíž neexistují). Anti-P1 protilátky jsou chladové

protilátky třídy IgM velmi zřídka aktivní při 37°C, tudíž nejsou klinicky významné pro podání transfúzí. Anti-P1 protilátky ale mohou způsobit problémy při určování krevních skupin AB0 v případech, kdy diagnostické erytrocyty A a/nebo B obsahující rovněž antigen P1. (Engelfriet et al., 2003)

1.5 Vyšetření nepravidelných protilátek proti erytrocytům

Nepřavidelné protilátky proti erytrocytům se prokazují screeningovým testem. Vyšetřované sérum nebo plazma se inkubuje s diagnostickými erytrocyty. V případě pozitivního výsledku (aglutinace erytrocytů) má příjemce v krvi protilátku proti některému z antigenů přítomných na diagnostických erytrocytech. Test musí být provedený metodou, která klinicky významné protilátky detekuje. (Penka, Tesařová, 2012)

Za referenční techniku pro screening protilátek je považovaný nepřímý antiglobulinový test, který se provádí ve zkumavce za použití erytrocytů resuspendovaných v roztoku o nízké iontové síle (LISS/NAT). Hranice citlivosti LISS/NAT je dána jako standardní nepodkročitelné minimum podle Doporučení společnosti pro transfúzní lékařství. (Doporučení STL, 2011)

Za standardní se používají testy sloupcové (gelové) aglutinace a testy na „pevné fázi“. Na základě dlouhodobých výsledků externí kvality bylo zjištěno, že metody sloupcové (gelové) aglutinace a pevné fáze dosahují lepších výsledků než zkumavková metoda.

Za doplňkovou techniku NAT je považován enzymový test (ET), který je v některých případech (např. u Rh protilátek) citlivější než NAT. Některé proteolytické enzymy např. papain, bromelin, ficin mají v nízkých koncentracích schopnost natrávit povrch erytrocytů, přiblížit je více k sobě, a tím ulehčit aglutinaci i malým koncentracím protilátky. ET mohou být jednofázové nebo dvojfázové. Jednofázový ET: do reakční směsi diagnostických erytrocytů a vyšetřované plazmy/séra se přidá enzym. Dvojfázový ET: diagnostické erytrocyty jsou už „ošetřené“ enzymem, přidá se vyšetřovaná plazma/sérum. Metoda je citlivější než jednofázový ET. (Masopust, Písačka, 2016)

Při pozitivě screeningu protilátek se přistupuje k identifikaci protilátek, kdy se určuje jejich specifita. Jako základní diagnostikum jsou doporučovány komerční CE certifikované identifikační panely, což jsou širší panely diagnostických erytrocytů, které jsou vybrány tak, aby umožnily identifikaci všech nejčastěji se vyskytujících klinicky významných protilátek. (Doporučení STL, 2015)

1.5.1 Screening protilátek v enzymatickém testu

V praxi se používá dvoufázový test, který je pro detekci protilátek uznán jako citlivější než jednodušný, při kterém se enzym přidává přímo ke směsi erytrocytů a plazmy. V laboratorní praxi se používají enzymy papain, ficin a bromelin. Ošetření erytrocytů proteolytickými enzymy zvyšuje jejich reaktivitu především s protilátkami Rh systému, ale také v systémech Lewis, Kidd a I. (Perreira, Marraze, 1993)

Enzymy štěpí molekuly kyseliny sialové z řetězců polysacharidů na membráně erytrocytů, obnaží se tím antigenní determinanty a redukuje se celkový negativní náboj na povrchu erytrocytu. Tyto změny na membráně umožní snadnější aglutinaci pro mnoho vzájemných reakcí mezi antigenem a protilátkou, ale současně oslabuje nebo ničí antigeny určitých krevních systémů. Za nejvíce zranitelné působením enzymů na erytrocyty jsou z krevních skupinových systémů považovány antigeny M, N, S a Duffy.

Enzymové techniky jsou užitečné tam, kde je při detekci protilátek screeningovými testy vyžadována vyšší citlivost metod. Díky působením enzymu na membránu erytrocytu se zesilují reakce určitých protilátek, zvláště v systémech Rh, Kidd, a Kell, ale zvyšuje se i možnost výskytu nespecifických reakcí v ET a citlivostí na v praxi používaný enzym. (Lapierre et al., 1990; Mollison et al., 1998)

1.6 Nespecické reakce u předtrasfúzního vyšetření

Při vlastním vyšetření se můžeme setkat s různými problémy např. diskrepance krevní skupiny AB0. Příčina problému s určením krevní skupiny se dá rozdělit do dvou skupin.

1. Neočekávané slabé nebo i negativní reakce

- Novorozenci mají slabé AB0 antigeny i aglutininy, nejsou u nich ještě plně vyvinuty. Aglutininy anti-A a anti-B můžou dokonce v plazmě novorozence úplně chybět a to až do jednoho roku života dítěte.

- Dospělí mohou mít slabé AB0 antigeny v důsledku onemocnění (např. leukémie).

- V důsledku nedávno podané nestejnokupinové transfúze (např. skupiny 0 příjemci se skupinou A nebo B), se může vyskytovat po určitou dobu smíšená buněčná populace. Erytrocyty dárce zůstávají v krevním oběhu příjemce cca 3 měsíce. Smíšené pole neboli smíšená buněčná populace se vyskytuje i u transplantace alogenní kostní dřeně. Často se transplantuje AB0 nestejnokupinová kostní dřeň, proto se objeví smíšená populace erytrocytů příjemce, tak i populace z transplantátu.

- Zeslabená reaktivita reagensů na vyšetření krevní skupiny může způsobit nečekaně negativní reakce. Je důležité v rámci správné laboratorní praxe provádět denní kontroly kvality, aby se zamezilo možné expiraci diagnostik, kontaminaci reagensů atd.

2. Nespecifické pozitivní reakce

Pseudoaglutinace. Erytrocyty mají negativně nabitý buněčný povrch, což zajistí vzájemné odpuzování a nedochází tak k agregaci v krevním řečišti. Pokud dojde ke snížení elektrického náboje, dojde ke snížení odpuzovací síly a erytrocyty se začnou shlukovat. Pseudoaglutinace je ve většině případů způsobena abnormalitou spektra bílkovin v plazmě pacienta. Jedná se o nízkou koncentraci albuminu a vysokou koncentraci globulinu (Beta2-mikroglobulin) v krvi. (Engelfriet et al., 2003)

Albumin je produkován hepatocyty a tvoří více než polovinu plazmatických bílkovin. Transportuje nekonjugovaný bilirubin, thyreoidální hormony, vápník, hořčík, zinek a další minerály. Albumin se podílí i na udržení acidobazické rovnováhy. Fyziologické hodnoty albuminu jsou 35-53g/l. Snížená hladina albuminu (hypoalbuminémie) je u těžké hepatopatie, zvýšený katabolismus je u nádorů a nemocných s akutními záněty. (Holeček et al., 1983)

Beta2-mikroglobulin je součástí HLA systému, je to produkt myeloidních a lymfoidních buněk, slouží jako tumorový marker, ukazující proliferaci těchto buněk. Nejvyšší koncentrace se vyskytuje u nádorů odvozených od lymfocytů a plazmocytů (mnohočetný myelom, lymfom, chronická lymfatická leukémie). Fyziologické hodnoty v séru jsou 1,0-2,4 mg/l. (Racek et al., 2006)

Pseudoaglutinace se projevuje jako shluk krvinek (aglomerát), podobají se aglutinaci vzniklé při reakci antigen a protilátka, ale mezi shluky krvinek jsou při mikroskopickém odečtu zřetelné i volné erythrocyty. Pseudoaglutinaci od aglutinace rozlišíme pouze mikroskopickým odečtem. (Kout et al., 1975)

Vedle pseudoaglutinace se používají termíny jako penízkovatění, agregace, tvorba rouleaux.

Rouleaux vede k aglutinaci autologních i alogenních erythrocytů při pokojové i při teplotě 37°C. Rouleax erythrocyty mají tendenci vzájemně adherovat in vitro, tvoří se řetízky erythrocytů spojené za sebou. Tento jev se nevykazuje u vyšetření NAT, používají se při něm AGH test a dochází k promytí erythrocytů fyziologickým roztokem. Přidáním fyziologického roztoku se fenomén rouleax odstraní. (Penka, Tesařová, 2012)

Chladové autoprottilátky způsobují aglutinaci vlastních erythrocytů tzv. autoaglutinaci. Při autoaglutinaci jsou shlukovány erythrocyty in vitro ve vlastním séru, hlavně při teplotách 0-4°C někdy i při 18°-20°C. (Kout et al., 1975).

Chladové prottilátky mohou být problémem při určení krevní skupiny, screeningu prottilátek i testu kompatibility. Při podezření na přítomnost chladových prottilátek je nutné získat erythrocyty bez navázaných chladových prottilátek a to dodržením teploty 37°C, už od venepunkce. Krevní vzorek se musí po odběru uchovat při teplotě 37°C a co nejrychleji doručit do laboratoře. V laboratoři se krvinky oddělí centrifugací od plazmy, promyjí se ve fyziologickém roztoku, vše při 37°C.

Whartonův rosol. Pupečník je obalen šedou vrstvou amnia (vnitřní plodový obal), obsahuje pupečnickové cévy a Whartonův rosol, který vzniká z embryonálního

mezodermu. Skládá se z želatinové hmoty a fibrilární sítě, která je tvořena hvězdicovitými buňkami. (Čech et al., 2006).

Při odběru krevního vzorku novorozence z pupečnickové krve se může Whartonův rosol vyskytnout v odebraném vzorku. V důsledku přítomnosti Wharthonova rosolu mohou erytrocyty spontánně agregovat a shluky erytrocytů se mohou podobat aglutinaci. Důležité je před vyšetřením erytrocyty důkladně promýt ve fyziologickém roztoku, alespoň třikrát. (Engelfriet et al., 2003)

Panaglutinace krvinek. Za tento fenomén je zodpovědný antigen T. Lidská plazma obsahuje přirozený aglutinin anti-T. Během života se díky střevní bakteriální flóře neustále vytváří a je s ní v symbióze. Antigen T za fyziologického stavu zůstává zakryt bílkoviny nesoucími kyselinu neuraminovou. K odhalení tohoto antigenu dochází při infikování vyšetřovaného vzorku krve. Některé bakterie tvoří enzym neurominidázu, ten odhalí skryté antigenní determinanty antigenu T skryté pod kyselinou neuraminovou. Panaglutinace vzniklá odhalením antigenu T znemožňuje vyšetření krevních skupin. Při výrobě polyklonálních reagensů se používá lidská plazma, obsahují tedy protilátku anti-T. Polyklonální reagenzie tedy reagují s aktivovaným antigenem T. Odkrytí antigenu T znemožní vyšetření krevní skupiny, protože erytrocyty s demaskovaným antigenem T shlukují všechna polyklonální séra. (Hrubíško et al., 1983; Engelfriet et al., 2003)

K zabránění panaglutinace a kontaminace vyšetřovaného vzorku je nutné dbát sterility při odběru, vakuového systému, nepoužívat odběr do otevřené zkumavky bez použití zátky a hlavně uskladnění vzorku v chladničce. (Kout et al., 1975)

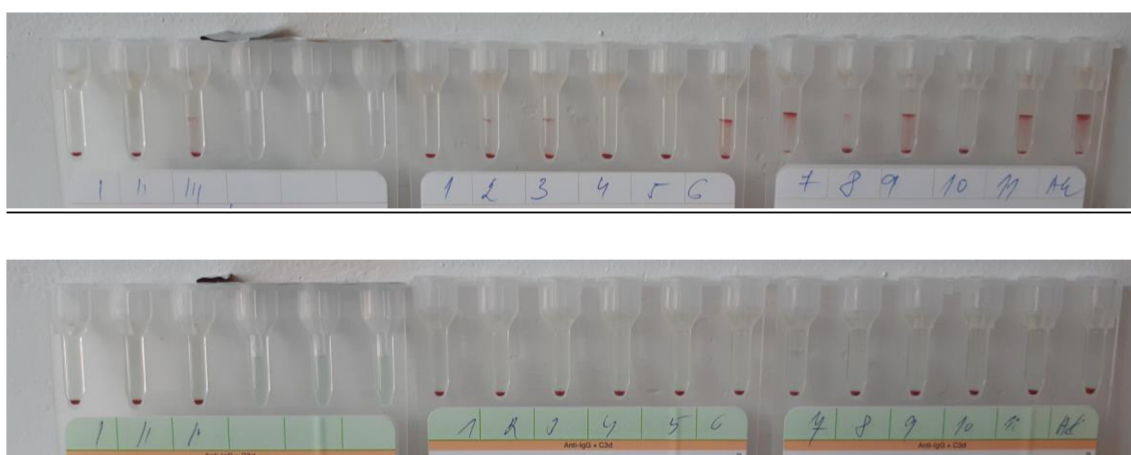
Pozitivní reakce s diagnostickými erytrocyty. Ve vyšetřované plazmě se mohou vyskytnout protilátky proti některé konzervační složce nebo additivům obsaženým v diagnostických erytrocytech. Jedním z additiv je i směs antibiotik trimethoprim a sulfamethoxazol. (Diamed)

Screening protilátek je při odečítání pozitivní a test kompatibility negativní. Reakce je vždy jen u komerčních erytrocytů na rozdíl od erytrocytů dárcovských. Problém se

odstraní promytím diagnostických erytrocytů fyziologickým roztokem. (Kandasamy et al., 2018)

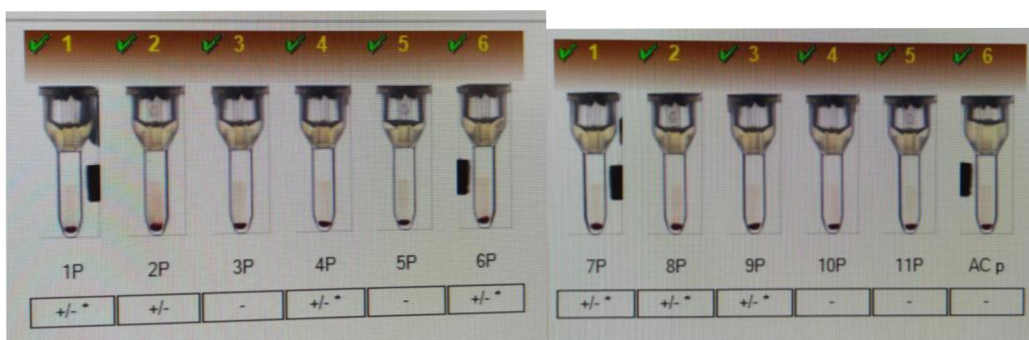
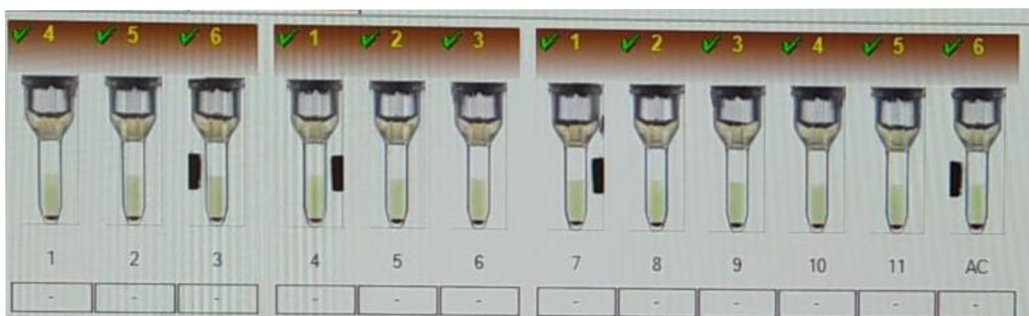
1.6.1 Nespecifické protilátky v enzymatickém testu

Nespecifické reakce v ET rozlišujeme podle síly reakce s diagnostickými erytrocyty a pozitivitu vlastní autokontroly (AK). Pokud se reakce v síle liší, objevují se ++, + a +- reakce a AK v ET může být i negativní, ale screening a identifikace protilátek (IP) v NAT jsou negativní, jedná se o nespecifické protilátky v ET. (viz Obrázek 1)



Obrázek 1 – Výsledek vyšetření nespecifická reakce v enzymatickém testu, NAT negativní (Zdroj: Vlastní foto)

V případě podezření na chladové protilátky (viz Obrázek 2) je potřeba vyšetření opakovat s nahřátými reagenčními na 37°C (vč. ID-karet a špiček). Pokud se reakce zeslabí nebo je dokonce vyšetření negativní, jedná se o chladové protilátky. (Viz Obrázek 3)

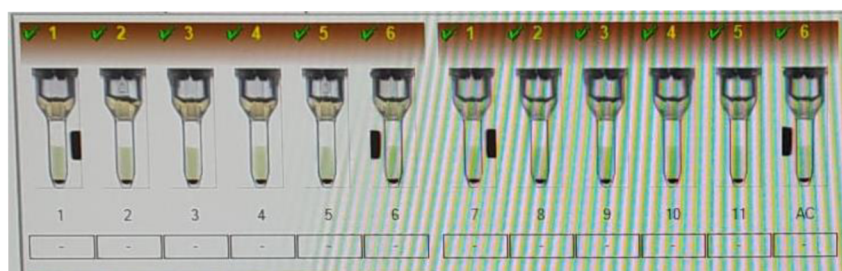


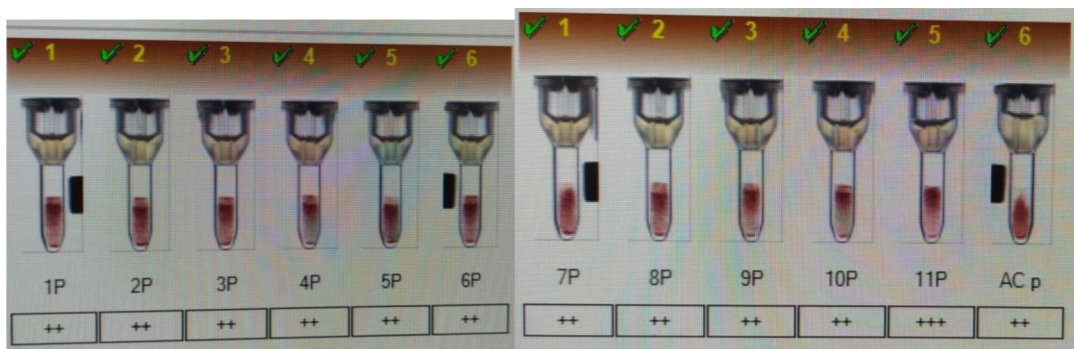
Obrázek 2 – Identifikace protilátek – podezření na chladové protilátky (Zdroj: Vlastní foto)



Obrázek 3 – Identifikace protilátek – výsledek po nahřátí (Zdroj: Vlastní foto)

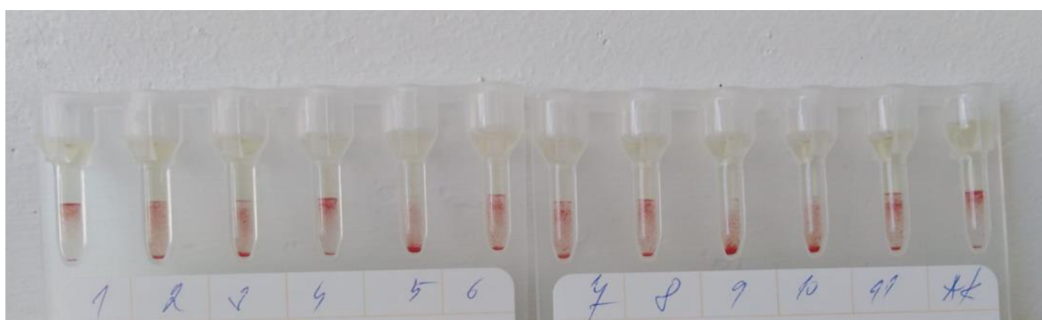
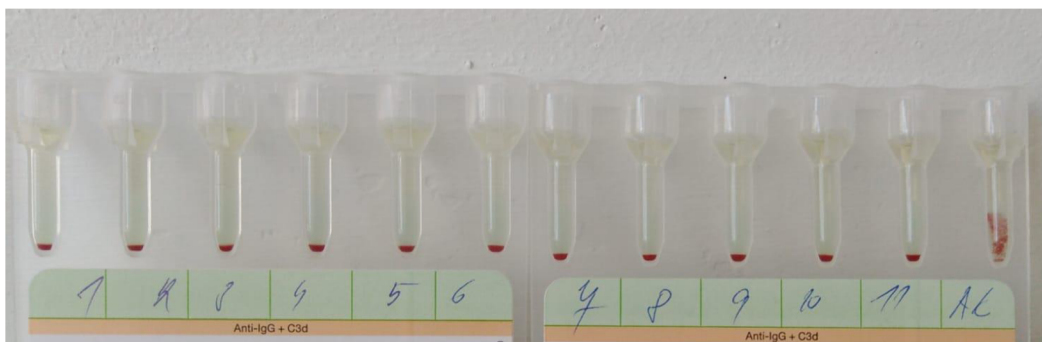
Pokud jsou pozitivní reakce v mikrozkušavce na ID-kartě stejné, +++, +++ a AK v ET je také pozitivní, jedná se o citlivost na enzym používaný při ET (viz Obrázek 4). U IP je pozitivita v ET, NAT je negativní.





Obrázek 4 – Výsledek vyšetření – citlivost v enzymatickém testu, NAT negativní (Zdroj: Vlastní foto)

U autoprotilátek v ET je pozitivní ET s diagnostickými erytrocyty i v AK, důležité je vyšetřit PAT, který prokáže přítomnost navázaných vlastních krvinek. Vyšetření v NAT je negativní. (viz Obrázek 5)



Obrázek 5 – Výsledek vyšetření – autoprotilátky v enzymatickém testu, NAT negativní, PAT +++ (Zdroj: Vlastní foto)

2. Cíl práce a hypotézy

Cíl práce:

- Určit podíl nespecifických reakcí v enzymatickém testu u předtransfúzního vyšetření.
- Jak značný mají nespecifické pozitivní reakce význam v rutinním provozu.
- Význam vyšetřování screeningu antierytrocytárních protilátek v enzymatickém testu.
- Určit nejčastější specifické protilátky v enzymatickém testu, pro které může být ET citlivější než NAT.
- Doporučení pro praxi - práce může sloužit pro externí laboratoře jako podklad pro rozhodnutí vyřadit enzymatický test z rutinního provozu a tím snížit počet pozitivních vzorků, resp. snížit náklady za vyšetření odeslané do referenční laboratoře k dovyšetření.

Hypotézy:

H1 – Více než 50% vzorků vykazuje pozitivitu v enzymatickém testu vlivem nespecifických protilátek.

H2 – Nespecifické protilátky v enzymatickém testu jsou nejčastěji způsobeny reakcí s daným enzymem.

3. Metodika

V této části mé práce se věnuji rutinnímu postupu předtransfúzního vyšetření prováděném na TO NEMCB. Od příjmu vzorku, vyšetření screeningu nepravidelných protilátek, až po vyšetření testu kompatibility. V rutinním provozu se předtransfúzní vyšetření provádí na TO automatizovaně na analyzátoru IH-500, kde se screening nepravidelných protilátek vyšetřuje pouze metodou LISS-NAT. Proto se další část mé práce ubírá cestou manuálního vyšetření screeningu nepravidelných protilátek, hlavně v enzymatickém testu, který ostatní TO v Jihočeském kraji používají jako nedílnou součást předtransfúzního vyšetření. V případě pozitivního výsledku screeningu nepravidelných protilátek proti erytrocytům je nutné protilátku identifikovat a specifikovat. Některé pracoviště tuto identifikaci neprovádí a pozitivní vzorky zasílají na naše pracoviště k dovyšetření. Hodnotím zde význam detekovaných protilátek, jejich klinickou závažnost a význam enzymatického testu u předtransfúzního vyšetření.

Příjem materiálu na TO NEMCB obsahuje několik částí:

- Příjem vzorku a žádanky o předtransfúzní vyšetření
- Stanovení krevní skupiny a RhD faktoru
- Screeningové vyšetření nepravidelných protilátek proti erytrocytům
- Při pozitivním screeningu identifikace nepravidelných protilátek proti erytrocytům
- Výběr vhodného transfúzního přípravku a test kompatibility

3.1 Příjem vzorku a žádanky o předtransfúzní vyšetření

Předtransfúznímu vyšetření v laboratoři předcházejí postupy příjmu materiálu se žádankou o vyšetření, identifikaci materiálu a přípravy vzorku k danému vyšetření. Vzorek pro předtransfúzní vyšetření se odebírá do vakuové zkumavky s obsahem protisrážlivého roztoku EDTA o obsahu 6 – 8 ml. Po kontrole laborantkou, že údaje na zkumavce souhlasí s údaji na žádance, je zkumavka i žádanka označena čárovým

kódem (štítkem) a zanesena do LIS. Žádanka musí obsahovat jméno, rodné číslo (IČP) pacienta, pojišťovnu, diagnózu (číselný kód), IČZ a zkratku oddělení, které vyšetření požaduje. Na žádance by měly být údaje o anamnéze pacienta (porody/potraty, předchozí transfúze, transplantace, potransfúzní reakce, dříve zjištěné imunní protilátky a aplikace antikoagulačních roztoků – Dextran, Heparin, probíhající biologická léčba), datum hospitalizace. Velice důležitý je datum a čas odběru, od kterého se započítává doba platnosti testu kompatibility. Ta platí 72 hodin od odběru vzorku. Vedle data a času odběru je povinný údaj, kdo odběr provedl (jméno a podpis) a také lékař, který transfúzi indikuje (razítko a podpis).

Údaje o pacientovi a kódy požadovaných laboratorních metod je nutné manuálně vložit do počítače. Některé laboratoře využívají zadávání požadavků na laboratorní vyšetření prostřednictvím informační sítě přímo na klinickém pracovišti (tzv. elektronická žádanka).

(Laboratorní příručka; Řízená dokumentace TO NEMCB)

3.2 Předtransfúzní vyšetření při pozitivním screeningu protilátek

Laboratoř Transfúzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s. zpracovává a vyhodnocuje pozitivní vzorky z ostatních laboratoří a nemocnic Jihočeské kraje. Laboratoř je dopředu telefonicky informována, že dorazí pozitivní vzorek z jiné laboratoře. V těchto případech se vzorek vyšetří manuální metodou, vyšetřujeme u něj screening protiátek jak v NAT tak i v ET. (Řízená dokumentace TO NEMCB)

3.2.1 Vyšetření krevní skupiny AB0/RhD

Vzorek se zadá do informačního systému, označí se čárovým kódem, zcentrifuguje 3500-5000otáček/minutu po dobu 5 minut. Vyšetří se krevní skupina zkumavkovou metodou. Manuální vyšetření krevní skupiny AB0/RhD se provádí zkumavkovou metodou na principu přímé aglutinace. Povrch erytrocytů nese za normálních okolností slabý negativní náboj. Ionty z dilučního roztoku vytvářejí okolo erytrocytu další elektrostatické vrstvy a v důsledku se nemohou krvinky k sobě těsně přiblížit. Vzdálenost mezi dvěma krvinkami dokáže překlenout molekula IgM. K přímé

aglutinaci dochází, když k náplavu erytrocytů, které nesou příslušné antigeny, přidáme protilátku třídy IgM proti konkrétnímu antigenu, za předpokladu správného poměru antigenu a protilátky. Pro vyšetření krevních skupin se používají monoklonální diagnostika obsahující myši IgM protilátky. Stanovení antigenů na erytrocytech je doplněno testováním přítomnosti odpovídacích anti-A a /nebo anti-B aloprotilátek v séru pacienta s použitím A1 a B diagnostických erytrocytů. Vyšetření AB0 antigenů provádíme detekcí antigenů na erytrocytech, pomocí známých diagnostických antisér. Detekci aglutininů v plazmě nebo séru jedince provádíme pomocí diagnostických erytrocytů. Vyšetření RhD antigenu provádíme pomocí diagnostického antiséra. Každý vzorek se vyšetřuje dvojmo různými monoklonálními diagnostickými séry třídy IgM, které nedetekují variantu D^{VI}.

a) První vyšetření krevní skupiny AB0/RhD

Jde-li o první vyšetření krevní skupiny AB0 RhD u předtransfúzního vyšetření, pak se vyšetření skládá z vyšetření aglutinogenů a aglutininů a kontrolního následného vyšetření aglutinogenů. Pokud je u pacienta ordinováno pouze vyšetření krevní skupiny pak se provede vyšetření aglutinogenů a aglutininů (následné kontrolní vyšetření se neprovádí). Vyšetření aglutinogenů i aglutininů:

- 1) Wassermannovu zkumavku popíšeme příjmením pacienta.
- 2) Do popsané Wassermannovy zkumavky připravíme 3% suspenzi erytrocytů ve fyziologickém roztoku 0,9% NaCl (PBS)
- 3) Zkumavku se vzorkem pacienta centrifugujeme při 3500-5000 otáčkách/minutu 5 minut, aby došlo k oddělení plazmy (nebo séra) a erytrocytů.
- 4) Vyšetření se provádí ve zkumavce s rozkapanými diagnostiky:
 1. zkumavka obsahuje 1 kapku diagnostika Anti–A
 2. zkumavka obsahuje 1 kapku diagnostika Anti–B
 3. zkumavka obsahuje 1 kapku diagnostika Anti–AB,

4. zkumavka obsahuje 1 kapku diagnostika Anti-D (D1)

5. Zkumavka obsahuje 1 kapku diagnostika Anti-D (D2)

6. Zkumavka obsahuje 1 kapku monoklonální kontroly

Do zkumavek 1-6 se kape 1 kapka 3% suspenze erytrocytů v PBS.

7. zkumavka obsahuje 1 kapku diagnostických erytrocytů skupiny A1

8. zkumavka obsahuje 1 kapku diagnostických erytrocytů skupiny B

9. zkumavka obsahuje 1 kapku diagnostických erytrocytů skupiny 0

Do zkumavek 7-9 se kape 1 kapka plazmy (nebo séra) pacienta.

5) Zkumavky protřepeme a centrifugujeme při 1000 otáčkách/minutu po dobu 1 minuty.

6) Erytrocyty resuspendujeme jemným poklepem na dno zkumavky.

7) Odečítáme makroskopicky.

Vyhodnocuje se souhlas krevní skupiny podle vyšetření aglutinogenů a podle aglutininů (viz Tabulka 2). Vyhodnocuje se souhlas vyšetření RhD oběma diagnostiky IgM (D1 a D2) (viz Tabulka 3). Vyšetření monoklonální kontroly (Ctl.) musí být vždy negativní. Případná aglutinace v kontrole znamená přítomnost faktoru, který vyvolává falešně pozitivní výsledek při vlastním vyšetření antigenu D nebo Dw/v na erytrocytech. (Řízená dokumentace TO NEMCB)

Tabulka 2 - Určení krevní skupiny AB0 pomocí aglutinogenů a aglutininů

KREVNÍ SKUPINA	DIAGNOSTIKA			DIAGNOSTICKÉ ERYTROCYTY		
	anti - A	anti - B	anti - AB	A1	B	0
0	-	-	-	+	+	-
A	+	-	+	-	+	-
B	-	+	+	+	-	-
AB	+	+	+	-	-	-

Zdroj: Laboratorní příručka Nemocnice České Budějovice, a. s.

Tabulka 3 - Určení RhD

	DIAGNOSTIKA		
	anti-D IgM (D1)	anti-D IgM (D2)	Rh negativní kontrola
Rh +	+	+	-
Rh -	-	-	-

Zdroj: Laboratorní příručka Nemocnice České Budějovice, a. s.

Anomálie při určování krevních skupin

Slabé, variantní nebo získané antigeny a slabé nebo chybějící AB0 protilátky, přítomnost chladových aloprotilátek nebo autoprottilátek musí být uvedeny na výsledku a tato informace musí být uvedena ve zdravotnické dokumentaci pacienta. U neočekávané reakce „smíšeného pole“ dvojí populace erytrocytů je nutné opakovat testování AB0/RhD. Mohou být způsobeny podáním AB0/RhD neshodných erytrocytů nebo transplantací kostní dřeně eventuelně kmenových buněk. Pokud jsou přítomny chladové aloprotilátky nebo autoprottilátky je vhodné provést testování protilátek anti-A a anti-B při vyšší teplotě nebo za použití diagnostických erytrocytů bez přítomnosti antigenu, odpovídajícího chladové protilátce.

- b) Opakované vyšetření krevní skupiny AB0/RhD

Provádí se u pacientů, kteří již měli vyšetřenou krevní skupinu v Laboratořích TO NEMCB. V případě již známé krevní skupiny stačí provést ověření krevní skupiny pouze jedním vyšetřením aglutinogenů.

Výsledek krevní skupiny musí souhlasit s předchozím vyšetřením. Přehled možných výsledků viz Tabulka 4. Pokud nesouhlasí, jde o záměnu krevního vzorku pacienta při současném nebo předchozím vyšetření. Skutečnost se oznámí VŠ pracovníkovi laboratoře, ošetřujícímu lékaři, dokumentuje se v Knize neshod a vyžádá se nový krevní vzorek pacienta. (Řízená dokumentace TO NEMCB)

Tabulka 4 - Určení krevní skupiny AB0/RhD pomocí aglutinogenů

KREVNÍ SKUPINA	DIAGNOSTIKA				
	anti - A	anti - B	anti - AB	anti-D IgM (D1)	Rh negativní kontrola
A Rh(D) +	+	-	+	+	-
A Rh(D) -	+	-	+	-	-
B Rh(D) +	-	+	+	+	-
B Rh(D) -	-	+	+	-	-
0 Rh(D) +	-	-	-	+	-
0 Rh(D) -	-	-	-	-	-
AB Rh(D) +	+	+	+	+	-
AB Rh(D) -	+	+	+	-	-

Zdroj: Laboratorní příručka Nemocnice České Budějovice, a. s.

Hodnocení reakcí:

Aglutinogeny

Pozitivní reakce: + až +++++, diagnostikum se naváže na aglutinogen a dojde k aglutinaci.

Pozitivní reakce ++++ je viditelná jako velký kompaktní aglutinát.

Pozitivní reakce +++ je viditelná jako více kompaktních aglutinátů

Pozitivní reakce ++ je viditelná jako více malých aglutinátů v čiré suspenzi.

Pozitivní reakce + je viditelná jako drobná aglutinace v suspenzi volných erytrocytů.

Negativní reakce: antigen není přítomen, nedojde k aglutinaci.

Falešně pozitivní reakce:

- Autoprotilátky u chladové AIHA nebo chladové protilátky nespecifické, erytrocyty 3×propereme v PBS (37 °C) a diagnostiky vytemperovanými na 18°-25°C. Případně provedeme inkubaci v termostatu při 37 °C a reakce vymizí.
- Polyaglutinace může být způsobena in vitro účinkem bakterií v kontaminovaném vzorku, v tomto případě požádáme o nový odběr do sterilní zkumavky, nebo in vivo odkrytím T-antigenů, v tomto případě požádáme o nový odběr po odeznění bakteriémie u pacienta.
- Pseudoaglutinace, může k ní dojít při vyšetření plné krve na skle, krev opakovaně promyjeme v PBS roztoku do vymizení pseudoaglutinace a provedeme mikroskopickou kontrolu.

Falešně negativní reakce:

- Nesprávný poměr diagnostika a erytrocytů tj. málo diagnostika nebo silná suspenze erytrocytů.
- Snížená účinnost diagnostika. Pro ověření účinku diagnostik se provádí denní kontroly kvality.
- Slabé antigeny. V tomto případě přidáme diagnostikum, inkubujeme 10 minut při teplotě 18°-25°C následně centrifugujeme. Výsledek odečteme

makroskopicky i mikroskopicky. Pokud je výsledek nejasný, odešleme vzorek na vyšetření na specializované pracoviště

Aglutininy

Pozitivní reakce: + až +++++, aglutinin se naváže na antigen na diagnostickém erytrocytu a dojde k aglutinaci.

Pozitivní reakce +++++ je viditelná jako velký kompaktní aglutinát

Pozitivní reakce +++ je viditelná jako více kompaktních aglutinátů.

Pozitivní reakce ++ je viditelná jako více malých aglutinátů v čiré suspenzi.

Pozitivní reakce + je viditelná jako drobná aglutinace v suspenzi volných erytrocytů.

Negativní reakce: aglutinin není přítomen, nedojde k aglutinaci.

Pokud je aglutinace slabá:

- Nakapeme sérum v nadbytku a necháme inkubovat 15 minut při pokojové teplotě a centrifugujeme.
- Inkubujeme 15 minut při teplotě 2-6°C
- Odečítáme mikroskopicky

Falešně pozitivní reakce:

- Nepravidelné protilátky z AB0 systému, protilátka proti antigenu A1 nebo antigenu H.
- Nepravidelné protilátky mimo AB0 systém, protilátky proti antigenům: M, P1, Le(a), Le(b), N, S.
- Pseudoaglutinace

- Nespecifická reakce s antibiotiky

Falešně negativní reakce:

- Nesprávný poměr plazmy (séra) a diagnostických erytrocytů, pokud jsou diagnostické erytrocyty v nadbytku.
- Při vyšetření za séra při přítomnosti hemolyzinů anti-A, anti-B, sérum před vyšetřením inkubujeme 30 minut při 56°C, aby došlo k inaktivaci komplementu.
- Aglutininy anti-A, anti-B mohou být v nízkém titru, v tomto případě přidáme sérum, prodloužíme inkubaci a opakujeme centrifugaci, odečítáme mikroskopicky.

RhD

Při vyšetření antigenu D rozlišujeme 3 kategorie výsledků:

Pozitivní reakce: + až +++++, diagnostikum se naváže na antigen D a dojde k aglutinaci.

Pozitivní reakce s oběma diagnostiky anti-D, testované erytrocyty jsou RhD pozitivní.

Pozitivní reakce +++++ je viditelná jako velký kompaktní aglutinát .

Pozitivní reakce +++ je viditelná jako více kompaktních aglutinátů.

Pozitivní reakce ++ je viditelná jako více malých aglutinátů v čiré suspenzi.

Pozitivní reakce na + je viditelná jako drobná aglutinace v suspenzi volných erytrocytů

Slabá reakce: V případě diskrepance, nebo pokud je slabá aglutinace +/-s oběma diagnostiky anti-D IgM, pacient je považován za Dw/v až do doby vyřešení diskrepance. Vzorek je odeslán do referenční laboratoře k objasnění. O odeslání vzorku do referenční laboratoře rozhodne lékař nebo jiný pověřený VŠ pracovník.

Dw/v: na slabý D antigen je vhodné myslet u:

- slabší reakce všech použitých diagnostických antisér
- zcela diskrepantních reakcí použitých diagnostických sér
- rozdílu v síle reakcí použitých diagnostických sér anti-D
- nečekaného nálezu anti-D imunizace bez autoreakce u osoby se zdánlivě normálním antigenem D
- diskrepance mezi anamnestickým údajem a současným vyšetřením

Negativní reakce: antigen D není přítomen na erytrocytech, nedojde k aglutinaci. Negativní reakce musí být vždy s oběma diagnostiky anti-D, testované erytrocyty jsou RhD negativní.

Ve zkumavce s monoklonální kontrolou musí být vždy negativní výsledek, případná aglutinace znamená přítomnost faktoru, který vyvolává falešně pozitivní výsledek při vlastním vyšetření antigenu D na erytrocytech. V tomto případě postupujeme takto:

- Vyšetřované erytrocyty 3× propereme PBS 37°C a opakujeme vyšetření.
- Pokud pozitivita v opakovaném testu zmizí, je zřejmé, že byla vyvolána přítomností chladových protilátek nebo dysproteinémií a výsledek vlastního vyšetření RhD na erytrocytech je platný.
- Pokud pozitivita v kontrole přetrvává, je zřejmé, že byla vyvolána senzibilizací erytrocytů in vivo IgG protilátkami.

Anomálie při určování krevních skupin

Slabé, variantní nebo získané antigeny a slabé nebo chybějící AB0 protilátky, přítomnost chladových alopřilátek nebo autoprotilátek musí být uvedeny na výsledku a tato informace musí být uvedena ve zdravotnické dokumentaci pacienta. U neočekávané reakce „smíšeného pole“ dvojí populace erytrocytů je nutné opakovat

testování AB0/RhD. Mohou být způsobeny podáním AB0/RhD neshodných erytrocytů nebo transplantací kostní dřeně eventuelně kmenových buněk. Pokud jsou přítomny chladové aloprotilátky nebo autoprotilátky je vhodné provést testování protilátek anti-A a anti-B při vyšší teplotě nebo za použití diagnostických erytrocytů bez přítomnosti antigenu, odpovídajícího chladové protilátce. (Řízená dokumentace TO NEMCB)

3.2.2 Screening nepravidelných protilátek proti erytrocytům a následná identifikace

Screening nepravidelných protilátek se v laboratořích TO NEMCB provádí metodou LISS-NAT. Pouze v určitých případech se NAT doplňuje ET. Screening v ET se používá jako doplňující metoda:

- Při potřebě zvýšit citlivost detekce některých protilátek (např. protilátky v Rh systému, anti-P1, anti-Lewis, anti-Kidd, anti-I, anti-i, anti-Colton, ...)
- Při identifikaci směsí protilátek
- U pacientů, kteří již měli zjištěnou protilátku v ET
- U pacientů, při vyšetření potransfúzní reakce
- U pacientů s dlouhodobou transfúzní substituční léčbou a těžkým klinickým stavem (hematologické a onkologické diagnózy)
- U žen v těhotenství, které měly zjištěnou protilátku v ET
- Nebo u pacientů s již vyšetřeným screeningem protilátek s pozitivitou v ET, který byl vyšetřen na jiném pracovišti

1. Automatizované vyšetření

Krevní vzorek, který je vyšetřován ve standardním režimu, jde do plně automatického imuno hematologického analyzátoru IH-500 od firmy BIO-RAD (CE v souladu se směrnici IVD 98/79/ES). IH-500 je plně automatizovaný systém pro práci s ID-systémem (pipetování, inkubace, centrifugace, odečítání, uložení výsledků včetně

fotografií jednotlivých reakcí, záloha), napojený přímo na LIS, s aktivním monitorováním QC. Kapacita analyzátoru je 50 vzorků, 34 lahviček s reagensiemi, 170 ID-karet. (BIO-RAD)

Před vyšetřením se vzorek centrifuguje při 3500-5000 otáčkách/min po dobu 5 minut. Dojde k oddělení plazmy od krvinek. Zkumavky musí být k vyšetření v analyzátoru odzátkované.

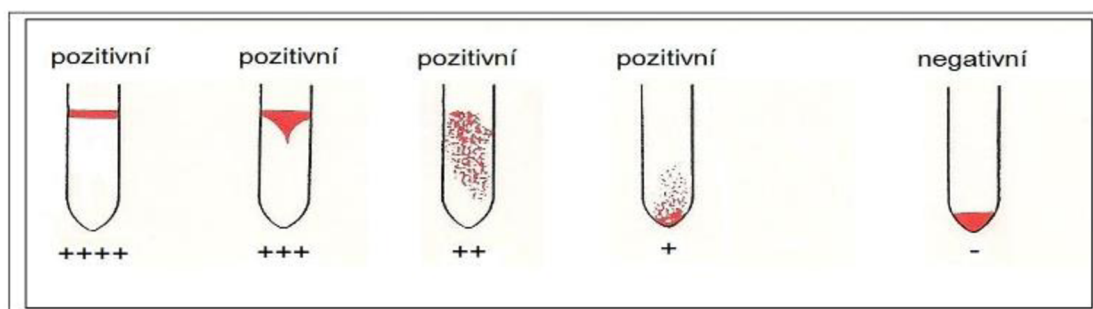
V analyzátoru jsou už veškeré reagensie potřebné pro předtransfúzní vyšetření tzn. veškeré chemikálie a reagensie: ID- karty LISS/Coombs pro NAT, ID- karty NaCl pro ET, ID-DiaCell pro NAT I-II-III (screeningové erytrocyty), ID-DiaCell pro ET IP-IIP-IIIP, ID-Diluent 2 (modifikovaný LISS roztok pro přípravu suspenze erytrocytů), IH-QC (modulární systém–systém pro denní kontrolu kvality: IH-QC1 [KS A RhD negativní, fenotyp: ddccee, protilátka anti-D 0,05 IU/ml], IH-QC2 [KS B RhD pozitivní, fenotyp: DCcEe, protilátka anti-Fya], IH-QC4 [KS 0 RhD pozitivní, fenotyp: DccEE, protilátka anti-K], IH-QC5 [KS A RhD pozitivní, fenotyp: DCcee, bez protilátky]), systémová kapalina – promývací roztok A, dekontaminační kapalina – 0,5M NaOH. (Řízená dokumentace TO NEMCB)

Princip NAT metodou sloupcové aglutinace

Plastová ID-karta LISS/Coombs se skládá z 6 mikrozkuvek, které obsahují gelovou matrix, skrze kterou během centrifugace prochází vyšetřovaný materiál. Gelové částice jsou takové velikosti, že mezery mezi nimi jsou „průchozí“ pouze pro jednotlivou krvinku, shluky 2 a více krvinek jsou zadržovány v gelovém sloupci, velké shluky zůstávají na horní části sloupce, při negativní reakci všechny krvinky projdou na dno mikrozkuvky. Gelová matrix ID-karty LISS/Coombs obsahuje polyspecifické AHG (králičí anti-IgG a monoklonální anti-C3d, klon 139-9). Mikrozkuvky ID-karty LISS/Coombs obsahující AHG jsou určeny pro screening a identifikaci aloprotilátek, test kompatibility a PAT. Inkubační fáze probíhá v horní rozšířené části mikrozkuvky. Při následné centrifugaci se vlivem své vyšší specifické váhy dostávají jako první do pohybu erytrocyty a přicházejí tak dříve do prostředí gelu než pomaleji

putující nenavázané Ig. Protilátka reaguje specificky s tím antigenem, který stimuloval její tvorbu. Protilátka lze identifikovat na základě schématu její reaktivity v porovnání s panelem diagnostických erytrocytů se známou antigenní konfigurací.

IH-500 vyšetřovaný vzorek napipetuje, inkubuje a po identifikaci karet vzorek proběhne proces čtení a automatického vyhodnocení. Výsledky se zobrazí na monitoru PC pomocí softwaru IH-Com. Výsledky pro jednotlivé mikrozkušavky se vyhodnotí s použitím těchto symbolů: +++++, +++, ++, +, -, +/-, DP (double population) – viz Obrázek 6. (Řízená dokumentace TO NEMCB)



Obrázek 6 – Hodnocení reakcí sloupcové aglutinace (Zdroj: Řízená dokumentace TO NEMCB)

Pokud je ve screeningu detekována pozitivní reakce, je určena její specifita a klinický význam.

2. Manuální vyšetření screeningu antierytrocytárních protilátek metodou gelové aglutinace

Princip vyšetření

Toto vyšetření stanovuje přítomnost antierytrocytárních aloprotilátek, které vznikly imunizací pacienta po podání transfúze nebo u ženy v těhotenství. Dále zachycuje též autoprotilátky, které vznikly bez předchozí imunizace. Vyšetření provádíme metodou sloupcové aglutinace tzv. nepřímým antiglobulinovým testem (NAT). NAT zachycuje

klinicky významné protilátky třídy IgG. Protože NAT metody mohou detekovat téměř všechny klinicky závažné protilátky, doporučuje se pro screening protilátek použití samotného NAT bez další doplňující screeningové techniky. ET je doplňková technika, vzácně citlivější než NAT. ET test poskytuje zesílené reakce v systémech Rh, Kell, Kidd, nejsou v něm průkazné protilátky systémů MNSs a Duffy. Nepovažuje se za rutinní metodu pro screening protilátek. Autologní kontrola nebo PAT (přímý antiglobulinový test) nejsou nutnou součástí screeningu protilátek. Autologní kontrola nebo PAT se rutinně provádí jako součást screeningu protilátek při předtransfúzním vyšetření u novorozenců a dětí do 6 měsíců věku a při vyšetření pozitivních antierytrocytárních protilátek, které již byly identifikovány při předchozím vyšetření.

Chemikálie, reagensie a spotřební materiál: ID–Karty LISS/Coombs (pro NAT), ID–karty NaCl (pro ET), ID–Diacell pro NAT I –II –III, ID–Diacell pro ET I –II –III, ID-Diluent 2 (Modifikovaný LISS pro přípravu suspenze erytrocytů), ID–Papain (Papainový roztok připravený k přímému použití pro úpravu krvinek papainem do autokontroly), špičky, rukavice

Přístroje a pomocná zařízení: laboratorní centrifuga na centrifugaci zkumavek, pipetor, ID–Inkubátor nebo DG–Inkubátor, ID–Centrifuga

Screening antierytrocytárních protilátek NAT

- 1) Před provedením screeningu protilátek je potřeba všechny reagensie vytemperovat na pokojovou teplotu.
- 2) Vzorek pacienta centrifugujeme při 3500-5000 otáčkách/minutu 5 minut, aby došlo k oddělení plazmy a erytrocytů.
- 3) ID–karty LISS/Coombs popíšeme příjmením pacienta, a jednotlivé mikrozkušavky popíšeme číslem diagnostických erytrocytů I, II, III.
- 4) Diagnostické erytrocyty ID-Diacell před použitím jemně resuspendujeme. Nejprve napipetujeme na ID–karty LISS/Coombs 50 μ l diagnostických erytrocytů I, II, II, k nim napipetujeme 25 μ l plazmy pacienta.

5) ID-kartu inkubujeme 15 minut v ID-inkubátoru při 37°C. ID-inkubátor vydá zvukový signál po uplynutí inkubační doby.

6) ID-kartu centrifugujeme v ID-centrifuze, otáčky a doba centrifugace je pevně nastavena výrobcem.

7) Odečteme výsledek.

Screening antierytrocytárních ET

1) Před provedením screeningu protilátek je potřeba všechny reagenty vytemperovat na pokojovou teplotu.

2) Vzorek pacienta centrifugujeme při 3500-5000 otáčkách/minutu 5 minut, aby došlo k oddělení plazmy a erytrocytů.

3) ID-kartu NaCl popíšeme příjmením pacienta a jednotlivé mikrozkušavky popíšeme číslem diagnostických erytrocytů: I,II,III.

4) Diagnostické erytrocyty ID-Diacell před použitím jemně resuspendujeme. Nejprve napipetujeme na kartu NaCl 50 µl diagnostických erytrocytů papainizovaných I, II, III, k nim napipetujeme 25 µl plazmy pacienta.

5) ID-kartu inkubujeme 15 minut v ID-inkubátoru při 37°C. ID-inkubátor vydá zvukový signál po uplynutí inkubační doby.

6) ID-kartu centrifugujeme v ID-centrifuze, otáčky a doba centrifugace je pevně nastavena výrobcem.

7) Odečteme výsledek.

Provedení autologní kontroly

Autologní kontrolu provedeme v případech:

- Pokud jde o předtransfúzní vyšetření novorozence nebo dítěte do 6 měsíců věku. Proveďte se autologní kontrola NAT na ID-kartě LISS/Coombs.
- Pokud jde o pacienta s již určenou protilátkou. Autologní kontrola se provede testem, ve kterém byla protilátka přítomna při předchozím vyšetření buď NAT nebo ET nebo oběma testy.

Postup provedení:

- 1) Wassermannovu zkumavku popíšeme příjmením pacienta.
- 2) Do popsané Wassermannovy zkumavky připravíme 0,8% suspenzi erytrocytů pacienta v Diluentu 2.
- 3) Vzorek pacienta centrifugujeme při 3500-5000 otáčkách/minutu 5 minut, aby došlo k oddělení plazmy a erytrocytů.
- 4) Mikrozukmavku ID-karty LISS/Coombs (nebo/a ID-kartu NaCl) označíme AK a popíšeme příjmením pacienta.
- 5) Do mikrozukmavky ID-karty LISS/Coombs (nebo/a ID-kartu NaCl) napipetujeme 50 µl 0,8% suspenze erytrocytů pacienta v Diluentu 2.
- 6) Do mikrozukmavky napipetujeme 25 µl plazmy pacienta.
- 7) Pokud se autologní kontrola provádí na ID-kartě NaCl pak je potřeba do mikrozukmavky po napipetování plazmy, napipetovat ještě 25 µl papainu.
- 8) ID-kartu inkubujeme 15 minut v ID-inkubátoru při 37°C. ID-inkubátor vydá zvukový signál po uplynutí inkubační doby.
- 9) ID-kartu centrifugujeme v ID-centrifuze, otáčky a doba centrifugace je pevně nastavena výrobcem.

10) Odečteme výsledek.

Pozitivní reakce: aglutinované erythrocyty vytváření na povrchu gelu linku nebo jsou rozptýleny v gelu, reakce je hodnocena + až +++++, mohou se vyskytnout i slabší reakce +/- případně stopové reakce.

Negativní reakce: kompaktní sediment erythrocytů na dně zkumavky.

(Řízená dokumentace TO NEMCB)

3.2.3 Identifikace antierytrocytárních protilátek metodou gelové aglutinace

Princip vyšetření

Plazma nebo sérum pacienta jsou testovány metodou gelové aglutinace (NAT) proti identifikačnímu panelu diagnostických erytrocytů. Vhodné je zařazení vlastních erytrocytů pacienta tzv. autologní kontrola („autokontrola“), k odlišení protilátky proti antigenu o vysoké frekvenci výskytu od nespecifické autoprottilátky. Specifita protilátky by měla být potvrzena, jen když reaguje přinejmenším se 2 typy diagnostických erytrocytů nesoucích daný antigen a nereaguje přinejmenším se 2 typy erytrocytů, které jsou negativní pro daný antigen. Je-li identifikována jedna protilátka, je důležité se ujistit, že nebyla opomenuta přítomnost dalších klinicky významných protilátek. Použití doplňujících technik jako např. ET a chladového solného testu může pomoci zejména při identifikaci protilátek, které reagují slabě v NAT nebo při směsi protilátek. Většina protilátek prokazatelných pouze ET nemá pravděpodobně klinický význam, přesto by specifický nález neměl být ignorován.

Chemikálie, reagenty: Identifikační panel erytrocytů ID-DiaPanel (výrobce: BIO-RAD), identifikační panel erytrocytů ID-DiaPanel-P (výrobce: BIO-RAD), identifikační panel erytrocytů Makropanel-16 (výrobce: Sanquin), ID-Karty LISS/Coombs, ID-Karty NaCl/enzymový a chladový test, ID-Diluent 1 (modifikovaný Bromelin roztok), ID-Diluent 2 (modifikovaný LISS roztok), ID-Papain (roztok pro papainizaci erytrocytů), panely erytrocytů ID-DiaPanel a ID-DiaPanel-P jsou již naředěny na pracovní koncentraci 0,8%. Proto se již nemusí ředit. Oba panely obsahují stejných 11 typů erytrocytů. Panely jsou uloženy v základním balení v chladničce. Protokoly panelu jsou označeny jako ZÁKLADNÍ PANEL. ID-DiaPanel slouží k vyšetření v NAT. ID-DiaPanel-P obsahuje papainizované erytrocyty a slouží k vyšetření v ET. Identifikační panel erytrocytů Makropanel-16 je uložen v základním balení v chladničce v laboratoři části speciální imunohematologie laboratoří TO. Používá se jako doplňkový tam, kde s panelem ID-DiaPanel nelze vyšetření uzavřít. Protokoly panelu jsou označeny jako DOPLŇUJÍCÍ PANEL. U Makropanelu-16 musíme připravit

0,8-1% suspenzi 1× propraných erytrocytů Makropanelu v ID-Diluentu 2 (1 ml Diluentu 2 + 10ul sedimentu erytrocytů). Identifikační panel naředěný na pracovní ředění je použitelný 24 hodin po naředění.

Spotřební materiál: aglutinační zkumavky (skleněné, plastové) a Wassermannovy zkumavky (skleněné, plastové), jednorázové 3ml pipety, pasteurovy pipety, špičky, rukavice

Přístroje a pomocná zařízení: laboratorní centrifuga na centrifugaci zkumavek, mikroskop, pipetor, termostat, ID-inkubátor, ID-centrifuga

Podrobný postup vyšetření

Plazma nebo sérum pacienta se vyšetřuje aglutinačními metodami na ID-kartách s panely erytrocytů s určenými antigeny sestavenými tak, aby vylučovací metodou podle negativních a pozitivních reakcí bylo ve většině případů u pacienta možné určit specifitu volných protilátek (aloprotilátky nebo autoprotílátky). U autoprotílátek se velmi často nepodaří specifitu určit (reagují většinou se všemi erytrocyty identifikačních panelů).

Vyšetření se skládá ze dvou částí:

- Vlastní identifikace protilátek s vyšetřením autologní kontroly (pokud nebyla vyšetřena při screeningu)
- Podle specifity prokázaných aloprotilátek (negativní autologní kontrola) se u pacienta provede vyšetření antigenů, proti nimž jsou zjištěné protilátky namířeny. Pacient nemůže mít antigen, proti němuž je namířena aloprotilátka. U autoprotílátek o vyšetření antigenů pacienta rozhoduje pověřený lékař.

Provedení identifikace antierytrocytárních protilátek ZÁKLADNÍM panelem v NAT:

- U pacientů s pozitivním screeningem antierytrocytárních protilátek.

- U pacientů s již známou protilátkou, vyšetřenou v Laboratořích TO NEMCB, pokud tato protilátka byla prokázána v NAT.

Provedení identifikace antierytrocytárních protilátek ZÁKLADNÍM panelem v ET:

- U pacientů s pozitivním screeninem antierytrocytárních protilátek.
- U pacientů s již známou protilátkou, vyšetřenou v Laboratořích TO NEMCB, pokud tato protilátka byla prokázána v ET.

Provedení identifikace antierytrocytárních protilátek DOPLŇUJÍCÍM panelem v NAT:

- U pacientů pozitivním screeninem antierytrocytárních protilátek, kde nebylo možné jednoznačně identifikovat protilátku ZÁKLADNÍM panelem v NAT.
- U pacientů s již známou protilátkou, vyšetřenou v Laboratořích TO NEMCB, pokud tato protilátka byla prokázána v NAT DOPLŇUJÍCÍM panelem (protilátka není jednoznačně identifikovatelná ZÁKLADNÍM panelem)

Provedení identifikace antierytrocytárních protilátek DOPLŇUJÍCÍM panelem v ET:

- U pacientů pozitivním screeninem antierytrocytárních protilátek, kde nebylo možné jednoznačně identifikovat protilátku ZÁKLADNÍM panelem v ET.
- U pacientů s již známou protilátkou, vyšetřenou v Laboratořích TO NEMCB, pokud tato protilátka byla prokázána v ET DOPLŇUJÍCÍM panelem (protilátka není jednoznačně identifikovatelná ZÁKLADNÍM panelem)

Současně s provedením identifikace se provede autologní kontrola („autokontrola“), pokud nebyla provedena při screeningu antierytrocytárních protilátek.

Identifikace antierytrocytárních protilátek ZÁKLADNÍM panelem

1) Před provedením identifikace protilátek je potřeba všechny reagenty vytemperovat na pokojovou teplotu.

- 2) Vzorek pacienta centrifugujeme při 3500-5000 otáčkách/minutu 5 minut, aby došlo k oddělení plazmy a erytrocytů.
- 3) ID-karty LISS/Coombs popíšeme příjmením pacienta, a jednotlivé mikrozkušavky popíšeme číslem diagnostických erytrocytů: 1-11.
- 4) ID-karty NaCl popíšeme příjmením pacienta a jednotlivé mikrozkušavky popíšeme číslem diagnostických erytrocytů: 1-11.
- 5) Diagnostické erytrocyty ID-DiaPanel před použitím jemně resuspendujeme. Nejprve napipetujeme na ID-kartu LISS/Coombs 50 µl diagnostických erytrocytů 1-11, k nim napipetujeme 25 µl plazmy pacienta.
- 6) Diagnostické erytrocyty ID-DiaPanel-P před použitím jemně resuspendujeme. Nejprve napipetujeme na kartu NaCl 50 µl diagnostických erytrocytů papainizovaných 1-11, k nim napipetujeme 25 µl plazmy pacienta.
- 7) ID-karty inkubujeme 15 minut v ID-inkubátoru při 37°C. ID-inkubátor vydá zvukový signál po uplynutí inkubační doby.
- 8) ID-karty centrifugujeme v ID-centrifuze, otáčky a doba centrifugace je pevně nastavena výrobcem.
- 9) Odečteme výsledek.
- 10) Výsledky zaznamenáme na pracovní protokol, který je dodávaný k panelům.

V rámci provedení identifikace protilátek je vhodné provést autologní kontrolu, pokud nebyla provedena při screeningu antierytrocytárních protilátek.

Identifikace antierytrocytární protilátky DOPLŇUJÍCÍM panelem

- 1) Před provedením identifikace protilátek je potřeba všechny reagenty vytemperovat na pokojovou teplotu.

- 2) Vzorek pacienta centrifugujeme při 3500-5000 otáčkách/minutu 5 minut, aby došlo k oddělení plazmy a erytrocytů.
- 3) ID-karty LISS/Coombs popíšeme příjmením pacienta, a jednotlivé mikrozkušavky popíšeme číslem diagnostických erytrocytů: 1-16.
- 4) ID-karty NaCl popíšeme příjmením pacienta a jednotlivé mikrozkušavky popíšeme číslem diagnostických erytrocytů: 1-16.
- 5) Diagnostické erytrocyty Makropanel-16 před použitím jemně resuspendujeme. Nejprve napipetujeme na ID-kartu LISS/Coombs 50 µl diagnostických erytrocytů 1-16, k nim napipetujeme 25 µl plazmy pacienta.
- 6) Diagnostické erytrocyty Makropanel-16 před použitím jemně resuspendujeme. Nejprve napipetujeme na kartu NaCl 50 µl diagnostických erytrocytů 1-16, k nim napipetujeme 25 µl plazmy pacienta a následně do všech mikrozkušavek napipetujeme 25 µl papainu.
- 7) ID-karty inkubujeme 15 minut v ID-inkubátoru při 37°C. ID-inkubátor vydá zvukový signál po uplynutí inkubační doby.
- 8) ID-karty centrifugujeme v ID-centrifuze, otáčky a doba centrifugace je pevně nastavena výrobcem.
- 9) Odečteme výsledek.
- 10) Výsledky zaznamenáme na pracovní protokol, který je dodávaný k panelu.

Hodnocení reakcí:

Pozitivní a negativní reakce se hodnotí stejně jako u vyšetření screeningu nepravidelných protilátek metodou gelové aglutinace.

Rozlišení na aloprotilátky a autoprotilátky:

Aloprotilátky:

- negativní autokontrola
- jen slabě pozitivní autokontrola (+/- až +), přičemž reakce s erytrocyty panelu jsou výrazně silnější než s erytrocyty pacienta.

Autoprotilátky:

- autokontrola zpravidla pozitivní na ++ až +++, nebo při slabší reakci v autokontrolě stejná síla reakcí s erytrocyty panelu i s erytrocyty pacienta. U pacienta mohou být zároveň přítomny autoprotilátky i aloprotilátky, přičemž silnější autoprotilátky mohou přítomnost aloprotilátek překrýt.

Určení specifity protilátek:

Princip hodnocení - pozitivní reakce jsou jen s erytrocyty nesoucími příslušný antigen a negativní reakce jsou jen s erytrocyty, které příslušný antigen nenesou. Vylučovací metodou se určí antigeny, proti nimž jsou protilátky v séru namířeny. Za spolehlivý se považuje průkaz specifity protilátky tehdy, když jsou k dispozici alespoň dva typy erytrocytů nesoucí antigen s pozitivní reakcí a dva typy erytrocytů bez antigenu s negativní reakcí. Existují specifity, kde u slabších protilátek bývají často negativní reakce s erytrocyty, nesoucími příslušný antigen v heterozygotní kombinaci. Při podezření na takovou protilátku je třeba se řídit v hodnocení identifikace především reakcemi s homozygotními erytrocyty. Nejčastější specifity s touto reaktivitou: anti-E, anti-M, anti-Jk(a), anti-Fy(a), anti-Fy(b). U velmi slabých protilátek může být tato reaktivita ve všech známých specifitách.

Specifita protilátky se zapisuje ve tvaru: anti-K, anti-Jk(a) apod. Vyšetření příslušných antigenů u pacienta slouží jako potvrzení, že u pacienta mohou být přítomny aloprotilátky se specifitou, zjištěnou podle vyhodnocení identifikačních panelů. Pacient

nemůže nést antigen, proti němuž je namířena aloprotilátka. (Řízená dokumentace TO NEMCB)

3.2.4 Manuální vyšetření kompatibility transfúzního přípravku obsahující erytrocyty metodou gelové aglutinace

Princip vyšetření

Jedná se o zkoušku plazmy příjemce s erytrocyty transfúzního přípravku (erytrocyty dárce). Cílem vyšetření kompatibility je zajistit příjemci podání takového transfúzního přípravku, který bude dostatečně dlouho přežívat v krevním oběhu příjemce a nepovede ke klinicky významné destrukci dárcovských krvinek. Rutině se test kompatibility provádí metodou s citlivostí odpovídající LISS/Coombs (NAT) při 37°C. Test se provádí sloupcovou aglutinací. Test kompatibility enzymovým testem není standardním postupem. Součástí testu kompatibility je ověření AB0 RhD transfúzního přípravku.

Chemikálie, reagentie a spotřební materiál: ID–Karty LISS/Coombs (pro NAT), ID–karty NaCl (pro ET), ID–Diluent 2 (Modifikovaný LISS pro přípravu suspenze erytrocytů), ID–Papain (Papainový roztok připravený k přímému použití pro úpravu krvinek papainem do autokontroly), špičky, rukavice.

Přístroje a pomocná zařízení: laboratorní centrifuga na centrifugaci zkumavek, pipetor, ID–inkubátor, ID–centrifuga.

Test kompatibility NAT

- 1) Před provedením testu kompatibility je potřeba všechny reagentie vytemperovat na pokojovou teplotu.
- 2) Vzorek pacienta centrifugujeme při 3500 –5000 otáčkách/minutu 5 minut, aby došlo k oddělení plazmy a erytrocytů.
- 3) Wassermannovu zkumavku popíšeme číslem transfúzního přípravku.

- 4) Do popsané Wassermannovy zkumavky připravíme 0,8% suspenzi erytrocytů transfúzního přípravku v Diluentu 2.
- 5) ID-kartu LISS/Coombs popíšeme příjmením pacienta, a jednotlivé mikrozkušavky popíšeme čísly transfúzních přípravků, které chceme pacientovi nakřížit.
- 6) Nejprve napipetujeme na ID-kartu LISS/Coombs 50 μ l 0,8% suspenzi erytrocytů transfúzního přípravku v Diluentu 2. K erytrocytům napipetujeme 25 μ l plazmy pacienta.
- 7) ID-kartu inkubujeme 15 minut v ID-inkubátoru při 37°C. ID-inkubátor vydá zvukový signál po uplynutí inkubační doby.
- 8) ID-kartu centrifugujeme v ID-centrifuze, otáčky a doba centrifugace je pevně nastavena výrobcem.
- 9) Odečteme-výsledek.

Hodnocení reakcí

Pozitivní reakce: aglutinované erytrocyty vytváření na povrchu gelu linku nebo jsou rozptýleny v gelu, reakce je hodnocena + až +++++. V některých případech se mohou vyskytnout i reakce +/-nebo reakce stopové. V případě, že je test kompatibility pozitivní je třeba myslet na:

- Protilátku proti antigenu s nízkou frekvencí výskytu.
- Imunoglobuliny vázané na erytrocyty transfúzního přípravku, je vhodné provést PAT s dárcovskými erytrocyty.
- Chybu při výběru erytrocytového transfúzního přípravku s inkompatibilní krevní skupinou AB0.
- Protilátky proti leukocytům.

Negativní reakce: kompaktní sediment erytrocytů na dně zkumavky.

Platnost testu kompatibility je nejdéle 72 hodin, počítáno od doby provedení odběru vzorku pacienta. V případě potřeby transfúze pro daného pacienta po uplynutí této lhůty je nutno provést test kompatibility z nového vzorku odebrané krve a na základě nové žádanky. Platnost testu kompatibility lze prodloužit u pacientů, kteří nebyli prokazatelně v posledních 3 měsících vystaveni riziku imunizace. Tento anamnestický údaj musí být uveden na žádance jasnou formou. Vlastní test kompatibility musí být ale proveden ze vzorku odpovídající kvality (nesmí být starší 7 dnů).

Uchovávání vzorků po analýze: vyšetřované krevní vzorky uchováváme 7 dní ve stojanech označených datem příslušného dne při teplotě 2-8°C. (Laboratorní příručka, Řízená dokumentace TO NEMCB)

Přímý antiglobulinový test (PAT)

Přímým antiglobulinovým testem se ověřuje, zdali jsou erytrocyty senzibilizovány protilátkami in vivo. Přímý antiglobulinový test se provádí s polyspecifickým antiglobulinovým sérem AHG, které obsahuje anti-IgG a anti-C3d protilátky. Toto vyšetření se provádí metodou sloupcové aglutinace.

Chemikálie a reagenty: ID-karta LISS/Coombs, ID-Diluent 2, fyziologický PBS roztok, špičky, rukavice.

Přístroje a pomocná zařízení: ID-centrifuga, pipetor.

- 1) Před provedením testu kompatibility je potřeba všechny reagenty vytemperovat na pokojovou teplotu.
- 2) Vzorek pacienta centrifugujeme při 3500 –5000 otáčkách/minutu 5 minut, aby došlo k oddělení plazmy a erytrocytů.
- 3) Wassermannovu zkumavku popíšeme číslem transfúzního přípravku. Vyšetřované erytrocyty je nutné promýt PBS roztokem.
- 4) Do popsané Wassermannovy zkumavky připravíme 0,8% suspenzi vyšetřovaných erytrocytů pacienta v ID-Diluentu 2.

- 5) ID-kartu popíšeme příjmením pacienta.
- 6) Napipetujeme na ID-kartu LISS/Coombs 50 ml 0,8% suspenze vyšetřovaných erytrocytů.
- 7) Centrifugujeme v ID-centrifuze 10 min při 905 RPM.
- 8) Odečteme výsledek.

Hodnocení reakcí:

Pozitivní reakce: aglutinované erytrocyty jsou rozptýleny v gelu nebo vytvářejí na povrchu gelu linku. Reakce je hodnocena + až 4+, mohou se vyskytovat i reakce slabší +-. Pozitivní reakce indikuje senzibilizaci erytrocytů pacienta.

Negativní reakce: vyšetřovaná erytrocyty tvoří kompaktní sediment na dně zkumavky. Negativní reakce indikuje nepřítomnost detekovatelných IgG protilátek nebo C3d složky komplementu na erytrocytech. (Řízená dokumentace TO NEMCB)

4. Výsledky

Výsledky jsou vyhodnoceny za období od 1. 9. 2015 do 31. 12. 2020. Jde jednak o výsledky z laboratoře krevní banky TO NEMCB (127 vzorků) a dále o 405 vzorků z menších pracovišť Jihočeského kraje, které byly zaslány na TO NEMCB k předtransfúznímu vyšetření pro pozitivní screening antierytroctárních protilátek v ET. Jedná se o pracoviště Krevní banka Tábor, Transfúzní oddělení Jindřichův Hradec, Krevní banka Prachatice, Krevní banka Český Krumlov, Transfúzní oddělení Písek, Krevní banka Strakonice, Transfúzní oddělení Pelhřimov. (viz Tabulka 5)

Laboratoře transfúzního oddělení NEMCB jako spádové pracoviště Jihočeského kraje vyšetřuje identifikace protilátek ze vzorků zaslaných právě z výše vyjmenovaných pracovišť, která většinou stále standardně vyšetřují screening protilátek v ET i NAT.

- České Budějovice – systém firmy BIO-RAD, standardně screening v NAT, doplňkově v ET (enzym papain)
- Tábor – ID-systém firmy BIO-RAD, standardně screening v NAT i v ET (enzym papain)
- Jindřichův Hradec – ID-systém firmy BIO-RAD, standardně screening v NAT i v ET (enzym papain)
- Prachatice - systém Ortho BioVue, standardně screening v NAT i v ET (enzym ficin)
- Český Krumlov – ID-systém firmy BIO-RAD, standardně screening v NAT i v ET (enzym papain)
- Písek – ID-systém firmy BIO-RAD, standardně screening v NAT i v ET (enzym papain), vyšetřují i identifikace protilátek, na TO NEMCB posílají pouze vybrané vzorky

- Strakonice - systém Ortho BioVue, standardně screening v NAT i v ET (enzym ficin), vyšetřují i identifikace protilátek, na TO NEMCB posílají pouze vybrané vzorky
- Pelhřimov – ID-systém firmy BIO-RAD, standardně screening v NAT, doplňkově v ET (enzym papain), vyšetřují i identifikace protilátek, na TO NEMCB posílají pouze vybrané vzorky

Po telefonické domluvě se krevní vzorek pozitivní v ET dopraví k vyšetření do Laboratoře TO NEMCB, kde se vyšetří screening protilátek v ET i NAT a identifikace protilátek (IP) v ET i NAT pomocí identifikačního panelu. Díky tomu, že většina okresních transfúzních laboratoří nebo krevních skladů stále standardně vyšetřuje screening protilátek před podáním transfúze i v enzymatickém testu, zachytávají nespecifické reakce, které nejsou klinicky významné a celé vyšetření jen prodlouží a zvýší se finanční náklady na vyšetření. Pokud už se jednou zjistí pozitivní screening v ET, při opakovaných vyšetřeních se vždy v ET vyšetřuje.

Výsledky vyšetření jsem vyhodnotila podle následujících kritérií:

- Výsledky screeningu protilátek v ET vyšetřených Laboratoří TO NEMCB negativní/pozitivní
- U pozitivních výsledků provedená identifikace protilátek, výsledek nespecifická/specifická reakce v ET
- Typy jednotlivých nespecifických reakcí
- U specifických reakcí typ protilátky
- Časová a finanční náročnost vyšetření

Tabulka 5 - Celkové výsledky

	Negativní výsledek	Nespecifická reakce v ET				Specifická reakce v ET	celkem
		Nespecifita v ET	Citlivost v ET	Autoprotilátky v ET	Chladové protilátky		
České Budějovice	0	29	0	52	0	46	127
Tábor	36	46	22	10	1	46	161
Jindřichův Hradec	1	50	15	5	0	16	87
Prachatice	42	12	7	2	0	12	75
Český Krumlov	25	15	3	4	0	9	56
Strakonice	2	4	0	3	0	5	14
Písek	0	2	0	3	0	1	6
Pelhřimov	0	0	0	4	0	2	6
celkem	106	158	47	83	1	137	532

Zdroj: Vlastní výzkum

4.1 Výsledky protilátek v ET vyšetřených Laboratoří TO NEMCB

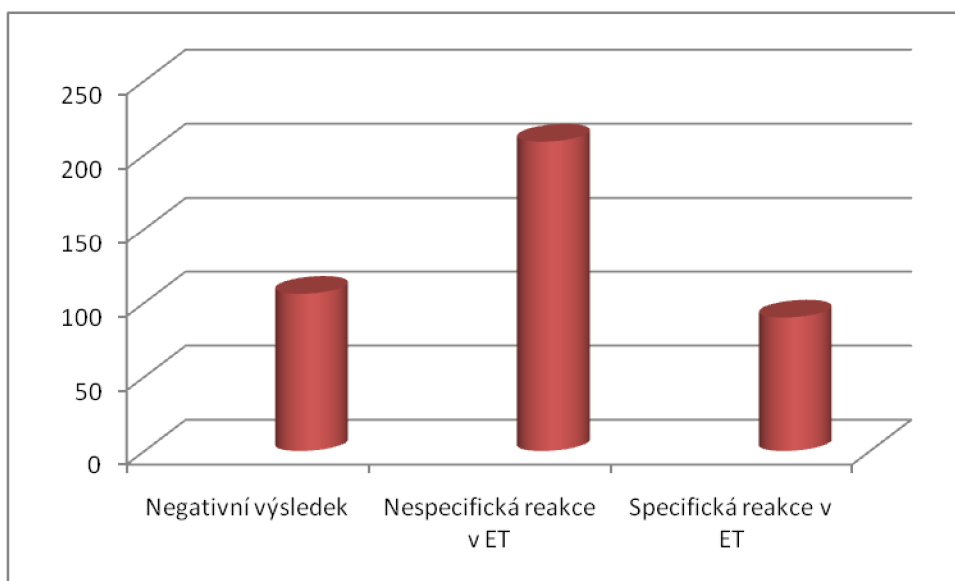
a) Vzorky poslané z externích pracovišť

Od 1.9.2015 do 31.12.2020 bylo v Laboratoři transfúzního oddělení NEMCB vyšetřeno 405 vzorků s nahlášenou pozitivní reakcí v ET. 106 z nich bylo po opakovaném vyšetření screeningů v ET i NAT a identifikace protilátek v ET i NAT zcela negativní. Dalších 208 vzorků prokazovalo nespecifickou reakci v ET a 91 bylo určených jako protilátka jasně specifity. (viz Tabulka 6, Obrázek 7)

Tabulka 6 – Výsledky vyšetření protilátek zaslaných z externích pracovišť

Negativní výsledek	Nespecifická reakce v ET	Specifická reakce v ET
106	208	91

Zdroj: Vlastní výzkum



Obrázek 7 – Grafické znázornění dle Tabulky 6 (Zdroj: Vlastní výzkum)

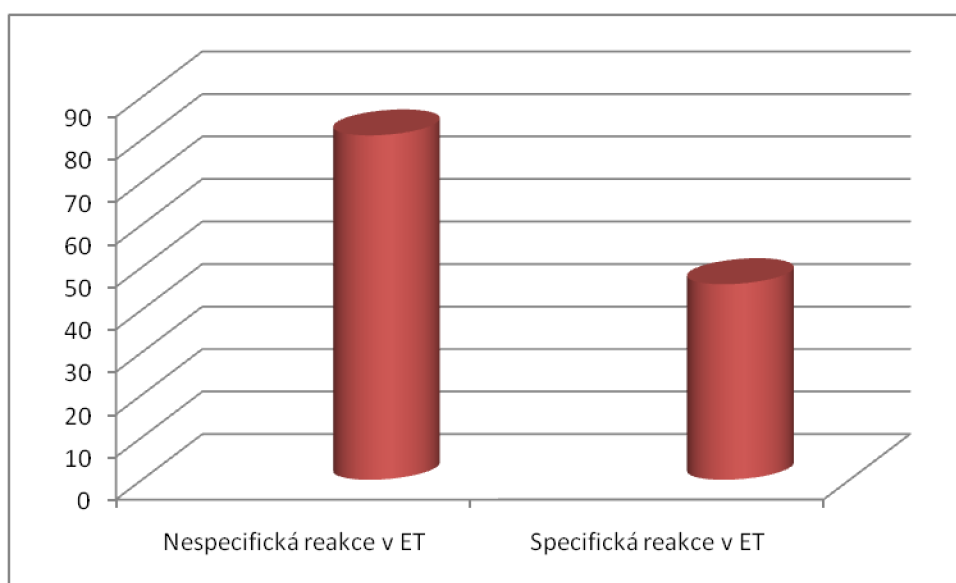
b) Vzorky z laboratoře krevní banky TO NEMCB

Od 1.9.2015 do 31.12.2020 bylo v laboratoři krevní banky TO NEMCB zachyceno 127 pozitivních vzorků na imuno hematologickém analyzátoru IH-500, které byli následně vyšetřeny manuálně v ET i v NAT → NAT negativní, ET pozitivní. 81 vzorků prokazovalo nespecifickou reakci v ET a 46 bylo určených jako protilátka jasné specificity. (viz Tabulka 7, Obrázek 8)

Tabulka 7 - Výsledky vyšetření protilátek z laboratoře krevní banky

Nespecifická reakce v ET	Specifická reakce v ET
81	46

Zdroj: Vlastní výzkum



Obrázek 8 – Grafické znázornění dle Tabulky 7 (Zdroj: Vlastní výzkum)

4.2 Nespecifické reakce v ET

Nespecifické reakce v ET rozlišujeme podle síly reakce s diagnostickými erytrocyty a pozitivitu vlastní autokontroly (AK). Pokud se reakce v síle liší, objevují se ++, + a +- reakce a AK v ET může být i negativní, ale screening a identifikace protilátek (IP) v NAT jsou negativní, jedná se o nespecifické protilátky v ET.

V případě podezření na chlادové protilátky je potřeba vyšetření opakovat s nahřátými reagensy na 37°C (vč. ID-kartě a špiček). Pokud se reakce zeslabí nebo je dokonce vyšetření negativní, jedná se o chladové protilátky.

Pokud jsou pozitivní reakce v mikrozkuhavce na ID-kartě stejné, +++, +++ a AK v ET je také pozitivní, jedná se o citlivost na enzym používaný při ET. U IP je pozitivita v ET, NAT je negativní.

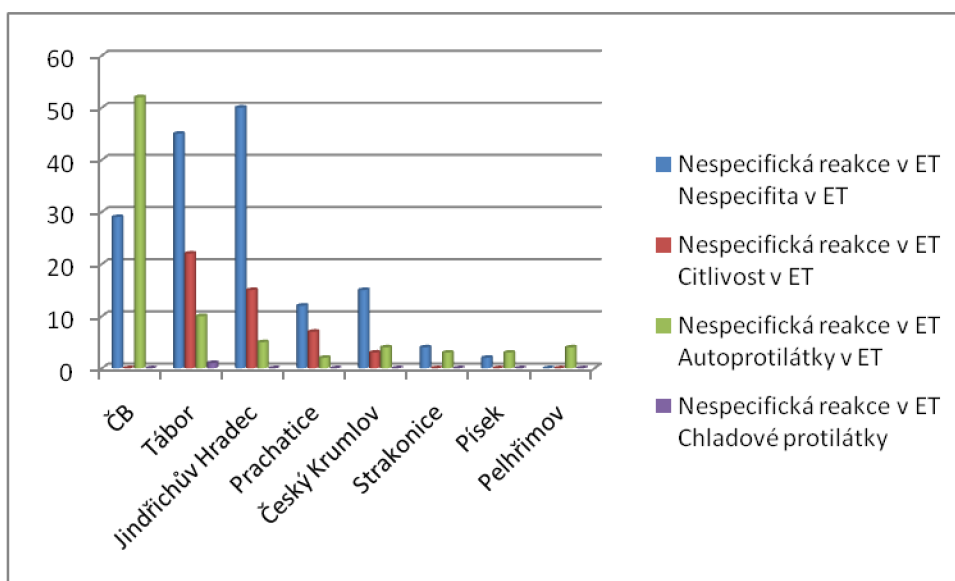
U autoprotilátek v ET je pozitivní ET s diagnostickými erytrocyty i v AK, důležité je vyšetřit PAT, který prokáže přítomnost navázaných vlastních krvinek. Vyšetření v NAT je negativní.

Výsledky znázorňuje Tabulka 8 a Obrázek 9 a 10.

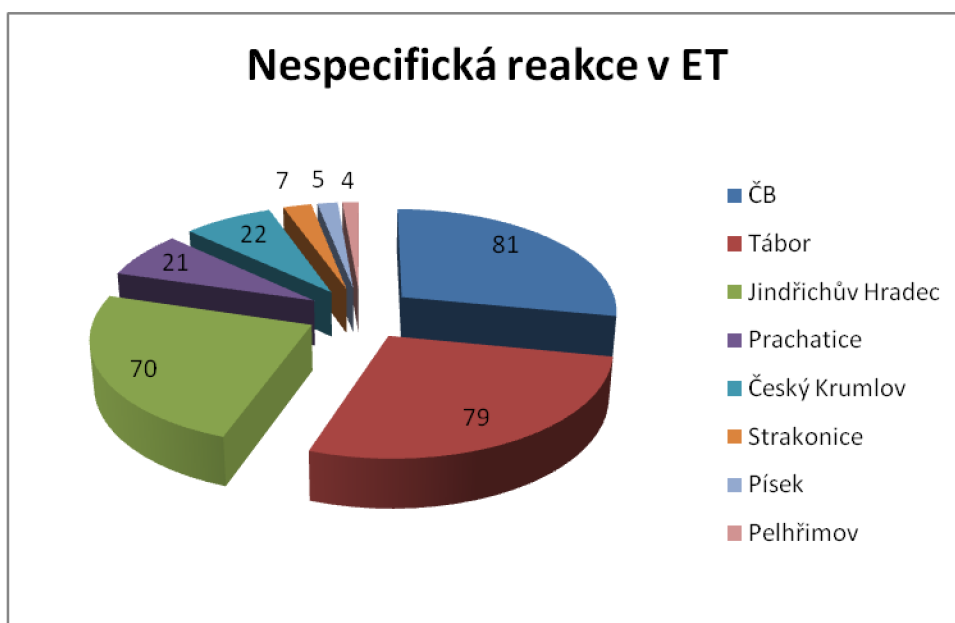
Tabulka 8 – Výsledky zachycených nespecifických reakcí v enzymatickém testu

	Nespecifická reakce v ET				celkem
	Nespecifita v ET	Citlivost v ET	Autoprotilátky v ET	Chladové protilátky	
ČB	29	0	52	0	81
Tábor	46	22	10	1	79
Jindřichův Hradec	50	15	5	0	70
Prachatice	12	7	2	0	21
Český Krumlov	15	3	4	0	22
Strakonice	4	0	3	0	7
Písek	2	0	3	0	5
Pelhřimov	0	0	4	0	4
celkem	158	47	83	1	289

Zdroj: Vlastní výzkum



Obrázek 9 – Grafické znázornění dle Tabulky 8 (Zdroj: Vlastní výzkum)



Obrázek 10 – Výsledky nespecifických reakcí v enzymatickém testu dle jednotlivých pracovišť (Zdroj: Vlastní výzkum)

4.3 Protilátky jasně specifity

a) Vzorky poslané z externích pracovišť

Ze zaslanych 405 vzorků bylo 91 určených jako protilátka jasně specifity. Nejčastěji se vyskytovaly protilátky v Rh systému:

anti-E 35

anti-Lea 13

anti-Cw 11

anti-C 9

směs protilátek 7

anti-Leb 5

anti-D 5

anti-P1 2

anti-c 2

anti-H 1

anti-K 1

Zastoupení specifických protilátek v jednotlivých externích laboratořích:

Strakonice anti-D 1

anti-Lea 1

anti-E 1

anti-Cw 1

směs protilátek 1 (anti-E, anti-c)

Pelhřimov	anti-C 1
	anti-E 1
J. Hradec	anti-Lea 2
	anti-P1 1
	směs protilátek 2 (anti- E, anti-c, anti-Lea)
	anti-Cw 2
	anti-E 8
	anti-C 1
Prachatice	anti-E 5
	anti-K 1
	anti-Leb 1
	anti-Lea 1
	anti-C 3
	anti-D 1
Č. Krumlov	anti-Lea 1
	anti-C 2
	anti-Cw 1
	anti-E 2
	anti-P1 1
	směs protilátek 2 (anti- C, anti-E, anti- Lea, anti-c)
Písek	anti-E 1

Tábor

- anti-E 17
- anti-c 2
- anti-C 2
- anti-Lea 9
- anti-H 1
- anti-D 3
- anti-Cw 7
- anti- Leb 3
- směs protilátek 2 (anti-c, anti-E, anti-Lea)

b) vzorky z laboratoře krevní banky TO NEMCB

Z vyšetřených 127 vzorků bylo 46 určených jako protilátka jasné specifity:

- anti-E 15
- anti- Cw 10
- anti-Lea 7
- směs protilátek 5 (anti-Cw, anti-Lea, anti-E, anti-Leb)
- anti-Leb 3
- anti-H 2
- anti-D 2
- anti-c 1
- anti- Jka 1

4.4 Časová a finanční náročnost vyšetření nespecifických reakcí

Doba trvání předtransfúzního vyšetření manuální metodou:

Po příjmu a zadání žádanky a vzorku do IS se zkumavka centrifuguje - po dobu 5 minut.
Po oddělení plazmy od krvinek se vyšetří krevní skupina - nakapání a centrifugace - 3 minuty

Vlastní screening - napipetování diagnostik a plazmy - 5 minut

Inkubace v ID-inkubátoru - 15 minut

Centrifugace – 10 minut

→ Celková doba trvání – 38 minut

Při zjištění pozitivního screeningu v ET:

Napipetování IP v ET i NAT – 10 minut

Inkubace v ID-inkubátoru 15 minut

Centrifugace – 10 minut

→ Předtransfúzní vyšetření se prodlouží o 35 minut na celkovou dobu 73 minut. Pokud je vzorek na předtransfúzní vyšetření posílán z externího pracoviště, je k tomuto času nutné připočítat i dobu transportu vzorku, což je i několik hodin. Celou tu dobu pacient čeká na výsledek předtransfúzního vyšetření a podání transfúze.

Pokud se jedná o nespecifické reakce v ET, externí laboratoř si po nahlášení negativního výsledku, test kompatibility provede sama. Pokud to neučiní, čas na přípravu transfúze se prodlouží cca. dalších 30 minut (výběr transfúze, příprava náplavu erytrocytů, napipetování 5 minut, inkubace 15 minut, centrifugace 10 minut)

Ceny jsou vyčíslené od pojišťoven. Zahrnují spotřební materiál, diagnostika a práci laboranta. Samostatnou složkou jsou od pojišťoven jednotlivě proplácené výkony, které se od těchto cen liší. Některá vyšetření pojišťovny proplácí pouze jednou, i když se provádí v obou testech např. IP v ET a NAT. Na cenu vyšetření také nemá vliv, jestli se jedná o manuální vyšetření nebo o automatizované. Nespornou výhodou je, že u vyšetření v analyzátoru odpadá možné selhání lidského faktoru.

Ceník jednotlivých vyšetření: STANDARDNĚ/STATIM

KS+Rh 190,-/324,-

Screening nepravidelných protilátek v ET 91,-/178,-

Screening nepravidelných protilátek v NAT 160,-/367,-

IP v ET 1389,-

IP v NAT 1389,-

TK 84,-

Cena předtransfúzního vyšetření bez ET ve standardním režimu:

KS+Rh+Screening v NAT+TK (190+160+84=434,-)

Pokud v Laboratoři TO NEMCB vyšetřujeme krevní vzorek poslaný z externí laboratoře po nahlášení pozitivního výsledku při předtransfúzním vyšetření, dodržujeme jejich pracovní postup a to v tom, že screening nepravidelných protilátek vyšetřujeme i v ET. Tímto se vyšetří KS+Rh+Screening v ET, Screening v NAT, IP v ET, IP v NAT a to vždy ve STATIM režimu tzn. (324+178+367+1389+1389=3647)

Ve standardním režimu by vyšetření stálo 3219,-.

Pokud vezmeme v potaz, že ze 405 vzorků, bylo 106 nahlášeno z externího pracoviště jako pozitivní a v TO NEMCB vyšetřeno s negativním výsledkem, u všech 106 se provedlo předtransfúzní vyšetření ve STATIM režimu za 3647,- (celkem 386 582,-)

5. Diskuze

V bakalářské práci jsem se zabývala nespecifickými reakcemi u předtransfúzního vyšetření. Od roku 2012 TO NEMCB screening nepravidelných protilátek v ET standardně nevyšetřuje, pouze u polymorbidních pacientů, po transplantacích, u onkologických pacientů, u pacientů s již určenou protilátkou a u pacientů s reakcí po transfúzi. Proto jsem se v bakalářské práci zaměřila na výsledky vyšetření zaslaných z externích pracovišť, které v případě pozitivního předtransfúzního screeningu zasílají vzorek k dovyšetření na TO NEMCB. Externí laboratoře nedodržují Doporučení č. STL2011_07, které vydala Společnost pro transfúzní lékařství ČLS JEP a screening provádí v ET i NAT. Pokud je screening pozitivní v ET, vzorek posílají na TO NEMCB, kde se vyšetří screening a IP v ET i NAT a podle požadavku externího pracoviště se vyšetří i test kompatibility.

Od 1. 9. 2015 - 31. 12. 2020 jsem shromáždila veškeré pozitivní reakce v ET, které se na TO NEMCB vyšetřovaly. Vzorky jsem rozdělila podle výsledků vyšetření, pracoviště, specifické nebo nespecifické reakce. Tyto údaje jsem zaznamenala do tabulek a grafů. Za toto časové období se na TO NEMCB vyšetřilo z externích pracovišť 405 vzorků s pozitivním screenigem v ET. 106 z nich bylo při vyšetření na TO NEMCB určeno jako negativní. 208 vzorků bylo nespecificky pozitivních a 91 se specifickými protilátkami.

Nespecifické reakce v ET jsem hodnotila i podle síly dané reakce při vyšetření metodou sloupcové aglutinace, pro lepší rozlišení mezi nespecifickou reakcí v ET a citlivostí vzorku pacienta na příslušný enzym používaný při ET. Nespecifických reakcí z externích laboratoří bylo 129, citlivostí na enzym 47, autoprottilátek 31 a 1 chladové prottilátky.

Specifických prottilátek bylo 91, nejčastěji se vyskytovala anti-E a anti-Le(a).

Laboratoř TO NEMCB měla 127 pozitivních vzorků v ET, z toho 46 specifických reakcí s nejčastěji určenou protilátkou anti-E a anti-Cw. Nespecifických reakcí bylo 81, z toho 52 autoprottilátek a 29 nespecifických reakcí.

Časová náročnost se při vyšetření vzorku zasláního z externí laboratoře zvýšila o 100%. Z původních 35 minut vyšetření screeningu nepravidelných protilátek v NAT, na 73 minut vyšetření screeningu v ET i NAT, IP v ET i NAT.

Finanční náročnost je výrazná. Pokud se dovyšetřuje pozitivní screening zasláního z externí laboratoře, vyšetřuje se screening i IP v ET i NAT, což zvýší náklady o 2785,-. Pokud se vzorek vyšetřuje ve statim režimu, cena se ještě zvýší o 434,-.

Z dodaného souboru vzorků s pozitivním výsledkem protilátek v ET v rámci předtransfúzního vyšetření z laboratoří pracovišť Jihočeského kraje vyplývá, že ET je prováděn jako rutinní vyhledávací test protilátek, který se provádí společně s testem LISS/NAT. Tato praxe je v rozporu s Doporučením STL pro předtransfúzní vyšetření, kde ET je vyhrazena funkce doplňkového testu v případě nejasného výsledku rutinně prováděným testem LISS/NAT. Naskýtá se otázka proč je tato praxe tak rozšířena i přes odborné doporučení, které vychází i z mezinárodních doporučení (Velká Británie, Německo, Rakousko a jiné).

Domnívám se, že snahou je získat maximální jistotu v rámci předtransfúzního vyšetření, kdy transfúzní přípravek je vydán pouze s negativním výsledkem ve všech dostupných testech zároveň. Tato praxe může být vysvětlena tím, že pracovníci v laboratořích zvláště o pohotovostních službách chtějí mít tzv. maximální jistotu o výsledku vyšetření protilátek.

Je však mezinárodně ověřenou zkušeností, že test LISS/NAT v rutinní praxi spolehlivě zachycuje klinicky významné protilátky. Současné nasazení ET jako vyhledávacího při jeho případné pozitivitě na pracovišti, které nemůže dále provést rozšířené imunohematologické vyšetření, může příjemce transfúze naopak ohrozit. Není-li vydán transfúzní přípravek na pracovišti, které provádí předtransfúzní vyšetření a vzorek je odeslán k dalšímu podrobnějšímu vyšetření na jiné pracoviště, může dojít pro příjemce v některých případech k významné časové prodlevě z hlediska nutného podání transfúze. V tom tkví hlavní riziko takto prováděné praxe. Ne bezvýznamná je i ekonomická stránka. V případě nutnosti opakovat předtransfúzní vyšetření s eventuelně

rozšířenou paletou testů na jiném pracovišti se významně prodražuje i ekonomie procesu. Je vhodné také uvést, že i případně nalezené specifické protilátky v ET, které nejsou zároveň potvrzeny v LISS/NAT mají velmi malou klinickou významnost z hlediska možných nežádoucích účinků podané transfúze. (Lapierre, Rigal et al., 1990; Pujol, Sancho et al., 2002)

6. Závěr

Vyšetřovaným souborem vzorků z předtransfúzního vyšetření protilátek ET se potvrdila hypotéza, že pozitivní výsledky jsou většinou způsobeny nespecifickými reakcemi v ET. Z vyšetřovaných 406 vzorků jich bylo jen 91 se specifickou protilátkou.

Nejčastější specifickou protilátkou určenou v ET byla anti-E a anti- Le(a).

Potvrdila se i druhá hypotéza, že více jak 50% nespecifických reakcí v ET je způsobeno reakcí s daným enzymem používaným v ET.

Enzymový test není vhodným rutinním vyšetřovacím testem pro vyhledávání klinicky významných nepravidelných protilátek při předtransfúzním vyšetření. Jeho zařazením do rutinního vyhledávajícího vyšetření protilátek nad rámec Doporučení odborné Společnosti pro transfúzní lékařství může být pro příjemce transfúze kontraproduktivní hlavně z hlediska možné časové prodlevy, finančních nákladů bez efektu výraznější klinické významnosti z hlediska bezpečnosti pro příjemce transfúze erytrocytů.

Neznamená to však, že v transfúzní praxi už ET nemá své místo. ET by se měl používat jako doplňkový test při dalším dovyšetření v případě pozitivního screeningu v NAT a samozřejmě u pacientů po transplantacích, s reakcí po transfúzi, onkologických a polymorbidních pacientů.

Byla bych ráda, kdyby bakalářská práce sloužila pro externí laboratoře jako podklad pro rozhodnutí vyřadit enzymatický test z rutinního provozu a tím snížit počet pozitivních vzorků, resp. snížit náklady za vyšetření odeslané do referenční laboratoře k dovyšetření a hlavně snížit časovou prodlevu před podáním transfúzního přípravku pacientovi.

7. Seznam literatury

- 1) BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2011. 172 s. ISBN 978-80-247-3533-7.
- 2) BIO-RAD. *BIO-RAD* [online]. Copyright © 2021 [cit. 2021-08-02]. Dostupné z: https://www.bio-rad.com/en-cz/corporate/newsroom/bio-rad-introduces-ih-500-fully-automated-random-access-system-for-blood-typing-screening?ID=Bio-Rad-Introduces-t_1438620555
- 3) BOBEK, Karel. *Vnitřní lékařství - učební text pro střední zdravotnické školy (obor zdravotních sester). Díl 1, Část obecná*. Praha: SZdN, 1963. 231 s.
- 4) ČECH, Evžen, Zdeněk HÁJEK, Karel MARŠÁL, Bedřich SRP a kol. *Porodnictví*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2006. 550 s. ISBN 80-247-1303-9.
- 5) ČERMÁKOVÁ, Zuzana, Martin KOŘÍSTKA a Alena MALUŠKOVÁ. *Imunohematologie*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2008. 69 s. ISBN 978-80-7368-600-0.
- 6) DELAFLORE-WEISS, Eduardo a Vladislav CHIZHEVSKY. *Implementation of Gel Testing for Antibody Screening and Identification in a Community Hospital, a 3-Year Experience*. *Laboratory Medicine*. 2005, **36**(8), 489-492. ISSN 0007-5027. Dostupné z: DOI:10.1309/JAP6EC69BAAUG9B3
- 7) Diamed. *Diamed* [online]. Copyright (b.r.) [cit. 2021-08-02]. Dostupné z: <http://www.diamed.com/>
- 8) Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_07 ze dne 1. 3. 2011 verze 3 (2014_03). Základní Imunohematologická laboratorní vyšetření červené řady – Obecné zásady a technické postupy. *Společnost pro transfuzní lékařství*. [online]. Copyright © 2021 [cit. 2021-08-02]. Dostupné z:

<https://www.transfuznispolecnost.cz/doporucene-postupy/zakladni-imunohematologicka-laboratorni-vysetreni-cervene-rady-obecne-zasady-a-technicke-postupy-235>

- 9) Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_08 ze dne 1. 3. 2011 verze 2 (2. 5. 2019). Předtransfuzní laboratorní vyšetření. *Společnost pro transfuzní lékařství*. [online]. Copyright © 2021 [cit. 2021-08-02]. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporucene-postupy/predtransfuzni-laboratorni-vysetreni-234>
- 10) Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2015_12 ze dne 01. 09. 2015 verze 1. Doporučené postupy pro podání transfuzních přípravků. *Společnost pro transfuzní lékařství*. [online]. Copyright © 2021 [cit. 2021-08-02]. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporucene-postupy/doporucene-postupy-pro-podani-transfuznich-pripravku-230>
- 11) ENGELFRIET, C. P., A. J. MEULENBROEK, et al. *Imunohematologie*. Amsterdam: Sanquin Blood Supply Foundation, 2003. 142 s. ISBN 90-5267-029-3.
- 12) FÁBRYOVÁ, Viera. *Imunohematológia a transfúzna medicína pre prax*. Praha: Grada, 2012. 232 s. ISBN 9788024743912.
- 13) Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components - 20. edice 2020. *Společnost pro transfuzní lékařství*. [online]. Copyright © 2021 [cit. 2021-08-02]. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/aktuality/guide-to-the-preparation-use-and-quality-assurance-of-blood-components-20-edice-2020-1717>
- 14) HÁJEK, Zdeněk, Evžen ČECH a Karel MARŠÁL. *Porodnictví*. 3., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2014. 580 s. ISBN 978-80-247-4529-9.
- 15) HOLEČEK, Václav, Luboslav STÁRKA, Emil BIELIK. *Biochemie*. Praha: Avicenum, 1983. 302 s.

- 16) HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTUŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton, 2017. 297 s. ISBN 978-80-7553-250-3.
- 17) HRUBIŠKO, Mikuláš a kol. *Hematologie a krevní transfuze II., Krevní transfuze*. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1983. 206 s.
- 18) KANDASAMY, Dhivya, Shamee SHASTRY, Deepika CHENNA a Ganesh MOHAN. Real eyes realizes real lies: A case report and review of nuisance antibodies in immunohematology. *Asian Journal of Transfusion Science*. 2018, **12**(2). ISSN 0973-6247. Dostupné z: doi:10.4103/ajts.AJTS_100_17
- 19) KOUT, Miroslav, Alexej MÁJSKÝ, Pavel HERZOG. *Vyšetřovací metody v imunohematologii*. Praha: Avicenum, 1975. 342 s.
- 20) KUBISZ Peter a kol. *Hematológia a transfuziológia: učebnica*. Praha: Grada, 2006. 323 s. ISBN 80-247-1779-4.
- 21) Laboratorní příručka. *Nemocnice České Budějovice, a. s.* [online]. Copyright © 2013 [cit. 2021-08-02]. Dostupné z: http://www.nemcb.cz/upload/files/transfuzni/NCB_TRS_SME_12_002_H.pdf
- 22) LAPIERRE, Y, D RIGAL, J ADAM, D JOSEF, F MEYER, S GREBER a C DROT. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion*. 1990, **30**(2), 109-113. ISSN 0041-1132. Dostupné z: doi:10.1046/j.1537-2995.1990.30290162894.x
- 23) MASOPUST, Jiří a Martin PÍSAČKA. *Praktická imunohematologie: erythrocyty*. Praha: Mladá fronta, 2016. Edice postgraduální medicíny. 392 s. ISBN 978-80-204-3740-2.
- 24) MOLLISON, P. L., C. P. ENGELFRIET and M. CONTRERAS: *Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8th ed.* Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1998. 1033 s.

- 25) NETOUŠEK, Miloš. Krevní převod. Praha: Nakladatelství spolku českých lékařů v Praze, 1945. 176 s.
- 26) PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství II*. Praha: Grada, 2012. 192 s. ISBN 978-80-247-3460-6.
- 27) PEREIRA, A a R MAZZARA. Enzyme techniques in pretransfusion testing. *Transfusion*. 1993, **33**(10), 884-884. ISSN 0041-1132. Dostupné z: doi:10.1046/j.1537-2995.1993.331094054629.x
- 28) PUJOL, M, JM SANCHOZ, MA ZARCO. The gel enzyme technique in pretransfusion antibody screening. *Haematologica*. 2002, **87**(10), 1119-1120. ISSN 0390-6078.
- 29) RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2., přepracované vydání. Praha: Galén, 2006. 329 s. ISBN 80-7262-324-9.
- 30) ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST. *Transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2013. 264 s. ISBN 978-80-247-4534-3.
- 31) Řízená dokumentace TO NEMCB.
- 32) SAKALOVÁ, Adriana, Tomáš LIPŠIC a kol. *Hematológia a transfuziológia: teória a cvičenia*. Martin: Osveta, 1995. 527 s. ISBN 80-217-0444-6.
- 33) SCHOTT, Heinz. *Kronika medicíny*. Praha: Fortuna Print, 1994. 648 s. ISBN 80-85873-16-8.
- 34) SMETANA, Karel a kol. *Hematologie a transfuziologie*. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1992. 162 s. ISBN 80-7013-112-8.
- 35) Tesařová, Eva a kol. *Vybrané kapitoly: Transfúzní lékařství a imunohematologie*. Brno: NCO NZO, 2007. 112 s.

36) Žádanka o imuno hematologické vyšetření a o transfuzní přípravky. *Nemocnice České Budějovice, a. s.* [online]. Copyright ©2013 [cit. 2021-08-02]. Dostupné z: https://www.nemcb.cz/upload/files/_adanka_2019.pdf

8. Seznam příloh a obrázků

Seznam obrázků:

Obrázek 1 – Výsledek vyšetření nespecifická reakce v enzymatickém testu, NAT negativní

Obrázek 2 – Identifikace protilátek – podezření na chladové protilátky

Obrázek 3 – Identifikace protilátek – výsledek po nahřátí

Obrázek 4 – Výsledek vyšetření – citlivost v enzymatickém testu, NAT negativní

Obrázek 5 – Výsledek vyšetření – autoprotilátky v enzymatickém testu, NAT negativní, PAT +++

Obrázek 6 – Hodnocení reakcí sloupcové aglutinace

Obrázek 7 – Grafické znázornění dle Tabulky 6

Obrázek 8 – Grafické znázornění dle Tabulky 7

Obrázek 9 – Grafické znázornění dle Tabulky 8

Obrázek 10 – Výsledky nespecifických reakcí v enzymatickém testu dle jednotlivých pracovišť

Seznam tabulek:

Tabulka 1 – Krevní skupiny AB0

Tabulka 2 - Určení krevní skupiny AB0 pomocí aglutinogenů a aglutininů

Tabulka 3 - Určení RhD

Tabulka 4 - Určení krevní skupiny AB0/RhD pomocí aglutinogenů

Tabulka 5 - Celkové výsledky

Tabulka 6 – Výsledky vyšetření protilátek zaslaných z externích pracovišť

Tabulka 7 - Výsledky vyšetření protilátek z laboratoře krevní banky

Tabulka 8 – Výsledky zachycených nespecifických reakcí v enzymatickém testu

Seznam příloh:

Příloha 1 – Žádanka o imuno hematologické vyšetření

Příloha 2 – Diagnostické erythrocyty pro screening protilátek od firmy BIO-RAD

Příloha 3 - Diagnostické erythrocyty pro identifikaci protilátek od firmy BIO-RAD

Příloha 4 - Diagnostické erythrocyty pro identifikaci protilátek od firmy Sanquin

Příloha 5 – Diagnostikum ID-Papain od firmy BIO-RAD

Příloha 6 – Diagnostikum ID-Diluent 1 (modifikovaný bromelin) a ID-Diluent 2 (modifikovaný LISS roztok) od firmy BIO-RAD

Příloha 7 – Laboratorní vybavení – centrifugy, ID-inkubátor, ID-centrifuga

Příloha 8 – Imuno hematologický analyzátor IH-500 od firmy BIO-RAD

Příloha 9 – Záznamový arch pro screening protilátek BIO-RAD

Příloha 10 - Záznamový arch pro identifikaci protilátek BIO-RAD – základní panel

Příloha 11 - Záznamový arch pro identifikaci protilátek Sanquin – doplňkový panel

Příloha 12 - Klinická závažnost protilátek proti erythrocytům


9. Seznam zkratek

AGH, AHG	anti humanum globulinum
AIHA	autoimunní hemolytická anémie
AK	autokontrola
CE	certifikát kvality
Ctl	monoklonální kontrola
č.	číslo
ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
DP	double population, dvojí populace
EDTA	protisrážlivý roztok, ethylenediaminetetraacetic acid
ET	enzymatický test
HLA	human leukocyte antigen
HON	hemolytické onemocnění novorozence
IČP	identifikační číslo pacienta
IČZ	identifikační číslo zařízení
Ig	imunoglobulin
IP	identifikace protilátek
KS	krevní skupina
LIS	laboratorní informační systém
LISS	solný roztok s nízkou iontovou koncentrací
NaCl	chlorid sodný

NAT	nepřímý antiglobulinový test
PAT	přímý antiglobulinový test
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PC	personal computer, osobní počítač
RPM	revolutions per minute, otáčky za minutu
STL	společnost pro transfúzní lékařství
TK	test kompatibility
TO NEMCB	Transfúzní oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s.

10. Přílohy

Příloha 1 – Žádanka o imuno hematologické vyšetření

 NEMOCNICE ČESKÉ BUDĚJOVICE, a.s.		Transfuzní oddělení Boženy Němcové 585/54, PSC 370 01, tel. číslo: 387 873 361									
		ŽÁDANKA O IMUNOHEMATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ A O TRANSFUZNÍ PŘÍPRAVKY									
Zde nalepte štítek nebo vyplňte Oddělení/ICZ: Příjmení: Jméno: Pohlaví: Rodné číslo: Dg.: Pojišťovna:		Anamnéza Krevní skupina Transplantace, Biologická léčba <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne kdy, jaká: Předchozí transfuze <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne kdy: Reakce po transfuzích <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne jaké: Imunní protilátky <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne jaké: Porody, potraty <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne kdy: Začátek hospitalizace datum:									
Druh primárního vzorku: krev Imuno hematologické vyšetření <input type="checkbox"/> Krevní skupina <input type="checkbox"/> Screening protilátek <input type="checkbox"/> Test kompatibility <input type="checkbox"/> Přímý antiglobulinový test <input type="checkbox"/> Jiné		Žádáme o TRANSFUZNÍ PŘÍPRAVKY K podání (datum a čas) <input type="text"/> do rezervy <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Erytrocyty de leukotizované - ERD TU <input type="checkbox"/> ozářit <input type="checkbox"/> Erytrocyty promyté - EP (po dohodě s TRS) TU <input type="checkbox"/> ozářit <input type="checkbox"/> Plazmu - P TU <input type="checkbox"/> Trombocyty směsné - TBSDR T.D. <input type="checkbox"/> ozářit <input type="checkbox"/> Trombocyty z aferézy - TAD, TADR (po dohodě s TRS) T.D. <input type="checkbox"/> ozářit <input type="checkbox"/> Jiné (po dohodě s TRS)									
Časová naléhavost vyšetření <input type="checkbox"/> Standardně <input type="checkbox"/> STATIM		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Vyplní oddělení</th> <th>Vyplní laboratoř TRS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Datum a čas odběru:</td> <td>Datum a čas příjmu:</td> </tr> <tr> <td>Jmenovka a podpis sestry:</td> <td>Jmenovka a podpis laboranta:</td> </tr> <tr> <td>Jmenovka a podpis lékaře:</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Vyplní oddělení	Vyplní laboratoř TRS	Datum a čas odběru:	Datum a čas příjmu:	Jmenovka a podpis sestry:	Jmenovka a podpis laboranta:	Jmenovka a podpis lékaře:	
Vyplní oddělení	Vyplní laboratoř TRS										
Datum a čas odběru:	Datum a čas příjmu:										
Jmenovka a podpis sestry:	Jmenovka a podpis laboranta:										
Jmenovka a podpis lékaře:											
Výdej TP bez předtransfuzního vyšetření <input type="checkbox"/> VITÁLNÍ INDIKACE											

VYSVĚTLIVKY K ŽÁDANCE NA DRUHÉ STRANĚ

Strana 1 z 2

Zdroj: www.nemcb.cz

Příloha 2 – Diagnostické erytrocyty pro screening protilátek od firmy BIO-RAD



Zdroj: Vlastní foto

Příloha 3 - Diagnostické erythrocyty pro identifikaci protilátek od firmy BIO-RAD



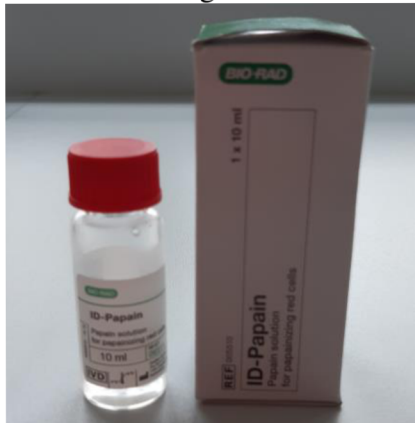
Zdroj: Vlastní foto

Příloha 4 - Diagnostické erythrocyty pro identifikaci protilátek od firmy Sanquin



Zdroj: Vlastní foto

Příloha 5 – Diagnostikum ID-Papain od firmy BIO-RAD



Zdroj: Vlastní foto

Příloha 6 – Diagnostikum ID-Diluent 1 (modifikovaný bromelin) a ID-Diluent 2 (modifikovaný LISS roztok) od firmy BIO-RAD



Zdroj: Vlastní foto

Příloha 7 – Laboratorní vybavení – centrifugy, ID-inkubátor, ID-centrifuga



Zdroj: Vlastní foto

Příloha 8 – Imunohematologický analyzátor IH-500 od firmy BIO-RAD



Zdroj: Vlastní foto

Příloha 9 – Záznamový arch pro screening protilátek BIO-RAD

Rh-ir		Möglicher Genotyp Probable Genotype Genotype probable Genotipo probable	Spender Donor Donneur Donatore Donante	Rh-ir		Kell													Duffy	Kidd	Lewis	P	MNS					Luth.	Xg	Set: Antigen Special types Antigenes sp. et Autigenes especiais Outros Antigenos Tipos especiais	Resultat/Resultat/Resultat/ Resultado/Resultado/Resultado		
D	C	E	c	e	C'	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Jk ^a	Jk ^b	Fy ^a	Fy ^b	Fy ³	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ¹	P ²	M	N	S	s	L ^u	L ^v	Xg ^a	Xg ^b	Xg ^c	IAT	Enzyme	4°C	
I	CCC ^a D.ee	R ₁ R ₁	951903	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	N/A			
II	ccD.EE	R ₂ R ₂	647566	+	0	+	0	0	0	0	+	+	nt	nt	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	N/A			
III	ccddee	rr	751827	0	0	0	+	+	+	+	+	nt	nt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/A				

LOT
 I 06084.59.x IP 06134.59.x (Japan: 0608.59.xx/0613.59.xx)
 II 06094.59.x IIP 06144.59.x (Japan: 0609.59.xx/0614.59.xx)
 III 06104.59.x IIIP 06154.59.x (Japan: 0610.59.xx/0615.59.xx)
 Set I-II-III 45184.59.x (Japan: 4518.59.xx)
 Set IP-IIP-IIIP 45194.59.x (Japan: 4519.59.xx)
 2021.06.14 (Japan: 14.06.21)

Zdroj: Vlastní foto

Příloha 10 - Záznamový arch pro identifikaci protilátek BIO-RAD – základní panel

Rh-ir		Möglicher Genotyp Probable Genotype Genotype probable Genotipo probable	Spender Donor Donneur Donatore Donante	Rh-ir		Kell													Duffy	Kidd	Lewis	P	MNS					Luth.	Xg	Set: Antigen Special types Antigenes sp. et Autigenes especiais Outros Antigenos Tipos especiais	Resultat/Resultat/Resultat/ Resultado/Resultado/Resultado			Bemerkungen Remarks Note Observaciones
D	C	E	c	e	C'	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Jk ^a	Jk ^b	Fy ^a	Fy ^b	Fy ³	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ¹	P ²	M	N	S	s	L ^u	L ^v	Xg ^a	Xg ^b	Xg ^c	IAT	Enzyme	4°C		
1	CCC ^a D.ee	R ₁ R ₁	289865	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	N/A				HLA ⁺
2	CCD.ee	R ₁ R ₁	656814	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	N/A				
3	ccD.EE	R ₂ R ₂	277409	+	0	+	0	0	0	0	+	+	nt	nt	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	N/A				
4	Ccddee	r'r	689206	0	+	0	+	0	0	+	+	nt	nt	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	N/A				
5	ccddEe	r'r	614321	0	0	+	+	0	0	+	+	nt	nt	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	N/A				
6	ccddee	rr	778077	0	0	0	+	+	+	+	+	nt	nt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/A				
7	ccddee	rr	023633	0	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	nt	N/A				
8	ccD.ee	R ₂ r	799651	+	0	0	+	+	0	0	+	+	nt	nt	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	N/A				
9	ccddee	rr	134426	0	0	0	+	+	0	0	+	+	nt	nt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	N/A				
10	ccddee	rr	595466	0	0	0	+	+	0	0	+	+	nt	nt	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	N/A				
11	ccddee	rr	082553	0	0	0	+	+	0	0	+	+	nt	nt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/A				

LOT 06171.14.x – 06271.14.x (Japan: 0617.14.xx – 0627.14.xx)
 05361.14.x – 05461.14.x (Japan: 0536.14.xx – 0546.14.xx)
 2021.06.14 (Japan: 14.06.21)

Zdroj: Vlastní foto

Příloha 11 - Záznamový arch pro identifikaci protilátek Sanquin – doplňkový panel

Makropanel 16	K1385	LOT	8000453449	CE 0344	
Makropanel 16-P	K1384	LOT	8000453448	CE 0344	
Cellbind ID16	K7230	LOT	8000453457	CE 0344	
Cellbind ID16-P	K7231	LOT	n.a.	CE 0344	
Column panel 16	K5020	LOT	8000453453	CE 0344	

Sanquin Reagents B.V.
 Postbus 125
 1095 CX Amsterdam
 The Netherlands
 Phone: +31 20 5123995
 Fax: +31 20 5123570
 Reagents@sanquin.nl
 www.sanquin.org/reagents

IVD 2021-06-03

RHD ID	Rh/H				Kell				Duffy				Kidd				Lewis				P				MNS				Lutheran				Xg
	C	D	E	c	C ⁺	T	M	N	K ^a	K ^b	K ^x	Jk ^a	Jk ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ¹	P ²	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Xg					
1	R ₁ R ₂	0588498	+	+	0	+	/	/	0	+	0	/	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+				
2	R ₁ R ₂	0512600	+	+	0	+	/	/	0	+	0	/	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+				
3	R ₁ R ₂	1717731	0	+	+	0	/	/	0	+	0	/	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+				
4	R ₂	2368516	0	+	0	+	0	/	/	0	+	0	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+				
5	r ¹ r ¹	0562871	+	0	0	+	0	/	/	0	+	0	/	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+				
6	r ¹ r ²	1663081	0	0	+	+	0	/	/	0	+	0	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+				
7	rr	0631571	0	0	0	+	0	/	/	+	0	+	/	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+					
8	rr	1360621	0	0	0	+	0	/	/	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+				
9	rr	0384549	0	0	0	+	+	0	/	/	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+				
10	rr	0327598	0	0	0	+	0	/	/	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+				
11	R ₁ R ₂	1720717	+	+	0	+	0	/	/	+	0	+	/	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+				
12	R ₁ R ₂	0644081	w	+	+	0	0	/	/	0	+	+	/	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+				
13	r ¹ r ¹	0315897	0	0	+	+	0	/	/	0	+	0	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+				
14	R ₁ R ₂	0190740	+	0	+	+	0	/	/	0	+	0	/	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+				
15	r ¹ r ²	1868032	+	0	0	+	+	/	/	0	+	0	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+				
16	rr	1283404	0	0	0	+	0	/	/	0	+	0	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+					

* = positivní/záporný/příčinný/pozitivní/pozitivní/veškeré/pozitivní/pozitivní/pozitivní/pozitivní/pozitivní/pozitivní/pozitivní/pozitivní/pozitivní/pozitivní/pozitivní/pozitivní
 0 = negativní/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný
 / = není testováno/ve vzorku, nedostupný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný/záporný
 w = weak/weak
 + = strong/strong
 ID = donor number/číslo na štítku/ID donorů/donornummer/Donor-ID/epitop číslo/número de donante/número de donante/donor number/donator number/donator number/donator number/donator number

Zdroj: Vlastní foto

Příloha 12 - 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

Každý jednotlivý případ protilátky s nepravděpodobnou klinickou závažností je však nutno posuzovat individuálně.

Zdroj: Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_08