



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních a informačních systémů

Bakalářská práce

**Identifikace antierytrocytárních
protilátek u těhotných žen - porovnání
metody titrace protilátek pomocí
sloupcové gelové aglutinace a
zkumavkové metody**

Vypracoval: Markéta Tichá
Vedoucí práce: prim. MUDr. Petr Biedermann

České Budějovice 2014

Abstrakt

Identifikace antierytrocytárních protilátek u těhotných žen - porovnání metody titrace protilátek pomocí sloupcové gelové aglutinace a zkumavkové metody

Objev krevního oběhu a objev nových krevních systémů souvisel s rozvojem imuno hematologických metod. V 17. století byl objeven krevní oběh. To znamenalo velký vědecký rozvoj pro hematologii. První krevní převod se uskutečnil v roce 1665. Neúspěšné transfuze zvířecí krve zpochybnily tuto metodu a zájem o transfuze opadl. Profesor Blundell zdůraznil správnou zásadu o převodu pouze lidské krve. U vykrváčených rodiček provedl řadu transfuzí. Hlavní příčinou neúspěchu transfuze byla neznalost krevních skupin. K objevení krevních skupin došlo ve 20. století. Význam tohoto objevu si lékaři dost rychle neuvědomili. Ve všeobecnou známost vstoupily zásluhou Karla Landsteinerja a také Jana Jánského.

První objevený krevní systém je AB0. Je to nejdůležitější krevní systém, který byl popsán Karlem Landsteinerem v roce 1900. Nejpolymorfnější systém, který má největší aloimunogenitu je Rh systém. První údaj o Rh systému pochází z roku 1939.

Objev krevních skupinových systémů měl velký vliv na rozvoj laboratorních metod k určení antigenů těchto systémů a také na rozvoj metod, které používáme k průkazu erytrocytárních protilátek.

Aglutinační metoda je nejvhodnější metoda k určování protilátek proti erytrocytům. Erytrocyty, které jsou senzibilizovány protilátkou, tvoří aglutinaci, kterou lze pozorovat makroskopicky.

Těhotné ženy vytvářejí protilátky proti antigenům na erytrocytech plodu proniknutím fetálních erytrocytů do jejich oběhu.

Vyšetření antierytrocytárních protilátek by mělo vést k včasné diagnóze možného rozvoje hemolytického onemocnění novorozence, sledování plodu jinou než imuno hematologickou metodou, určení vhodné léčby hemolytického onemocnění novorozence.

Hemolytické onemocnění novorozence je nemoc, u které je charakteristické zkrácené přežívání erytrocytů plodu a novorozence.

První záznam o hemolytickém onemocnění novorozence pochází ze 17. století, kdy se jednalo o případ novorozených dvojčat, u nichž se projevila novorozenecká žloutenka. V roce 1939 Levin a Stetson prokázali, že žena může být imunizována během těhotenství proti krevně skupinovým antigenům, které se vyskytují na erytrocytech dítěte a u matky chybí. Mateřské protilátky se váží na specifické antigeny fetálních a novorozeneckých erytrocytů, které následně hemolyzují.

Onemocnění může mít různě těžký průběh. Bývá příčinou závažné fetální a novorozenecké morbidity a mortality. Za klinicky významné protilátky z hlediska možného rozvoje hemolytického onemocnění novorozence jsou považovány protilátky anti-A, -B, -D, -C, -c, -E, -e, -Ce, -cE, -K, -Fy(a), -Jk(a). Především protilátky specifity anti-D, -c, -E, -K mohou způsobit těžké hemolytické onemocnění novorozence a vyžadují přísnější sledování. Vlastní imunitní reakce začíná rozpoznáním antigenu imunitním systémem matky. Placentou pronikají pouze imunoglobuliny typu IgG s nízkou molekulovou hmotností, a to do 24. týdne těhotenství velmi pomalu. Transfer protilátek se zvyšuje ve druhé polovině gestace a hladina protilátek u fetu může být vyšší než u matky. Velmi rozšířenou a úspěšnou metodou v prevenci hemolytického onemocnění novorozence bylo zavedení profylakticky podávaného anti-D imunoglobulinu. RhIg se podává všem D-negativním ženám po porodu D-pozitivního dítěte a také v některých situacích během těhotenství, pokud si těhotná nevytvořila vlastní protilátku anti-D.

Tématem této práce je vyšetření a sledování potencionálně rizikové skupiny těhotných žen vhodnou imuno hematologickou metodou, jejichž plod nebo novorozenec je ohrožen možným hemolytickým onemocněním novorozence. Titrační vyšetření je široce dostupné orientační vyšetření, které se běžně používá ke sledování těhotných s klinicky významnými protilátkami. Sleduje se při tom hodnota titru a její změna s postupujícím těhotenstvím, porovnávaná v po sobě následujících vyšetřeních.

V období od 1. 1. 2011 – 31. 7. 2013 bylo vyšetřeno v prenatální laboratoři na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s. 5622 těhotných žen.

287 těhotných žen bylo v průběhu těhotenství aloimunizováno a byly u nich zjištěny protilátky proti antigenům na erythrocytech plodu. Všechny ženy byly vyšetřeny metodou sloupcové gelové aglutinace, včetně vyšetření titru protilátky. U 31 vzorků těhotných žen byl vyšetřen titer protilátek zkumavkovou metodou.

Abstract

Identification of anti-erythrocyte antibodies in pregnant women's blood – comparison of different methods of antibody titre testing (column gel agglutination method and test tube method)

The discovery of blood flow and new blood systems was connected with the development of the immunohematology methods. The blood flow was discovered in the 17th century. This meant great scientific development for haematology. The first blood transfusion was carried out in 1665. The transfusion of animal blood was unsuccessful and cast doubt on this method. As a result of this, the interest in this method decreased. Profesor Blundell emphasized the importance of human blood transfusion. He carried out many transfusions on heavily bleeding women in labour. The main reason for failure of first transfusions was the ignorance of blood types (blood groups). The blood types were discovered in the 20th century. The doctors did not realise quickly enough the significance of this discovery. The blood groups became well known thanks to Karel Landsteiner and also to Jan Jánký.

The first discovered blood system is AB0. It is the most important blood system which was described by Karel Landsteiner in 1900. The most polymorphous system which has got the biggest alo-immunogenicity is the Rh blood group system. The first records of the Rh blood group system date back to 1939.

The discovery of blood group systems had a great impact on further development of lab methods for identification of the antigens of these systems. It also contributed to the development of methods which we use to prove the presence of the erythrocytes antibodies.

Agglutinin method is the most suitable method for identification of antibodies against erythrocytes. Erythrocytes which are sensitized by antibody create agglutination which can be observed under a microscope.

Pregnant women produce antibodies against antigens on the erythrocytes of embryos leak of erythrocytes into their blood flow.

Testing of anti-erythrocyte antibodies should lead to early diagnoses of possible development of haemolytic disease of the newborns; to monitoring of embryo with the use of other method than immunohaematological method; to determination of the suitable therapy of the haemolytic disease of the newborn.

The haemolytic disease of the newborn is a disease, for which shortened survival of the embryo's and the newborn's erythrocytes is characteristic.

The first record of the haemolytic disease of the newborn comes from the 17th century. The first record mentions the case of newborn twins who suffered from newborn hepatitis. In 1939 Levin a Stetson proved that woman can be immunised during her pregnancy against blood group antigens which occur on baby's erythrocytes but aren't present at the mother's side. Mother's antibodies are tied to specific antigens of the fetal and newborn erythrocytes, which later haemolyse.

The disease can have different course. It causes serious fetal and newborn morbidity and mortality. The antibodies anti-A, -B, -D, -C, -c, -E, -K, -e, -Ce, -cE, -Fy(a), -Jk(a) are regarded clinically important antibodies concerning the possible development of the haemolytic disease of the newborn. Especially the antibodies anti-D, -c, -E, -K can cause serious haemolytic disease of the newborn and require careful monitoring. The immune response itself starts with the identification of the antigen of the mother's immune system. Only the immunoglobulins type IgG with low molecular weight penetrate through placenta (until the 24th week of pregnancy very slowly). The transfer of antibodies increases during the second half of the gestation and the level of fetus's antibodies can be higher than the level of mother's antibodies. The introduction of anti-D immunoglobulin (given prophylactically) became a very common and successful method for prevention of haemolytic disease of the newborn. RhIg is given to all D negative women after the birth of the D positive baby and in some cases during pregnancy, if the pregnant woman did not create her own anti-D antibody.

The theme of this thesis is the examination and monitoring of potentially risk group of pregnant women, whose embryo is threatened by possible haemolytic disease of the newborn, with the use of suitable immunohaematological method. Titre testing is generally accessible indicative testing, which is used to monitor pregnant women with

clinically significant level of antibodies. The level of antibodies in a blood sample measured using the antibody titre test is repeatedly monitored during the whole pregnancy and the results from every two successive measurements are compared.

Between 1 January 2011 and 31 July 2013 5622 pregnant women were tested in prenatal laboratory in the Blood Bank Department of Hospital České Budějovice, Ltd. 281 pregnant women were also immunized during their pregnancy and antibodies against antigens on erythrocytes of their embryos were found in their blood. All women were tested using the method of column gel agglutination, including antigen titre testing. In 31 samples of pregnant women the antibody titre was tested using the test tube method.

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích dne 5. 5. 2014

.....

Markéta Tichá

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala především svému vedoucímu práce prim. MUDr. Petru Biedermannovi za odbornou pomoc při zpracování této bakalářské práce a svým kolegyním a kolegům z Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s. za jejich spolupráci.

Dále děkuji své mamince a dcerám za podporu a trpělivost.

Obsah

Seznam použitých zkratk	12
Úvod	13
1 Teoretická část	13
1.1 Historie	14
1.2 Systémy krevních skupin	15
1.2.1 Antigeny krevních skupin	15
1.2.2 Protilátky proti antigenům krevních skupin	16
1.2.3 Důsledky interakce antigen-protilátka <i>in vivo</i>	16
1.2.4 Skupinový systém AB0	16
1.2.5 Skupinový systém Rhesus	18
1.2.6 Skupinový systém Kell	19
1.2.7 Skupinový systém Duffy	20
1.2.8 Skupinový systém Kidd	20
1.2.9 Skupinový systém MNSs	21
1.2.10 Skupinový systém Lutheran	21
1.2.11 Skupinový systém Diego	22
1.2.12 Ostatní skupinové systémy	22
1.3 Metody používané k určování krevně skupinových protilátek	22
1.3.1 Antiglobulinový test	23
1.3.1.1 NAT ve zkumavce	24
1.3.1.2 NAT sloupcová gelová aglutinace	24
1.3.1.3 NAT pevná fáze	24
1.3.2 Screeningové vyšetření antierytrocytárních protilátek	25
1.3.3 Identifikace antierytrocytárních protilátek	25
1.4 Aloimunizace těhotných žen	26
1.5 Hemolytické onemocnění novorozence	27
1.5.1 Rozdělení hemolytického onemocnění novorozence	29

1.5.2 Léčba hemolytického onemocnění novorozence.....	29
1.5.3 Prevence hemolytického onemocnění novorozence.....	30
1.6 Imunohematologické vyšetření během těhotenství.....	31
1.6.1 ABO.....	31
1.6.2 Antigen D	32
1.6.3 Screening a identifikace nepravidelných aloimunních antierytrocytárních protilátek.....	32
1.6.4 Fenotyp matky	34
1.6.5 Stanovení titru nepravidelných protilátek	34
2 Cíl práce.....	36
3 Metodika	37
3.1 Vyšetření krevní skupiny a vyšetření Rh faktoru.....	37
3.2 Vyšetření screeningu antierytrocytárních protilátek metodou sloupcové gelové aglutinace	40
3.3 Identifikace antierytrocytárních protilátek metodou sloupcové gelové aglutinace	44
3.4 Vyšetření titru protilátek těhotných žen.....	48
3.4.1 Vyšetření titru protilátek těhotných žen metodou sloupcové gelové aglutinace	48
3.4.2 Vyšetření titru protilátek těhotných žen zkumavkovou metodou.....	50
4 Výsledky	53
5 Diskuze	59
6 Závěr	62
7 Seznam použité literatury	63
8 Klíčová slova	66
9 Přílohy.....	67

Seznam použitých zkratk

AHG, AGH	antihumanum globulinum (antiglobulinové sérum)
AK	autologní kontrola, autokontrola
ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
EHK	externí hodnocení kvality
ery	erytrocyty
ET	enzymatický test
HFA	high frequency antigens (antigeny s vysokou frekvencí výskytu)
HON	hemolytické onemocnění novorozence
HTR	hemolytická potransfuzní reakce
LFA	low frequency antigens (antigeny s nízkou frekvencí výskytu)
LISS	low ionic strength salt solution (solný roztok o nízké iontové síle)
LISS/NAT	nepřímý antiglobulinový test s použitím erytrocytů resuspendovaných v roztoku o nízké iontové síle
NAT	nepřímý antiglobulinový test
NCB	Nemocnice České Budějovice, a. s.
PAT	přímý antiglobulinový test
PBS	pufrovaný fyziologický roztok pH 6,98
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PP	pracovní postup
RČ	rodné číslo
SOP	standardní operační postup
TRS	transfuzní oddělení

Úvod

Předmětem a cílem mé bakalářské práce je problematika aloimunizace těhotných žen. Sledování potencionálně rizikové skupiny těhotných žen s možným rozvojem hemolytického onemocnění novorozence, za použití vhodné imunohematologické metody. S rozvojem těchto laboratorních metod souvisí objev nových krevních systémů.

V teoretické části práce se zabývám objevem krevně skupinových systémů, historií erytrocytární a těhotenské imunizace, ohrožením plodu a novorozence možným vznikem hemolytického onemocnění novorozence (HON), důležitostí imunohematologického vyšetření těhotných žen, jehož součástí je určení krevní skupiny a screeningu protilátek. Na základě tohoto imunohematologického vyšetření zařazení Rh negativních žen do rizikové skupiny a žen s významnými protilátkami proti antigenům erytrocytů jiných krevních systémů než je Rh systém. Dále se ve své práci zabývám laboratorními metodami, které se používají k identifikaci a sledování klinicky významných antierytrocytárních protilátek.

Na teoretickou část navazuje laboratorní část, kde jsou zpracované výsledky vyšetření pozitivních protilátek u těhotných žen, které byly zachyceny v období 1. 1. 2011 - 31. 7. 2013 v prenatální laboratoři Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s. (TRS NCB). Vyšetření titru těchto protilátek za použití imunohematologických metod sloupcové gelové aglutinace (LISS/NAT) a zkumavkové metody. Porovnání těchto metod z hlediska citlivosti, časové náročnosti a z provozně-ekonomického hlediska.

Téma prenatální problematiky jsem si vybrala proto, že pracuji na TRS v prenatální laboratoři a podílela jsem se na většině vyšetření v této laboratoři v uvedeném období.

1 Teoretická část

1.1 Historie

Krevní transfuze mají dlouhou a zajímavou historii. Od primitivních představ až po vědecky zdůvodněné současné metody hemoterapie vede cesta, na níž bylo zapotřebí postupně vyšetřit celou řadu vzájemně souvisejících dílčích problémů. Krev vzbuzovala zvědavost a úzkost, lidstvo si uvědomovalo její důležitost již v nejdávnějším starověku. Krev se životem ztotožnil starořecký přírodní filosof Empedokles více než 400 let před naším letopočtem. Lidé považovali krev za elixír života, všemocný lék, zázračnou, nadpřirozenou tekutinu.

V roce 1616 Angličan William Harvey (1578 – 1657) objevil krevní oběh. Až v roce 1665 se uskutečnil historicky první doložený krevní převod. Anglický fyziolog Richard Lower (1631 – 1691) jej provedl mezi dvěma psy, stříbrnou trubicí spojil krční tepnu psa - dárce s krční žílou pokusně vykrváčeného psa - příjemce. První technicky úspěšnou a ověřenou transfuzi u člověka provedl v roce 1667 Jean Babtiste Denis (1628 – 1704), lékař Ludvíka XIV., a profesor filosofie a matematiky z Montpellieru. K transfuzi použil jehněčí krev. Jeho další pokusy krevních převodů zvířecí krve člověku však byly neúspěšné. Neúspěšné transfuze zvířecí krve zpochybnily tuto metodu, takže na sklonku sedmdesátých let 17. století byly v Anglii, Francii a Itálii pokusy s transfuzemi zakázány. Zájem o transfuze opadl, až v roce 1816 velmi zodpovědně přistoupil ke studiu této problematiky profesor fyziologie a porodnictví James Blundell (1760 – 1878). Profesor Blundell provedl svou první transfuzi v roce 1819. Zdůraznil správnou zásadu, že člověku lze převádět pouze lidskou krev. Provedl řadu úspěšných transfuzí u vykrváčených rodiček. Ale i některé převody lidské krve nebyly úspěšné, někdy dokonce způsobily úmrtí nemocného. Neznalost krevních skupin byla hlavní příčinou neúspěchu transfuze. Až v prvních letech 20. století došlo k jejich objevu. Lékaři si dost rychle neuvědomili nesmírný význam tohoto objevu a skoro dvacet let trvalo, než poznatky o krevních skupinách vstoupily ve všeobecnou známost.

V roce 1901 uveřejnil Karel Landsteiner práci, v níž rozdělil lidskou krev do tří skupin podle aglutinačních vlastností. Mísil vzájemně erytrocyty a séra vyšetřovaných osob. Landsteiner neobjevil čtvrtou skupinu náhodou, žádný z jeho vyšetřovaných neměl tuto skupinu. Čech Jan Jánský byl první, kdo správně roztřídil krev do čtyř skupin podle aglutinačních vlastností. Krevní skupiny označil I, II, III, IV. V roce 1910 W. L. Moss v Americe učinil podobný objev jako Jánský. Tento badatel označil krevní skupiny římskými číslicemi v obráceném pořadí než Jánský, což způsobilo mnoho nesrovnalostí. Později ve třicátých letech byly krevní skupiny označeny písmeny A, B, AB, 0 podle Landsteinera. Toto označení se používá po celém světě dodnes. R. Ottenberger v roce 1911 použil poprvé poznatek o krevních skupinách při transfuzi. Na základě objevu krevních skupin klesl počet těžkých a smrtelných reakcí při transfuzích. Objev krevních skupin byl největším a nejvýznamnějším objevem v historii krevní transfuze. [1, 2]

V dnešní době je popsáno více než 300 různých erytrocytárních antigenů. [3] Většina antigenů je zařazena do jednoho z 33 krevně skupinových systémů. Každý systém obsahuje různý počet antigenů a je jednoznačně geneticky určen. [4, 5]

1.2 Systémy krevních skupin

1.2.1 Antigeny krevních skupin

Antigen je velká složitá organická molekula, je dobře rozpustná v různých tělních tekutinách nebo se vyskytuje na povrchu buněk. Tato struktura je definována protilátkou, kterou produkuje imunizovaná osoba, které chybí daný znak na membráně buňky. Biochemicky se jedná o proteiny, glykoproteiny, glykolipidy. V dnešní době rozeznáváme 329 antigenů, z nichž 292 řadíme do 33 krevně skupinových systémů a do sérií antigenů s nízkou nebo vysokou frekvencí výskytu (LFA, HFA). [2, 5]

1.2.2 Protilátky proti antigenům krevních skupin

Protilátky jsou součástí specifické imunitní reakce. [6] Protilátky definují antigeny krevních skupin a určují jejich klinickou významnost. Každý antigen má svou imunogenitu, různě silný impulz pro tvorbu protilátek, různou reakci s inkompatibilní transfuzí a schopnost rozvinout HON. Protilátky proti antigenům erytrocytů jsou třídy IgM, IgG, mohou být i IgA. Přirozené protilátky jsou takové, které se vyskytují bez imunizace cizorodými erytrocyty. Většinou jsou třídy IgM. Jako imunitní jsou označovány protilátky, které se vyvinuly po imunizaci a bývají třídy IgG (v časně fázi imunitní odpovědi se tvoří IgM, později převládá tvorba IgG). IgG protilátky, které mají nízkou molekulovou hmotnost, na rozdíl od IgM protilátek, které mají vysokou molekulovou hmotnost, procházejí placentou a mají potenciál působit HON. [5]

1.2.3 Důsledky interakce antigen-protilátka *in vivo*

Protilátky odstraňují „cizí“ elementy z organismu. Jsou popsány tři mechanismy působení protilátek při destrukci erytrocytů:

- Aktivace komplementové kaskády, která způsobuje intravaskulární i extravaskulární hemolýzu
- Fagocytóza erytrocytů s navázanými IgG protilátkami s následnou extravaskulární hemolýzou
- Ovlivnění stability membrány navázáním protilátky

[5]

1.2.4 Skupinový systém AB0

Prvním objeveným krevně skupinovým systémem byl systém AB0 neboli ABH systém. Tento systém byl popsán Landsteinerem v roce 1901. Patří mezi nejdůležitější krevně skupinové systémy z důvodu přítomnosti přirozených protilátek

proti těm antigenům, které chybí na erythrocytech. Nejdůležitější antigeny AB0 systému jsou antigeny A, B. Gen kódující tyto krevní skupiny má tři alely, které se označují jako A, B a 0. Alely A a B jsou kodominantní a kódují příslušný antigen. Alela 0 nevyúsťuje v expresi antigenu. Každý člověk má dvě alely AB0 systému, jedna se dědí od matky a jedna od otce. To nám dává šest možných kombinací – genotypy AA, A0, BB, B0, AB, 00. Tyto kombinace vyúsťují do čtyř krevních skupin A, B, 0, AB. [7]

Antigeny jsou oligosacharidy přítomné na membráně erythrocytů. Konečné formy antigenů tohoto systému jsou také ovlivňovány produkty genů kódujících fukosyltransferázy podílející se na výstavbě prekurzorového H řetězce. Tento prekurzorový H řetězec zůstává nepokrytý u skupiny 0. Je označován H antigen. H prekurzorový řetězec vzniká přidáním terminální L-fukózy na disacharidové řetězce. Imunodominantním monosacharidem navázaným na H-prekurzor u skupiny A je N-acetyl-D-galaktosamin, u skupiny B je to D-galaktóza. [5] Výskyt krevních skupin A, B, AB, 0 u obyvatel jedné oblasti a jedné rasové skupiny bývá poměrně stálý. [8] Přibližná frekvence krevních skupin u středoevropského obyvatelstva: A – 48%, B – 9%, AB – 4%, 0 – 39%. Ve světové populaci s ohledem na rasu, národnost a geografickou oblast se frekvence krevních skupin mění. [4]

AB0 protilátky

Střevní bakterie mohou stimulovat tvorbu anti-A a anti-B protilátek. Tyto bakterie mají na své membráně struktury podobné A a B antigenům, které jsou schopny podnítit imunitní systém k zahájení tvorby anti-A a anti-B protilátek. Tyto protilátky jsou tzv. přirozeně se vyskytující protilátky, protože vznikají po antigenní stimulaci vlastním přirozeným prostředím a ne cizími erythrocyty. [7]

Tabulka 1: AB0 antigeny, protilátky, genotypy

Skupina AB0	Antigeny na erytrocytech	Protilátky v séru	Genotyp
0	žádné	anti-A, anti-B	0/0
A	A	anti-B	A/A nebo A/0
B	B	anti-A	B/B nebo B/0
AB	A a B	žádné	A/B

Zdroj: Imunohematologie [4]

1.2.5 Skupinový systém Rhesus

Nejpolymorfnější systém, který má největší aloimmunogenitu – často tvořící IgG protilátky způsobujících těžké HON. První údaj související s Rh systémem se objevil v odborné literatuře v roce 1939. Byla popsána potransfuzní reakce u ženy, které byla podána transfuze krve manžela. Žena před tím porodila mrtvý plod a následně byla u ní zjištěna protilátka reagující s krvinkami přibližně 85% AB0 kompatibilních jedinců. Bylo potvrzeno, že úmrtí plodu a potransfuzní reakce souvisí s nalezenou protilátkou, reagující s dosud neznámým erytrocytárním antigenem. Označení Rh bylo poprvé použito o rok později, odvozené na základě protilátky získané imunizací králíků a morčat krvinkami opice *Macacus rhesus*. Byl vysloven názor, že na krvinkách makaků se nachází antigen (Rhesus faktor) a imunizovaná zvířata vytvořila protilátku anti-Rh (anti-Rhesus). Zpočátku panovalo tvrzení, že obě výše uvedené protilátky mají stejnou specifitu a v příštích letech bylo popsáno mnoho dalších případů potransfuzních reakcí a HON, které s ní měly souvislost. Ukázalo se, že lidská a zvířecí protilátka mají odlišné specifity, zůstalo ale již vžitě označení anti-Rh. Postupem vývoje poznání se tento zpočátku zdánlivě jednoduchý systém stal nejpolymorfnějším systémem krevních skupin. V současné době rozeznáváme 53 antigenů Rh systému, přičemž původní Rhesus faktor a anti-Rh odpovídají antigenu D a protilátce anti-D. [5] Nejdůležitějšími antigeny jsou D, C, c, E, e, Cw. Systém Rhesus obsahuje dva úzce propojené geny: gen CcEe a gen D. Rhesus antigeny vytvářejí velmi komplexní strukturu, která je spojena

s erytrocytárním cytoskeletem. Známe molekulární základ Rhesus genů. Přičemž je zřejmé, že D a CcEe geny jsou si velmi podobné.

Nejdůležitějším antigenem systému Rhesus je antigen D. Ze všech Rhesus antigenů je D antigen nejvíce imunogenní. Antigen D představuje soubor epitopů na extramembranózní části RhD proteinu. Imunologická jedinečnost a velmi silná imunogenicita antigenu D je způsobena tím, že u RhD negativních jedinců chybí celý RhD protein a mají pouze RhCcEe proteiny. Proto imunitní systém RhD negativních osob dobře rozpoznává RhD pozitivní erytrocyty. Všechny Rh protilátky jsou považovány za klinicky významné a mají potenciál působit hemolytickou potransfuzní reakci (HTR) a HON. Antigen D je nejvíce imunogenní a tak většina Rhesus protilátek bude mít specifitu anti-D. Antigeny C, c, E, e jsou podstatně méně imunogenní. Anti-D se může nacházet v kombinaci s anti-G, anti-C, anti-E. Antigen G je důležitým antigenem Rh systému. Byl objeven v roce 1958 Allenem a Tippettem. Vyskytuje se běžně spolu s D a C antigenem. Anti-G protilátky reagují s erytrocyty D pozitivních nebo C pozitivních osob. Většina anti-(C+D) sér pacientů také mohou běžně obsahovat anti-G protilátky. [7]

1.2.6 Skupinový systém Kell

Skupinový systém Kell má velkou klinickou významnost. V roce 1946 objevil Coombs protilátku proti v té době neznámému antigenu u pacienta Kellehera. Antigen byl pojmenován podle něj - Kell. [7] Základním antigenním párem jsou antigeny K (KEL1, Kell) a k (KEL2, Cellano), dalšími páry Kp(a) (KEL3, Penny) a Kp(b) (KEL4, Rautenberg), Js(a) (KEL6, Sutter) a Js(b) (KEL7, Matthews), KEL11 a KEL17, KEL14 a KEL24.

Antigen K (KEL1) má velmi imunogenní strukturu (anti-K je po anti-Rh protilátkách nejčastější imunitní specifita). Tento skupinový systém je klinicky významný s potenciálem výskytu těžkých HTR i HON (zde navíc přispívá k hemolýze a k anemizaci plodu i supresivní efekt protilátek na erytropoézu). K i k antigeny jsou

prokazatelné ve velmi časném vývojovém stadiu: jsou přítomny již u desetidenních plodů. K i k antigeny jsou plně vyvinuty na erytrocytech v pupečnickové krvi. Je doporučena transfuzní kompatibilita u dívek a mladých žen vzhledem k vysoké imunogenitě antigenu K. [5]

1.2.7 Skupinový systém Duffy

Systém Duffy byl objeven v roce 1950 Cutbushem. Byl pojmenován po prvním pacientovi, u kterého byly prokázány protilátky proti antigenu tohoto krevně skupinového systému. Zkráceným názvem Duffy je Fy. Je známo sedm různých antigenů Duffy. Nejdůležitějšími antigeny tohoto systému jsou Fy(a) a Fy(b). Duffy antigeny jsou slabšími imunogeny než antigeny AB0, Rhesus systému a Kell systému. [7] Protilátky proti antigenům Duffy jsou málo časté. Vznikají téměř vždy po imunizaci transfuzemi nebo těhotenstvím. HON bývá v souvislosti se skupinou Duffy málo časté. [9, 10]

1.2.8 Skupinový systém Kidd

Tento skupinový systém byl objeven v roce 1951 Allenem. Kidd systém se zkráceně nazývá Jk. V rámci tohoto systému známe tři antigeny. Kromě antigenů Jk(a) a Jk(b) existuje antigen JK3. Tento antigen je přítomný u lidí, kteří mají Jk(a) a Jk(b) antigen, tj. u každého, kromě Jk(a-b-) jedinců. Kidd antigeny jsou dobře vyvinuty při narození a objevují se již v časném stádiu vývoje plodu. Jsou detekovatelné na erytrocytech v pupečnickové krvi. Jsou slabšími imunogeny než antigeny AB0 a Rhesus systémů. [7] Protilátky nebývají časté, ale jsou velmi nebezpečné (po imunizaci transfuzí nebo těhotenstvím síla nálezu může rychle slábnout), protože při fagocytóze jimi senzibilizovaných erytrocytů jsou rychle odstraňované z krevního

oběhu a nemusí být proto detekované při následujícím screeningovém vyšetření. HON bývá při inkompatibilitě novorozence a matky vzácné. [5, 10]

1.2.9 Skupinový systém MNSs

Krevně skupinový systém MNSs zahrnuje dva samostatné skupinové systémy MN a Ss. Skupinový systém MN byl objeven v roce 1927 Landsteinerem a Levinem. Protilátka anti-S byla poprvé popsána v roce 1947 a protilátka anti-s byla objevena v roce 1951. M, N, S, s antigeny mohou být identifikovány v časném stádiu fetálního vývoje. Při narození jsou MNSs antigeny plně vyvinuty. [7] První protilátky definující antigeny M a N byly sice popsány u králíků, imunizovaných lidskými erytrocyty, záhy však byly prokázány i lidské aloprotilátky. Postupně se z tohoto systému stal druhý nejvíce polymorfní systém. Protilátky anti-M jsou většinou chladové povahy. Jen vzácně jsou účinné při tělesné teplotě, v tom případě i schopné vyvolat HTR a novorozenecké erytoblastózy. Anti-N jsou význačně vzácnější, skoro výhradně chladové. [11] Anti-S a anti-s se vyskytují převážně jako imunní protilátky. Mohou se však vyskytovat rovněž přirozeně. Vzhledem k tomu, že antigen s je v populaci přítomen ve vysoké frekvenci, protilátka anti-s se nachází vzácně. Protilátky anti-S a anti-s mohou způsobovat HTR a HON. [5, 7, 10]

1.2.10 Skupinový systém Lutheran

Krevně skupinový systém Lutheran byl objeven v roce 1945 Callenderem. Zkráceně se Lutheran systém nazývá Lu. Nejdůležitějšími antigeny Lutheran systému jsou Lu(a) a Lu(b). Specifita anti-Lu(a) byla popsána v roce 1945, anti-Lu(b) o deset let později. Dnes je známých 19 antigenů tohoto systému. Většina antigenů se vyskytuje v populaci ve velmi vysoké frekvenci. Lu(a) a Lu(b) antigeny nejsou při narození ještě plně vyvinuty. Antigeny nejsou velmi imunogenní a množství antigenu se mezi

jednotlivými osobami liší. Klinický význam není příliš velký, protilátky tohoto systému mohou působit potransfuzní reakce, ale většinou mírné a kvůli slabé expresi na fetálních erythrocytech nejsou spojovány s případy HON. [5, 7, 10]

1.2.11 Skupinový systém Diego

Antigeny tohoto systému jsou Di(a), Di(b), Wr(a), Wr(b). Protilátky anti-Di mohou působit HTR a HON (někdy těžké). Protilátka anti-Wr(a) nebývá často zachycena z důvodu absence Wr(a) antigenu na screeningových krvinkách. [5]

1.2.12 Ostatní skupinové systémy

Další skupinové systémy jsou z hlediska HON méně významné. Patří mezi ně např. skupinový systém Lewis, P1, Dombrock, Yt, Xg, Scianna, Gerbich aj. [5]

1.3 Metody používané k určování krevně skupinových protilátek

Aglutinace je nejvhodnější metoda k určování protilátek proti erythrocytům. Při tomto postupu jsou senzibilizované erythrocyty, protilátkami aglutinovány, což lze pozorovat makroskopicky. Aglutinace značí pozitivní reakci protilátek a erythrocytů. Protilátky IgM způsobují přímou aglutinaci. Pokud jsou protilátky třídy IgG, erythrocyty jsou těmito protilátkami senzibilizovány, ale nenastává aglutinace. K detekci IgG protilátek je třeba použít nepřímou metodu. K dosažení aglutinace je nutno přidat další substance, např. antiglobulinové sérum. Nepřímá aglutinace je způsobena vzdáleností mezi erythrocyty. Bílkoviny v membráně erythrocytů mají negativní elektrický náboj. Ve vodných roztocích je kolem erythrocytů vytvořen vodní plášť s pozitivně nabitými

ionty. Vzniká rozdíl potenciálu mezi erytrocyty s negativním nábojem a pozitivně nabitými ionty v médiu. Tento rozdíl v potenciálu se nazývá zeta potenciál. Z důvodu stejného náboje se erytrocyty navzájem odpuzují. Jejich vzdálenost je přibližně 16 nm. [7]

1.3.1 Antiglobulinový test

Základním testem v detekci IgG protilátek je antiglobulinový test. Senzibilizované erytrocyty nejsou aglutinovány přímo. Aglutinace nastává pomocí protilátek proti navázaným imunoglobulinům. V roce 1908 učinil tento objev Moreschi a znovu v roce 1945 Coombs (další název pro antiglobulinový test - Coombsův test). Je to nejdůležitější metoda k určování inkompletních protilátek. V imunohematologii se používá přímý antiglobulinový test (PAT) a nepřímý antiglobulinový test (NAT).

PAT signalizuje erytrocyty senzibilizované protilátkami z důvodu autoprotiátek proti vlastním erytrocytům, protilátek pocházejících od matky proti erytrocytům jejího dítěte, protilátek proti erytrocytům vytvořené po transfuzi. Při vyšetření PAT se k erytrocytům pacienta přidá pouze antiglobulinové sérum.

NAT signalizuje volné nenavázané antierytrocytární protilátky ve vzorku séra nebo plazmy pacienta. Používá se k průkazu antierytrocytárních protilátek při screeningu protilátek, v testu kompatibility, při identifikaci protilátek.

Vyšetření nepřímým antiglobulinovým testem má tři fáze:

- I. Sérum nebo plazma pacienta se inkubuje s erytrocyty, přítomné protilátky se navazují
- II. Erytrocyty se důkladně promyjí, nenavázané protilátky se odstraní
- III. Přidá se antiglobulinové sérum (AHG) – protilátka proti lidské bílkovině zajistí přemostění mezi senzibilizovanými erytrocyty

[7]

1.3.1.1 NAT ve zkumavce

Antiglobulinový test byl původně prováděn zkumavkovou metodou. V tomto provedení je nutná promývací fáze před přidáním sekundární protilátky, sloužící k odstranění nenavázaných imunoglobulinů. Pokud by tato fáze promývání nebyla provedena a sekundární protilátka byla přidána k senzibilizovaným erytrocytům, navázala by se na volné imunoglobuliny a nenastala by aglutinace erytrocytů. Fáze promývání je slabinou zkumavkového NAT testu, čas provedení je prodloužen. Tato zkumavková metoda je nahrazována modernějšími, citlivějšími testy. [5]

1.3.1.2 NAT sloupcová gelová aglutinace

V této metodě není třeba promývací fáze. Gelová matrix obsahuje sekundární protilátku v dolní části mikrozkušavky a v horní, rozšířené části mikrozkušavky probíhá fáze inkubace (viz Příloha 3). Gelové částice jsou takové velikosti, že mezery mezi nimi jsou průchozí pouze pro jednotlivou krvinku. V gelovém sloupci jsou zadržovány shluky dvou a více krvinek, velké shluky zůstávají na horní části sloupce, projdou-li všechny krvinky na dno zkumavky, značí to negativní reakci. Po fázi inkubace následuje centrifugace. Jako první se dostávají do pohybu erytrocyty vlivem své vyšší specifické váhy a přicházejí do oblasti gelu dříve než pomaleji putující nenavázané imunoglobuliny. [5] Protilátka reaguje se specifickým antigenem, který stimuloval její tvorbu. Na základě schématu její reaktivity lze protilátku definovat v porovnání s panelem diagnostických erytrocytů se známou antigenní konfigurací. [12]

1.3.1.3 NAT pevná fáze

V současnosti často používaný a srovnatelně citlivý test s metodou sloupcové gelové aglutinace, prováděný v mikrotitračních destičkách nebo jednotlivých stripech. Membránami erytrocytů, nesoucí potřebné antigeny, jsou potažena dna jednotlivých „U“ jamek. Do těchto jamek je přidána vyšetřovaná plazma nebo sérum. Dochází k navázání protilátek jako „druhá vrstva sendviče“. Následuje promytí jamek, aby došlo k odstranění nenavázaných imunoglobulinů, a poté jsou přidány „indikátorové erytrocyty“. V jamkách, kde je dvouvrstva „membrána + imunoglobuliny“, adherují

indikátorové krvinky na dno jako „třetí vrstva sendviče“. Homogenní zbarvení jamky značí pozitivní reakci. V jamkách, kde nejsou navázány imunoglobuliny na membránách, nedochází k vazbě indikátorových krvinek na tyto membrány a indikátorové krvinky sedimentují na hlubší střední část dna – vytváří terčík, který značí negativní reakci. [5]

1.3.2 Screeningové vyšetření antierytrocytárních protilátek

Screeningový panel se používá k testování nepravidelných protilátek v séru nebo plazmě pacienta. Obsahuje erytrocyty krevní skupiny 0, aby pravidelné protilátky anti-A a anti-B nenarušily test. Screeningové erytrocyty musí být vybrány takovým způsobem, aby obsahovaly nejdůležitější antigeny krevně skupinových systémů a mohly být zachyceny všechny klinicky významné protilátky proti erytrocytům. Screeningové panely jsou většinou sestaveny ze tří různých erytrocytárních suspenzí. V těchto panelech jsou antigeny nejdůležitějších krevně skupinových systémů přítomny v homozygotní kombinaci. Je to důležité z důvodu zachytu slabých protilátek proti erytrocytům. Klinicky důležité protilátky nemusí být zachyceny pomocí erytrocytů od heterozygotů, ale pouze krvinkami homozygotů. Tato skutečnost se nazývá efekt dávky. [7, 13]

1.3.3 Identifikace antierytrocytárních protilátek

Při pozitivitě screeningového vyšetření, musí být určena specifita protilátky. K provedení identifikace je nutné použít širší panel diagnostických erytrocytů. Tyto identifikační panely obsahují erytrocytární suspenze, které jsou nakombinovány tak, aby byly pozitivní nebo negativní pro důležité krevně skupinové antigeny. Identifikace protilátek se provádí podle stanoveného protokolu v co nejširším rozsahu. Specifita protilátky se určuje podle získaného profilu reakcí z identifikačního panelu. Po určení

specifity protilátky, je nutné stanovit, jedná - li se o autoprotiilátky nebo aloprotilátky. Je třeba vyšetřit přítomnost příslušného antigenu na erythrocytech, proti kterému je protilátka namířena. Vždy je nezbytné při určení protilátky zkontrolovat přítomnost další protilátky popřípadě protilátek postupem, který se nazývá vyloučení překrytých protilátek. [7]

1.4 Aloimunizace těhotných žen

Aloimunizace a tvorba protilátek proti nestejnokupinovému antigenu může nastat při podání inkompatibilní transfuze, ale může nastat i za přirozených podmínek během těhotenství. U těhotných žen erythrocytární aloimunizaci způsobují antigeny na erythrocytech plodu. Specifické antigeny plodu stimulují imunitní systém matky k tvorbě protilátek, které jsou namířeny proti těmto antigenům. Za normálních okolností krevní oběh plodu nesouvisí bezprostředně s krevním oběhem matky. Erythrocyty plodu se nedostávají do krevního oběhu matky a naopak. Nepřímo se navzájem stýkají v placentě. [8] Placenta je složitá tkáň, ve které probíhají metabolické pochody mezi matkou a plodem. Někdy dojde k proniknutí malého množství fetální krve do oběhu matky, k tzv. fetomaternálnímu krvácení. Krvácení nastává většinou ve vyšším gestačním stádiu, může k němu dojít také při některých intrauterinních výkonech a zejména v období porodu. Existují dva důvody, proč matka vytváří krevně skupinové protilátky: podání inkompatibilní transfuze v minulosti nebo proniknutí fetálních erythrocytů do krevního oběhu matky. Fetomaternální krvácení se může vyskytnout v průběhu každého těhotenství, ale šance se zvyšuje s délkou těhotenství a je největší při narození dítěte, protože během porodu dochází k silné kontrakci děložní stěny. [7]

Rozdělení příčin imunizace těhotné:

- Fetomaternální krvácení – předporodní, během porodu
- Potraty – spontánní, terapeutický
- Mimoděložní těhotenství
- Předčasné odloučení placenty

- Porodnické zákroky
- Krevní transfuze

[10]

1.5 Hemolytické onemocnění novorozence

HON je nemoc, u které je charakteristické zkrácené přežívání erytrocytů plodu a novorozence. První záznam o něm je znám ze 17. století. Louise Bourgeois, porodní bába Marie de Medici, popsala v roce 1609 zajímavý případ žloutenky u novorozeneckých dvojčat. Levin a Stetson již v roce 1939 prokázali, že žena může být imunizována v průběhu těhotenství proti krevně skupinovým antigenům, přítomným na erytrocytech jejího dítěte a které u ní chybí. [7]

Onemocnění může mít různě těžký průběh. Bývá příčinou závažné fetální a novorozenecké morbidity a mortality. Hemolýza je imunního typu. Mateřské protilátky se váží na specifické antigeny fetálních a novorozeneckých erytrocytů. Takto senzibilizované erytrocyty následně hemolyzují. Antigen, který je nejčastější příčinou HON, je antigen D z Rh systému. K imunizaci může dojít i při neshodě matky a fetu v ABO antigenech nebo v antigenech jiných krevních skupin. Za klinicky významné protilátky z hlediska možného rozvoje HON jsou považovány protilátky anti-A, -B, -C, -c, -D, -E, -e, -Ce, -cE, -K, -Fy(a), -Jk(a). Protilátky, jejichž klinický význam se musí zvažovat individuálně patří např. anti-Cw, -ce, -G, -M, -N, -S, -s, -U, -Fy(b), -k, -Kp(a), -Kp(b), -Js(a), -Js(b), -P1, -Jk(b), -Diego, anti-LFA, anti-HFA. Především protilátky specifity anti-D, -c, -E, -K mohou způsobit těžký HON a vyžadují přísnější sledování. Z hlediska HON se mezi klinicky nevýznamné protilátky řadí protilátky anti-P1, -Le(a, b), -H, -I, -HI, -N, -Lutheran, panspecifické protilátky, chladové protilátky, protilátky reagující jen v enzymovém prostředí. Jako následek předchozí transfuze se u těhotných žen často prokazují protilátky anti-c, -K, -Fy(a). Imunitní humorální odpověď u HON má dvě fáze. Imunitní systém matky po rozpoznání cizorodého erytrocytárního antigenu začne tvořit proti antigenu protilátky. Nejdříve vznikají

protilátky třídy IgM, které se během několika týdnů mění na typ IgG. Tento proces se označuje jako primární imunitní odpověď a závisí především na množství antigenu. Při opakovaném setkání s původním antigenem, např. v dalších těhotenstvích, dochází velmi rychle k produkci protilátek a vznikají v mnohem větší koncentraci. Jde o sekundární anamnestickou imunitní odpověď. Vlastní imunitní reakce začíná rozpoznáním antigenu imunitním systémem matky. Placentou pronikají pouze imunoglobuliny typu IgG s nízkou molekulovou hmotností, do 24. týdne těhotenství velmi pomalu. HON je v tomto období velmi vzácné. Transfer protilátek se zvyšuje ve druhé polovině gestace a hladina protilátek u fetu může být vyšší než u matky. Protilátky typu IgM, které mají vysokou molekulovou hmotnost, do fetální krve nepřecházejí. Fetální erytrocyty s navázanou mateřskou protilátkou podléhají hemolýze. Hematopoetické tkáně fetu – játra, slezina, kostní dřeň – reagují na hemolýzu zvýšením erytropoézy. Pokud erytropoéza nestačí kompenzovat rozpad erytrocytů, dochází k anémii, která může mít různý stupeň závažnosti. Těžká anémie může vést ke generalizovanému otoku a k srdečnímu selhání plodu. Při rozpadu erytrocytů vzniká velké množství nekonjugovaného bilirubinu. Hromadění bilirubinu v krvi fetu vede k ikteru a bilirubin se kumuluje především v centrálním nervovém systému, jehož buňky poškozují. [10] Vysoká hladina nekonjugovaného bilirubinu může vést k trvalému poškození mozku s následným těžkým postižením dítěte, jak fyzickým tak mentálním. [7] Raritou imunizace v Rh systému je tzv. grandmother syndrom. U matky, která je RhD pozitivní, dochází během porodu k fetomaternálnímu průniku RhD pozitivního antigenu do cirkulace RhD negativního plodu ženského pohlaví, čímž vzniká první kontakt plodu s RhD antigenem. V budoucnosti po otěhotnění takto imunizované ženy může dojít k paměťové reakci, jestliže plod nese na svých fetálních erytrocytech antigen D zděděný od otce. Nastává tvorba protilátek a hemolýza fetálních erytrocytů již v první graviditě. [14]

1.5.1 Rozdělení hemolytického onemocnění novorozence

Podle typu protilátky rozlišujeme:

- Rh HON (většinou anti-D, anti-c, anti-E, ale i kombinace jiných Rh protilátek, např. anti-D+C)
- AB0 HON při anti-A, -B protilátkách
- HON při protilátkách proti antigenům jiných krevních skupin

[10]

Tabulka 2: Rozvinuté hemolytické onemocnění novorozence a příčiny vzniku v Nizozemí (studie 2003 - 2005)

Typ protilátky	Případy HON	% výskytu
Anti-D	2	4,7%
Anti-C	3	7%
Anti-c	16	37%
Anti-E	4	9,3%
Anti-K	1	2,3%
Anti-Fy(a)	5	11,7%
Anti-Fy(b)	2	4,7%
Anti-Jk(a)	4	9,3%
Anti-Jk(b)	1	2,3%
Anti-S	2	4,7%
Anti-s	2	4,7%
Anti-Cw	1	2,3%

Zdroj: Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands [15]

1.5.2 Léčba hemolytického onemocnění novorozence

Léčebná opatření mají předejít vzestupu hladiny bilirubinu, aby nedošlo k ohrožení novorozence rozvojem jádrového ikteru. Těžká forma HON je taková, při níž se podávala transfuze intrauterinní, exsanguinační nebo substituční. [10]

Léčebné metody

Fototerapie - světelné záření o vlnové délce 420 - 470 nm vede k fotokonverzi bilirubinu.

Imunoterapie – profylaktické podání imunoglobulinu, které může zabránit fagocytóze senzibilizovaných erytrocytů a rychlejšímu vzestupu hladiny bilirubinu.

Léčba transfuzí

- Intrauterinní transfuze – vysoce riziková invazivní léčba HON. Lze ji použít přibližně od 20. týdne těhotenství pro korekci anémie u plodu. Erytrocyty musí být vybrány s ohledem na přítomnost mateřských protilátek a mají být kompatibilní s krví matky a plodu.
- Výměnná (exsanguinační) transfuze – účinná léčebná metoda, při které dochází k odstranění velké části bilirubinu, senzibilizovaných erytrocytů a mateřských protilátek způsobujících hemolýzu. Novorozenecká krev odebraná při výměnné transfuzi je nahrazena erytrocyty a plazmou dárce. Podávají se erytrocyty respektující mateřské protilátky a kompatibilní s krví matky a novorozence.
- Substituční transfuze převádí novorozenci malé objemy erytrocytů dárce ke korekci anémie. Podávají se erytrocyty respektující mateřské protilátky a kompatibilní s krví matky.

[10]

1.5.3 Prevence hemolytického onemocnění novorozence

Velmi rozšířenou a úspěšnou metodou v prevenci HON bylo zavedení profylakticky podávaného anti-D imunoglobulinu. Současné možnosti profylaxe jsou omezeny pouze na prevenci RhD typu HON. RhIg se podává všem D-negativním ženám po porodu D-positivního dítěte a také v některých situacích během těhotenství, pokud si těhotná nevytvořila vlastní protilátku anti-D. Parenterálně podaná protilátka anti-D potlačuje imunitní odpověď na D-positivní erytrocyty, které pronikly během

fetomaternálního krvácení do oběhu matky. RhIg se aplikuje Rh negativním ženám také po prenatalních diagnostických výkonech nebo při některých těhotenských komplikacích. [10] Aplikace imunoglobulinu anti-D se provádí v případě potratu, mimoděložního těhotenství, amniocentézy, úmrtí plodu, známky fetomaternálního krvácení, porodu D-pozitivního dítěte. [16] U žen, které mají na svých erytrocytech slabý antigen D nebo variantní antigen D, je vhodné, aby ji byla aplikována imunoprevence v případě porodu D-pozitivního dítěte. [17] Povinné aplikování imunoprevence je u nás zavedeno od roku 1972. [18] Studie, které byly na toto téma prováděny, se zabývaly mimo jiné efektivitou nákladů a ukázaly, že se jedná o cenný ochranný postup po zdravý vývoj plodu a novorozence. [19]

1.6 Imunohematologické vyšetření během těhotenství

Imunohematologické vyšetření se provádí ve 12. týdnu těhotenství (10. – 16.), obsahuje vyšetření krevní skupiny v systému AB0, vyšetření antigenu D, vyšetření nepravidelných protilátek. [20]

1.6.1 AB0

K identifikaci těhotné slouží především vyšetření krevní skupiny v systému AB0. Jakékoliv diskrepance je nezbytné vyšetřit a objasnit. Vyšetření podskupin není nutné.

Metody a diagnostika

Vyšetřují se aglutinogeny a aglutininy pomocí monoklonálních diagnostických sér anti-A, anti-B a diagnostických erytrocytů A1 a B. Jedná – li se o opakované těhotenství a je-li k dispozici záznam o vyšetřené krevní skupině, je dostačující kontrolní vyšetření aglutinogenů.

[20]

1.6.2 Antigen D

Vyšetření antigenu D vyčleňuje skupinu žen D-negativních, u nichž je zapotřebí imunoprevence anti-D. Vyšetření slabého antigenu D (Dw) není nutné.

Metody a diagnostika

Antigen D se vyšetřuje použitím dvou monoklonálních sér anti-D třídy IgM různých klonů, která nedetekují variantu D^{VI}. Jedná-li se o opakované těhotenství a je-li k dispozici záznam o vyšetřené krevní skupině, je dostačující kontrolní vyšetření jedním ze zmíněných diagnostických sér anti-D. Nedoporučuje se použít sérum anti-CDE.

Slabý antigen D či D variantu (Dw/v) je třeba brát v úvahu u:

- slabší reakce obou diagnostických sér anti-D
- zcela rozdílné reakce použitých diagnostických sér anti-D (pozitivní x negativní)
- rozdílná síla reakcí obou diagnostických sér anti-D
- nečekaný nález anti-D imunizace s negativní autoreakcí u osoby, která má normální antigen D
- rozdíl mezi anamnestickým údajem a současným vyšetřením

Ve sporných případech je vhodné klasifikovat těhotnou jako Dw/v. Je vhodné s ohledem na přítomnost variantního antigenu D nebo slabého antigenu D provádět anti-D imunoprevenci.

[20]

1.6.3 Screening a identifikace nepravidelných aloimunních antierytrocytárních protilátek

Klinicky významné nepravidelné antierytrocytární protilátky lze přibližně prokázat u 1% těhotných žen. Klinicky významné protilátky, které mohou ohrozit plod a/nebo novorozence nám umožňuje detekovat screening nepravidelných protilátek. V rozvinutí

HON se mohou klinicky uplatňovat i jiné specifické protilátky než anti-D a D-pozitivní těhotné ženy mohou tvořit protilátky jiné než anti-D, a proto vyšetření nepravidelných protilátek má význam nejen u D-negativních žen, ale i u D-pozitivních žen.

Metody a diagnostika

Za vhodné se mohou považovat metody sloupcové gelové aglutinace, metody pevné fáze, zkumavkové metody. Screeningová metoda by měla obsahovat metodu NAT s použitím diagnostických erytrocytů resuspendovaných v roztoku o nízké iontové síle (LISS/NAT). Použití enzymových testů z hlediska problematiky HON nemá velký význam.

Diagnostické erytrocyty – screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek

Je vhodné použít panel 3 diagnostických erytrocytů krevní skupiny 0, které obsahují minimálně tyto antigeny: C, Cw, c, D, E, e, K, k, Fy(a), Fy(b), Jk(a), Jk(b), S, s, M, N, Le(a). Jedny z diagnostických screeningových erytrocytů by měly obsahovat fenotyp Dce/Dce jedny fenotyp DcE/DcE. V homozygotním zastoupení by měly být antigeny Fy(a), Fy(b), Jk(a), Jk(b), S, s. Ve směsi (tzv. poolované) se diagnostické screeningové erytrocyty nesmí používat.

Diagnostické erytrocyty – identifikace nepravidelných antierytrocytárních protilátek

Je vhodné použít panel minimálně osmi diagnostických erytrocytů krevní skupiny 0. Panel by měl obsahovat minimálně jeden fenotyp R_1R_1 (DcE/Dce), $R_1^wR_1$ (DcE/DcE), R_2R_2 (DcE/DcE) tyto erytrocyty by měly obsahovat antigeny K, k, Fy(a), Fy(b), Jk(a), Jk(b), M, S, s. Také by měl panel obsahovat fenotyp $r'r$ (D-negativní Ccee), $r'r$ (D-negativní ccEe), dvakrát fenotyp rr (D-negativní ccee), u tohoto fenotypu by měla být kombinace antigenů K^+ , K^- , $Jk(a+b^-)$, $Jk(a+b^+)$, $S+s^-$, $S+s^+$, $Fy(a+b^-)$, $Fy(a+b^+)$.

[20]

1.6.4 Fenotyp matky

V případě určení specifické protilátky, je vhodné vyšetřit komplementární antigen k dané protilátce pro potvrzení specifity. [20]

1.6.5 Stanovení titru nepravidelných protilátek

Stanovení titru klinicky významných protilátek u těhotných žen, nám pomáhá identifikovat těhotenství, která jsou v riziku HON. Titrování slouží jako screening pro rozhodnutí, kdy začít monitorovat HON jinou metodou než imuno hematologickou. Pokud se v předchozím těhotenství vyskytl těžký HON, není užitečné titrování klinicky významných protilátek v dalších těhotenstvích. Je-li vyšetření dostupné, je vhodné v těchto případech určit genotyp plodu, není-li pro daný antigen otec homozygot a sledovat plod jinou než imuno hematologickou metodou. [10, 20]

Klinicky významný titer

- **Vstupní vyšetření - 12. (10. – 16.) týden těhotenství, první záchyt klinicky významné protilátky**

Zkumavkový test NAT při 37°C, anti-IgG nebo anti-IgG+anti-C3d

- ✓ Anti-D, -C, -E $\geq 1:32$
- ✓ Anti-K* $\geq 1:4$
- ✓ Ostatní protilátky $\geq 1:64$

Sloupcová aglutinace – LISS/NAT

- ✓ Anti-D, -C, -E $\geq 1:128$
- ✓ Anti-K* $\geq 1:8$
- ✓ Ostatní protilátky $\geq 1:128$

(* Uplatňuje se efekt imunitní suprese erytropoézy)

- **Prokázané anti-D, -C, -E, -K, u ostatních specifit pouze v případě těžkého HON - 4 týdny po vstupním vyšetření**
 - ✓ Může dojít k záchytu další specifické protilátky
 - ✓ Vyšetření komplementárního antigenu
 - ✓ Titrace protilátek každé 4 týdny, pokud není jednoznačná negativita otce pro daný antigen
 - ✓ Od 28. týdne titrace protilátek každé 2 týdny

- **28. (26. – 30.) týden těhotenství, první záchyt klinicky významné protilátky**
 - ✓ Vyšetření komplementárního antigenu
 - ✓ Titrace protilátky každé 2 týdny
 - ✓ Výjimku tvoří průkaz anti-D po podání imunoglobulinu anti-D. Velmi důležitá je informace o profylaktickém podání imunoglobulinu anti-D

[20]

2 Cíl práce

1. Literární shrnutí současných metod, porovnání jejich výhod a nevýhod, význam pro klinickou praxi.
2. Praktické osvojení principů metod titrace protilátek pomocí sloupcové gelové aglutinace a zkumavkové metody.
3. Vyhodnocení získaných výsledků, porovnání provozně-ekonomického hlediska.
4. Diskuze získaných dat.

3 Metodika

Na prenatální laboratoři TRS NCB bylo v období 1. 1. 2011 – 31. 7. 2013 vyšetřeno 5622 vzorků těhotných žen z důvodu určení potencionálně rizikové skupiny z hlediska HON.

Zásadní je správná identifikace těhotné, novorozence, vyšetřovaného otce, správný odběr a označení vzorku, transport vzorku do laboratoře, úplné a správné údaje na žádance.

Označení vzorku před odběrem: Jméno a příjmení, číslo pojištěnce (RČ), datum odběru vzorku.

Žádanka: Jméno a příjmení, číslo pojištěnce (RČ), datum a čas odběru, diagnóza, zdravotní pojišťovna, těhotenská anamnéza, týden gravidity, transfuzní anamnéza, informace o dříve zjištěných protilátkách, informace o aplikované RhD profylaxi, identifikace žadatele, identifikace odebírajícího vzorek.

Každý pracovní den se před začátkem vyšetření provádí denní kontrola kvality diagnostik.

[21]

3.1 Vyšetření krevní skupiny a vyšetření Rh faktoru

Princip vyšetření

Manuální vyšetření krevní skupiny ABO/RhD se provádí zkumavkovou metodou na principu přímé aglutinace. Povrch erytrocytů nese za normálních okolností slabý negativní náboj. Ionty z dilučního roztoku vytváří okolo erytrocytu další elektrostatické vrstvy a v důsledku se nemohou krvinky k sobě přiblížit. Vzdálenost mezi nimi 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 myší IgM protilátky. Stanovení

antigenů na erythrocytech je doplněno testováním přítomnosti odpovídajících anti-A a/nebo anti-B aglutininů v séru pacienta s použitím A1 a B diagnostických erythrocytů.

Vyšetření AB0 aglutinogenů provádíme detekcí antigenů na erythrocytech, pomocí známých diagnostických sér, a detekcí aglutininů v plazmě nebo séru jedince pomocí diagnostických erythrocytů.

Vyšetření RhD antigenu provádíme pomocí diagnostického antiséra. Každý vzorek se vyšetřuje dvojmo různými monoklonálními diagnostickými séry třídy IgM, které nedetekují variantu D^{VI}.

Pracovní potřeby

- Diagnostiká séra anti-A, anti-B, anti-AB monoklonální (Sanquin), anti-D IgM (IVT Imuno), anti-D IgM (BIOSCOT), monoklonální kontrola (BIOSCOT).
- Diagnostické erythrocyty A₁, B, 0 (Příprava na TRS NCB).
- Pufrovaný fyziologický roztok pH 6.98 – PBS (Příprava Lékárna NCB).
- Aglutinační zkumavky, Wassermannovy zkumavky, jednorázové 3ml pipety, skleněné pasterky, jednorázové rukavice, laboratorní centrifuga.

Znaky analytické metody

Jedná se o semikvantitativní metodu, která umožňuje dobrou opakovatelnost i reprodukovatelnost pozitivního i negativního výsledku. Měřící rozsah: negativní-pozitivní. Síla aglutinace se uvádí na počet křížů +, ++, +++, +++++. Odečítáme makroskopicky.

Vyšetřovaný materiál

Venózní nesrážlivá nebo srážlivá krev.

Pracovní postup

1) Zkumavku se vzorkem pacienta centrifugujeme při 3500-5000 ot./min. 5 min., aby došlo k oddělení plazmy nebo séra a erythrocytů

2) Do označené Wassermannovy zkumavky připravíme 3% suspenzi erytrocytů v PBS

3) Vyšetření se provádí ve zkumavkách s rozkapanými diagnostiky, které označíme jménem pacienta:

1. řada vyšetření aglutinogenů a antigenu RhD, monoklonální kontrola: diagnostika anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D, monoklonální kontrola

2. řada vyšetření aglutininů a antigenu RhD: diagnostické erytrocyty A₁, B, 0, diagnostikum anti-D

Do každé zkumavky s diagnostiky přidáme 3% suspenzi erytrocytů pacienta v PBS, do každé zkumavky s diagnostickými erytrocyty přidáme plazmu (nebo sérum) pacienta

4) Zkumavky protřepeme a centrifugujeme při 1000 ot./min. po dobu 1 min.

5) Je nutné prohlédnout zkumavky, není-li přítomna hemolýza, která může být způsobena důsledkem bakteriální kontaminace a nesmí být považována za pozitivní výsledek

6) Erytrocyty resuspendujeme jemným poklepem ne dno zkumavky

7) Odečítáme makroskopicky

[12, 21, 22, 23, 24]

Tabulka 3: Určení krevní skupiny AB0 pomocí aglutinogenů a aglutininů

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

Zdroj: SOP [12]

Tabulka 4: Určení Rh faktoru

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

Zdroj: SOP [12]

3.2 Vyšetření screeningu antierytrocytárních protilátek metodou sloupcové gelové aglutinace

Princip vyšetření

Toto vyšetření stanovuje přítomnost antierytrocytárních protilátek, které vznikly imunizací pacienta po podání transfuze nebo u ženy v těhotenství. Vyšetření provádíme metodou sloupcové gelové aglutinace tzv. nepřímým antiglobulinovým testem (NAT).

NAT zachycuje klinicky významné protilátky třídy IgG. Protože NAT metody mohou detekovat téměř všechny klinicky významné protilátky, doporučuje se pro screening protilátek použití samotného NAT bez další doplňující screeningové techniky.

Enzymatický test (ET) je doplňující metoda, vzácně citlivější než NAT. ET 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 (AK) nebo PAT se rutinně provádí jako součást screeningu protilátek při předtransfuzním vyšetření u novorozenců a dětí do 6 měsíců věku a při vyšetření pozitivních antierytrocytárních protilátek, které již byly identifikovány při předchozím vyšetření.

Princip NAT sloupcové gelové aglutinace

Plastová ID-karta LISS/Coombs se skládá z 6 mikrozkušavek, které obsahují gelovou matrix, skrze kterou během centrifugace prochází vyšetřovaný materiál. Gelové částice jsou průchozí pouze pro jednotlivou krvinku. V gelovém sloupci jsou zachyceny shluky 2 a více krvinek, na horní části sloupce zůstávají velké shluky. Při negativní reakci všechny krvinky projdou na dno zkumavky. Gelová matrix ID-karty LISS/Coombs obsahuje polyspecifické AHG (králičí anti-IgG a monoklonální anti-C3d). V horní rozšířené části mikrozkušavky probíhá inkubační fáze. Při následné centrifugaci erytrocyty a imunoglobuliny prochází gelovou matrix. Protilátka reaguje specificky s antigenem, který stimuloval její tvorbu. Protilátku lze identifikovat z identifikačního protokolu obsahující diagnostické erytrocyty se známou kombinací antigenů.

Pracovní potřeby

- ID-karty LISS/Coombs (pro NAT), ID-karty NaCl (pro ET), ID-DiaCell I-II-III (pro NAT), ID-DiaCell IP-IIP-IIIP (pro ET), ID-Diluent 2 (Modifikovaný LISS pro přípravu suspenze erytrocytů), ID-Papain (Papainový roztok připravený k přímému použití pro úpravu krvinek papainem do AK). Všechny diagnostika jsou od firmy DiaMed.
- Špičky, jednorázové rukavice, laboratorní centrifuga, ID-pipetor, ID-inkubátor, ID-centrifuga, stojan na ID-karty.

Znaky analytické metody

Jedná se o semikvantitativní metodu, která umožňuje dobrou opakovatelnost a reprodukovatelnost. Měřicí rozsah negativní-pozitivní. Síla aglutinace se uvádí na počet křížů +, ++, +++, +++++. Odečítáme makroskopicky.

Vyšetřovaný materiál

Venózní nesrážlivá nebo srážlivá krev.

Pracovní postup

- 1) Před provedením screeningu protilátek je potřeba všechny reagensie vytemperovat na pokojovou teplotu
 - 2) Vzorek pacienta centrifugujeme při 3500-5000 ot./min. 5 min., aby došlo k oddělení plazmy (nebo séra) a erytrocytů
 - 3) ID-kartu LISS/Coombs a ID-kartu NaCl označíme jménem pacienta a jednotlivé mikrozkušavky popíšeme číslem diagnostických erytrocytů I, II, III, AK
 - 4) Diagnostické erytrocyty ID-DiaCell, které jsou již od výrobce připraveny na pracovní koncentraci 0,8%, před použitím jemně promícháme, nejprve napipetujeme do všech mikrozkušavek 50 μ l diagnostických erytrocytů I, II, III a IP, IIP, IIIP
 - 5) Do mikrozkušavky označené AK nepipetujeme 50 μ l 0,8% suspenzi erytrocytů pacienta v ID-Diluentu 2
 - 6) Do všech mikrozkušavek napipetujeme 25 μ l plazmy nebo séra
 - 7) Do mikrozkušavky označené AK na ID-kartě NaCl nepipetujeme 25 μ l ID-Papainu
 - 8) ID-karty inkubujeme 15 min. v ID-inkubátoru při 37°C, ID-inkubátor vydá zvukový signál po uplynutí inkubační doby
 - 9) ID-karty centrifugujeme v ID-centrifuze, otáčky a doba centrifugace jsou pevně nastaveny výrobcem
 - 10) Odečteme výsledek
- [12, 21, 22, 23, 24]

Obrázek 1: Schéma ID-karty LISS/Coombs – screening protilátek

Nepřímý antiglobulinový test		
ID-DiaCell I	ID-DiaCell II	ID-DiaCell III
50 µl 0,8% suspenze ID-Diacell + 25 µl vyšetřované plazmy/séra		

Zdroj: SOP [12]

Obrázek 2: Schéma ID-karty NaCl – screening protilátek

NaCl (Enzymatický test)		
ID-DiaCell IP	ID-DiaCell IIP	ID-DiaCell IIIP
50 µl 0,8% suspenze ID-Diacell-P + 25 µl vyšetřované plazmy/séra		

Zdroj: SOP [12]

3.3 Identifikace antierytrocytárních protilátek metodou sloupcové gelové aglutinace

Princip vyšetření

Plazma nebo sérum pacienta jsou testovány metodou sloupcové gelové aglutinace (NAT) proti identifikačnímu panelu diagnostických erytrocytů. Vhodné je zařazení vlastních erytrocytů pacienta tzv. autologní kontrola (AK), k odlišení aloprotilátky od autoprotilátky. 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 může pomoci zejména při identifikaci protilátek, které reagují slabě v NAT nebo v případě směsi protilátek.

Pracovní potřeby

- Identifikační panel erytrocytů ID-DiaPanel (pro NAT), identifikační panel erytrocytů ID-DiaPanel-P (pro ET), ID-karty LISS/Coombs (pro NAT), ID-karty NaCl (pro ET), ID-Diluent 2, ID-Papain. Všechny diagnostika jsou od firmy DiaMed.
- Identifikační panel erytrocytů Makropanel 16 (Sanquin).
- Aglutinační zkumavky, Wassermannovy zkumavky, jednorázové 3ml pipety, skleněné pipety, špičky, jednorázové rukavice, laboratorní centrifuga, ID-inkubátor, ID-centrifuga, stojan na ID-karty.

Panely erytrocytů ID-DiaPanel a ID-DiaPanel-P

Panely diagnostických erytrocytů jsou naředěny na pracovní koncentraci 0,8%. Oba panely obsahují 11 typů erytrocytů.

ID-DiaPanel slouží k vyšetření v NAT, ID-DiaPanel-P obsahuje papainizované erytrocyty a slouží k vyšetření v ET.

Identifikační panel erytrocytů Makropanel 16

Doplňující panel, který se používá u vyšetření, kde s panelem ID-DiaPanel nelze vyšetření uzavřít. U Makropanelu 16 musíme připravit 0,8% suspenzi 1x propraných erytrocytů Makropanelu 16 v ID-Diluentu 2 (ředění 1ml Diluentu 2 + 10 μ l sedimentu erytrocytů). Identifikační panel naředěný na pracovní suspenzi je použitelný 24 hod.

Znaky analytické metody

Jedná se o semikvantitativní metodu, která umožňuje dobrou opakovatelnost a reprodukovatelnost pozitivního i negativního výsledku. Měřicí rozsah: negativní – pozitivní. Síla aglutinace se uvádí na počet křížů +, ++, +++, +++++. Odečítáme makroskopicky.

Vyšetřovaný materiál

Venózní nesrážlivá nebo srážlivá krev.

Pracovní postup

Identifikace antierytrocytárních protilátek ZÁKLADNÍM panelem

Plazma nebo sérum pacienta, těhotné ženy se vyšetřuje aglutinačními metodami na ID-kartách s panely erytrocytů s určenými antigeny sestavených tak, aby vylučovací metodou podle negativních a pozitivních reakcí bylo ve většině případů u pacienta možné určit specifitu protilátek (aloprotilátky a autoprotílátky).

- 1) Před provedením identifikace protilátek je potřeba všechny reagentie vytemperovat na pokojovou teplotu
- 2) Vzorek pacienta centrifugujeme při 3500-5000 ot./min. 5 min., aby došlo k oddělení plazmy (nebo séra) a erytrocytů
- 3) ID-karty LISS/Coombs označíme jménem pacienta a jednotlivé mikrozkušavky popíšeme číslem diagnostických erytrocytů 1-11
- 4) ID-karty NaCl označíme jménem pacienta a jednotlivé mikrozkušavky popíšeme číslem diagnostických erytrocytů 1-11

5) Diagnostické erytrocyty ID-DiaPanel před použitím jemně promícháme, nejprve napipetujeme na ID-kartu LISS/Coombs 50 μ l diagnostických erytrocytů 1-11, k nim napipetujeme 25 μ l plazmy (nebo séra) pacienta

6) Diagnostické erytrocyty ID-DiaPanel-P před použitím jemně promícháme, nejprve napipetujeme na ID-kartu NaCl 50 μ l diagnostických erytrocytů papainizovaných 1-11, k nim napipetujeme 25 μ l plazmy (nebo séra) pacienta

7) ID-karty inkubujeme 15 min. 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 jsou pevně nastaveny výrobcem

9) Odečteme výsledek

10) Výsledky zaznamenáváme do pracovního protokolu, který je dodáván k panelům

Identifikace antierytrocytární protilátky doplňujícím panelem

1) Před provedením identifikace protilátek je potřeba připravit Markopanel 16 na pracovní koncentraci a všechny reagentie vytemperovat na pokojovou teplotu

2) Vzorek pacienta centrifugujeme při 3500-5000 ot./min. 5 min., aby došlo k oddělení plazmy (nebo séra) a erytrocytů

3) ID-karty LISS/Coombs označíme jménem pacienta a jednotlivé mikrozkušavky popíšeme číslem diagnostických erytrocytů 1-16

4) ID-karty NaCl označíme jménem pacienta a jednotlivé mikrozkušavky popíšeme číslem diagnostických erytrocytů 1-16

5) Diagnostické erytrocyty Makropanelu-16 před použitím jemně promícháme, nejprve napipetujeme na ID-kartu LISS/Coombs 50 μ l diagnostických erytrocytů 1-16, k nim napipetujeme 25 μ l plazmy (nebo séra) pacienta

6) Poté napipetujeme na kartu NaCl 50 μ l diagnostických erytrocytů 1-16, k nim napipetujeme 25 μ l plazmy (nebo séra) pacienta a následně do všech mikrozkušavek napipetujeme 25 μ l ID-Papainu

7) ID-karty inkubujeme 15 min. 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 jsou pevně nastaveny výrobcem

9) Odečteme výsledek

10) Výsledky zaznamenáváme do pracovního protokolu, který je dodávaný k panelu

Provedení autologní kontroly

1) Před provedením autologní kontroly je potřeba všechny reagenty vytemperovat na pokojovou teplotu

2) Wassermannovu zkumavku označíme jménem pacienta

3) Do označené Wassermannovy zkumavky připravíme 0,8% suspenzi erytrocytů pacienta v Diluentu 2

4) Vzorek pacienta centrifugujeme při 3500-5000 ot./min. 5 min., aby došlo k oddělení plazmy (nebo séra) a erytrocytů

5) Mikrozksamavku ID-karty LISS/Coombs a ID-karty NaCl označíme AK a označíme jménem pacienta

6) Do mikrozksamavky ID-karty LISS/Coombs a ID-karty NaCl napipetujeme 50µl 0,8% suspenze erytrocytů pacienta v Diluentu 2

7) Do mikrozksamavek obou karet napipetujeme 25µl plazmy (nebo séra) pacienta

8) Do mikrozksamavky ID-karty NaCl napipetujeme 25µl ID-Papainu

9) ID-karty inkubujeme v ID-inkubátoru při 37°C. ID-inkubátor vydá zvukový signál po uplynutí inkubační doby

10) ID-karty centrifugujeme v ID-centrifuze, otáčky a doba centrifugace jsou pevně nastaveny výrobcem

11) Odečteme výsledek

[12, 21, 22, 23, 24]

Obrázek 3: Schéma ID-karet LISS/Coombs a NaCl – identifikace protilátek

Nepřímý antiglobulinový test						Nepřímý antiglobulinový test					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
50 µl 0,8% suspenze ery ID-DiaPanelu + 25 µl vyšetřované plazmy/séra						50 µl 0,8% suspenze ery ID-DiaPanelu + 25 µl vyšetřované plazmy/séra					

NaCl enzymatický test						NaCl enzymatický test					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
50 µl 0,8% suspenze ery ID-DiaPanelu-P + 25 µl vyšetřované plazmy/séra						50 µl 0,8% suspenze ery ID-DiaPanelu-P + 25 µl vyšetřované plazmy/séra					

Zdroj: SOP [12]

3.4 Vyšetření titru protilátek těhotných žen

3.4.1 Vyšetření titru protilátek těhotných žen metodou sloupcové gelové aglutinace

Princip metody

Reakce vyšetřovaného séra v postupném dvojnásobném ředění se suspenzí erytrocytů s antigenem odpovídajícím vyšetřované protilátce v prostředí NAT.

Pracovní potřeby

- ID-karty LISS/Coombs (DiaMed), ID-Diluent 2 (DiaMed), identifikační panel Makropanel 16 (Sanquin).
- ID-pipetor, aglutinační zkumavky, Wassermannovy zkumavky, špičky, jednorázové rukavice, ID-inkubátor, ID-centrifuga, stojan na ID-karty.

Znaky analytické metody

Jedná se o semikvantitativní metodu. Měřicí rozsah: negativní-pozitivní. Síla aglutinace se uvádí na počet křížů +, ++, +++, +++++. Odečítáme makroskopicky.

Vyšetřovaný materiál

Venózní nesrážlivá nebo srážlivá krev.

Pracovní postup

1) Do Wassermannovy zkumavky připravíme 0,8% suspenzi erytrocytů v ID-Diluentu 2, použijeme erytrocyty z Makropanelu 16 (erytrocyty obsahují příslušný antigen v heterozygotní kombinaci, proti kterému je vyšetřovaná specifická protilátka namířena)

2) Připravíme 10 aglutinačních zkumavek s plazmou (nebo sérem) těhotné roztitrovanou geometrickou řadou:

1. zkumavka: 100 μ l plazmy/séra těhotné
2. zkumavka: 100 μ l PBS přidáme 100 μ l plazmy/séra těhotné
3. zkumavka: 100 μ l PBS přidáme 100 μ l směsi z předcházející zkumavky č. 2
4. zkumavka: 100 μ l PBS přidáme 100 μ l směsi z předcházející zkumavky č. 3
5. zkumavka: 100 μ l PBS přidáme 100 μ l směsi z předcházející zkumavky č. 4
6. zkumavka: 100 μ l PBS přidáme 100 μ l směsi z předcházející zkumavky č. 5
7. zkumavka: 100 μ l PBS přidáme 100 μ l směsi z předcházející zkumavky č. 6
8. zkumavka: 100 μ l PBS přidáme 100 μ l směsi z předcházející zkumavky č. 7
9. zkumavka: 100 μ l PBS přidáme 100 μ l směsi z předcházející zkumavky č. 8
10. zkumavka: 100 μ l PBS přidáme 100 μ l směsi z předcházející zkumavky č. 9

3) ID-karty LISS/Coombs označíme jménem těhotné a 10 mikrozkušavek označíme poměrem ředění

4) Do každé mikrozkušavky napipetujeme 50 μ l suspenze erytrocytů

5) Do každé mikrozkušavky napipetujeme 25 μ l plazmy (nebo séra) těhotné příslušného ředění (ze zkumavky 1-10)

6) ID-karty inkubujeme 15 min. v ID-inkubátoru při 37°C, ID-inkubátor vydá zvukový signál po uplynutí inkubační doby

7) ID-karty centrifugujeme v ID-centrifuze, otáčky a doba centrifugace jsou pevně nastaveny výrobcem

8) Odečteme výsledek

[12, 21, 22, 23, 24]

3.4.2 Vyšetření titru protilátek těhotných žen zkumavkovou metodou

Princip metody

Reakce vyšetřovaného séra v postupném dvojnásobném ředění se suspenzí erytrocytů s antigenem odpovídajícím vyšetřované protilátce v prostředí NAT.

Pracovní potřeby

- PBS (Lékárna NCB), identifikační panel Makropanel 16 (Sanquin), anti-IgG monospecifické sérum (Sanquin).
- Wassermannovy zkumavky, pipetor, aglutinační zkumavky, špičky, jednorázové rukavice, termostat, laboratorní centrifuga, mikroskop, podložní sklíčka.

Znaky analytické metody

Jedná se o semikvantitativní metodu. Měřicí rozsah: negativní-pozitivní. Síla aglutinací se udává na počet křížů +, ++, +++, +++++. Odečítáme makroskopicky i mikroskopicky.

Vyšetřovaný materiál

Venózní nesrážlivá nebo srážlivá krev.

Pracovní postup

1) Do Wassermannovy zkumavky připravíme 3% suspenzi erytrocytů v PBS, použijeme erytrocyty z Makropanelu 16 (erytrocyty obsahují příslušný antigen v heterozygotní kombinaci, proti kterému je vyšetřovaná specifická protilátka namířená)

2) Připravíme 10 aglutinačních zkumavek s plazmou (nebo sérem) těhotné roztitované geometrickou řadou

1. zkumavka: 100μl plazmy/séra těhotné
2. zkumavka: 100μl PBS přidat 100μl plazmy/séra těhotné
3. zkumavka: 100μl PBS přidat 100μl směsi z předchozí zkumavky č. 2
4. zkumavka: 100μl PBS přidat 100μl směsi z předchozí zkumavky č. 3
5. zkumavka: 100μl PBS přidat 100μl směsi z předchozí zkumavky č. 4
6. zkumavka: 100μl PBS přidat 100μl směsi z předchozí zkumavky č. 5
7. zkumavka: 100μl PBS přidat 100μl směsi z předchozí zkumavky č. 6
8. zkumavka: 100μl PBS přidat 100μl směsi z předchozí zkumavky č. 7
9. zkumavka: 100μl PBS přidat 100μl směsi z předchozí zkumavky č. 8
10. zkumavka: 100μl PBS přidat 100μl směsi z předchozí zkumavky č. 9

3) Do každé zkumavky napipetujeme 100μl 3% suspenze erytrocytů

4) Řádně promícháme

5) Inkubujeme v termostatu při 37°C 1 hod.

6) Fáze promývání: aglutinační zkumavky 3 x promyjeme v nadbytku PBS

7) Do každé aglutinační zkumavky přidáme 2 kapky diagnostického monoklonálního séra anti-IgG (Sanquin)

8) Řádně promícháme

9) Centrifugujeme 1 min. při 1000 ot./min.

10) Odečteme výsledek makroskopicky i mikroskopicky

[12, 21, 22, 23, 24]

Obrázek 4: Schéma ředění séra/plazmy

1. zkumavka	1:2	6. zkumavka	1:64
2. zkumavka	1:4	7. zkumavka	1:128
3. zkumavka	1:8	8. zkumavka	1:256
4. zkumavka	1:16	9. zkumavka	1:512
5. zkumavka	1:32	10. zkumavka	1:1024

Zdroj: PP [22]

4 Výsledky

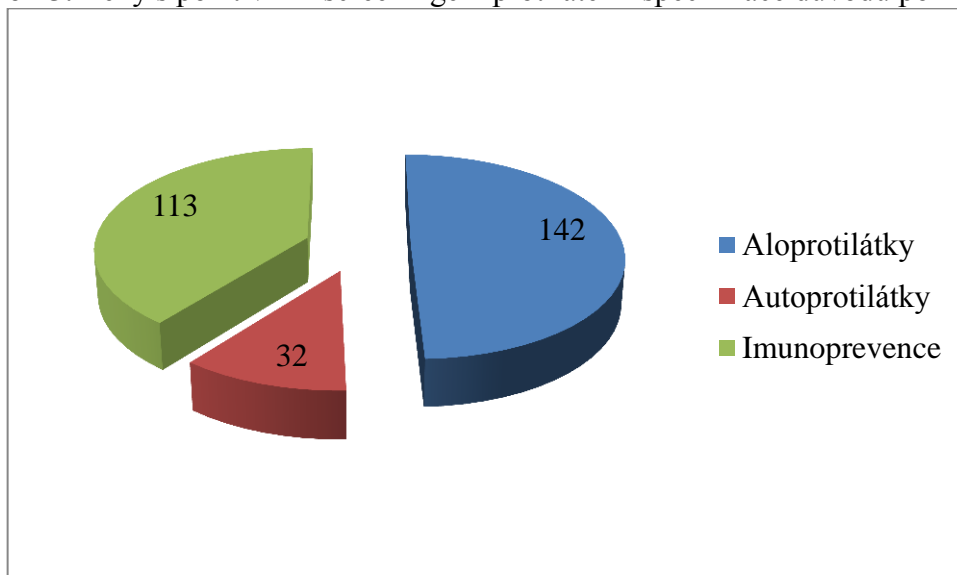
Celkem bylo vyšetřeno 5622 těhotných žen. U 287 byla identifikována protilátka proti erytrocytům. Bylo vyšetřeno 77 otců na určení přítomnosti či nepřítomnosti antigenu, který by mohlo dítě od otce získat a matka proti němu vytváří protilátku. Po porodu bylo vyšetřeno 109 novorozenců. Pozitivní screening byl zachycen u 39 novorozenců a 17 novorozenců mělo na svých erytrocytech antigen, proti kterému matka vytvořila specifickou protilátku, a v těchto případech se jednalo o rozvinuté hemolytické onemocnění novorozence.

Tabulka 5: Ženy s pozitivním screeningem protilátek a specifikace důvodu pozitivity

Název	Počet	%
Aloprotilátky	142	49,5
Autoprotilátky	32	11,1
Imunoprevence	113	39,4

Zdroj: Autor

Obrázek 5: Ženy s pozitivním screeningem protilátek - specifikace důvodu pozitivity



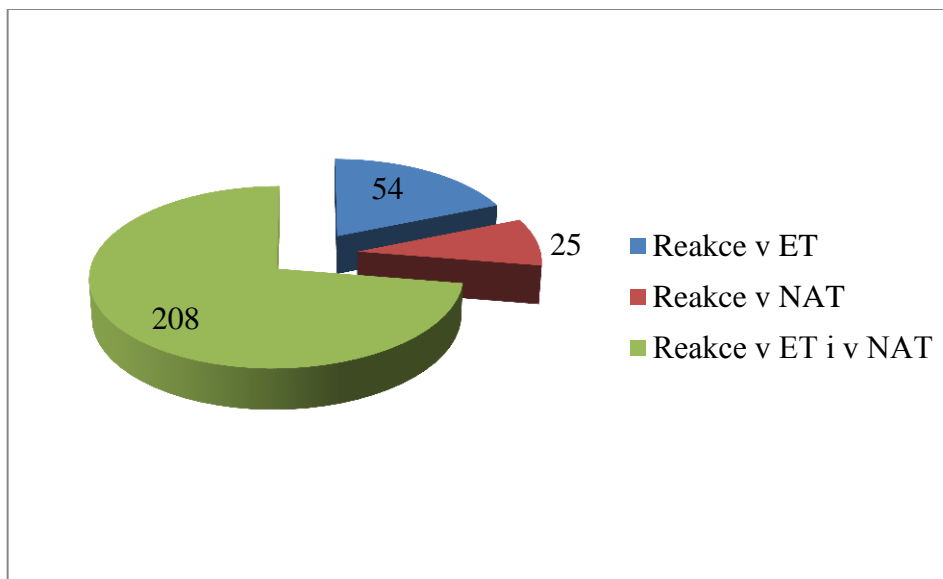
Zdroj: Autor

Tabulka 6: Typy protilátek a jejich reakce v jednotlivých testech

Protilátka	Reakce v ET	Reakce v NAT	Reakce v ET i v NAT	Celkem
Anti-D	1		18	19
Anti-C	2		6	8
Anti-c			6	6
Anti-E	24	1	14	39
Anti-e			1	1
Anti-K		1	4	5
Anti-C^W	2	2	8	12
Anti-Fy(a)		1		1
Anti-Jk(a)	1	1		2
Anti-Lu(a)		3	1	4
Anti-Le(a)	18	3		21
Anti-Le(b)	5			5
Anti-Le(a)Le(b)	1		1	2
Anti-S		1		1
Anti-M		11		11
Anti-N		1		1
Anti-G			4	4
Imunoprevence			113	113
Autoprotilátky			32	32
Celkem	54	25	208	287

Zdroj: Autor

Obrázek 6: Reakce v jednotlivých testech



Zdroj: Autor

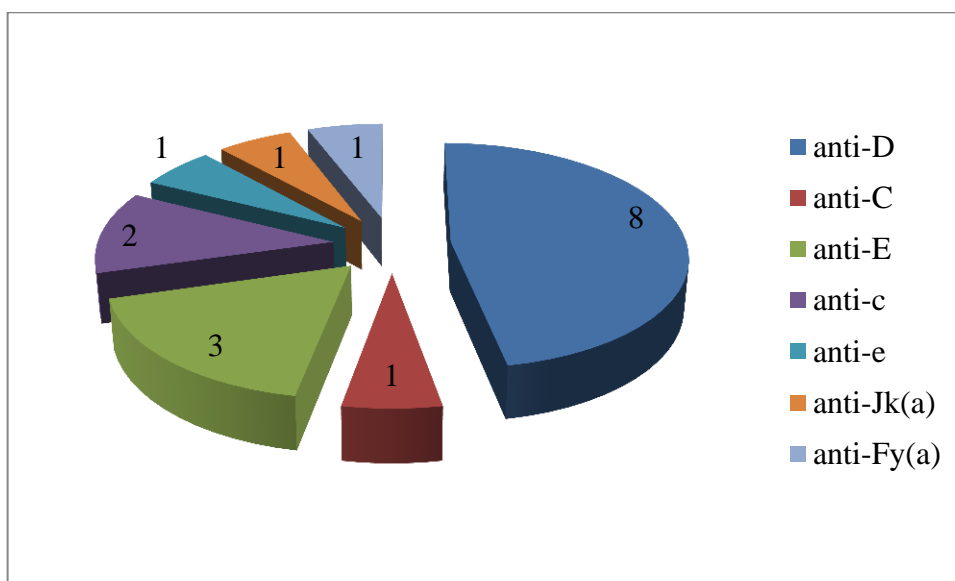
Tabulka 7: Výsledky titrace protilátek – sloupcová gelová aglutinace a zkumavková metoda

Typ protilátky	Titř protilátky Sloupcová gelová aglutinace	Titř protilátky Zkumavková metoda
anti-D	1:4096	1:128
	1:512	1:128
	1:2048	1:512
	1:256	1:64
	1:4096	1:512
	1:1024	1:256
	1:4096	1:1024
	1:256	1:64
	1:1024	1:128
	1:2048	1:512
	1:4096	1:1024
	1:4096	1:2048
	1:64	1:32
	1:256	1:128
	1:1024	1:256
1:64	1:16	
Anti-C	1:128	1:64
	1:256	1:32
	1:256	1:128
Anti-c	1:64	1:32
	1:32	1:8
Anti-E	1:128	1:16
	1:128	1:32
	1:128	1:32
	1:64	1:32
Anti-K	1:4	1:4
	1:64	1:64
	1:16	1:16
	1:128	1:128
Anti-Fy(a)	1:128	1:16
Anti-Lu(a)	1:1024	1:256

Zdroj: Autor

Hemolytické onemocnění novorozence bylo diagnostikováno v 17 případech, z důvodu působení mateřské aloprotilátky anti-D v 8 případech (47%), anti-c ve 2 případech (11,8%), anti-E ve 3 případech (17,6%), anti-C v 1 případě (5,9%), anti-e v 1 případě (5,9%), anti- Jk(a) v 1 případě (5,9%), anti-Fy(a) v 1 případě (5,9%).

Obrázek 6: Rozvinuté hemolytické onemocnění novorozence a příčiny vzniku



Zdroj: Autor

Porovnání provozně - ekonomického hlediska metody sloupcové gelové aglutinace LISS/NAT a zkumavkové metody NAT

Cenu vyšetření jedné titrační řady jsem spočítala orientačně z nákladů na reagentie a spotřební materiál. K výpočtu jsem použila ceníky k 31. 3. 2014.

K vyšetření titrační řady metodou sloupcové gelové aglutinace je třeba 2ml ID-Diluentu 2, 1 ks jednorázové 3ml pipety, 14 ks špiček k pipetám, 10 ks aglutinačních zkumavek, 1ml PBS a 0,3ml identifikačních erytrocytů z Makropanelu 16.

K vyšetření titrační řady zkumavkovou metodou je třeba 1 ks jednorázové 3ml pipety, 4 ks špiček k pipetám, 10 ks aglutinačních zkumavek, 153ml PBS, 1ml monospecifického anti-IgG séra a 0,3ml identifikačních erytrocytů z Makropanelu 16.

Tabulka 8: Cena vyšetření titrace protilátek

Titrace protilátek	Metoda sloupcové gelové aglutinace	Zkumavková metoda
Cena jedné titrační řady	241,79 Kč ≈ 242 Kč	54,53 Kč ≈ 55 Kč
Čas provedení	30 – 35 min.	75 – 80 min.

Zdroj: Autor

5 Diskuze

V bakalářské práci jsem se zabývala vyšetřením klinicky významných pozitivních antierytrocytárních protilátek u těhotných žen z důvodu ohrožení plodu a novorozence hemolytickým onemocněním novorozence.

Studie, která proběhla v Nizozemí v období 1. 1. 2003 - 1. 1. 2005, se zabývala aloimunizací těhotných žen. Studie ukázala největší záchyť antierytrocytárních protilátek v Rh systému, v ostatních krevně skupinových systémech spíše ojediněle. [15] Výsledky této studie mohou porovnat se záchytem pozitivních protilátek na TRS NCB a jsou téměř srovnatelné.

Informace o množství přítomné protilátky je velmi důležité. Hodnotu konečného titru je možné použít jako jeden z ukazatelů stanovení rizika HON u plodu a novorozence při jeho inkompatibilitě v krevních skupinách s matkou. [25] Podle stanoveného titru řídit další sledování těhotné, popř. sledování plodu jinou než imunohematologickou metodou a určit další vhodné léčebné postupy.

Nejčastější anti-D protilátky jsou v některých zemích měřeny, jejich množství je vyjádřeno v mezinárodních jednotkách v mililitru (IU/ml). V České republice se vyšetřuje titer protilátky. Kritické hladiny jsou stanoveny podle perinatologických center. Při hodnotách nad hranici pro riziko HON je obvykle prováděna DNA analýza a invazivní diagnostika pomocí amniocentézy a kordocentézy. Dynamika titru protilátek se sleduje obvykle ve dvou až čtyřtýdenních intervalech. Při zjištění klinicky významné protilátky u matky, je vhodné exaktně vyšetřit krevní skupinu plodu. Dříve se odhadovala antigenní výbava fetálních erytrocytů pomocí znalosti otcovského fenotypu (kombinace antigenů Rh krevní skupiny). V dnešní době lze použít molekulárně biologické metody. Je-li otec neznámý nebo nedostupný pro vyšetření, je možné stanovit Rh status plodu z choriových klků pomocí „polymerase chain reaction“ (PCR) z amniocytů nebo z fetální krve. Experimentálně lze zjistit RhD krevní skupinu plodu také neinvazivně vyšetřením fetálních erytrocytů z periferní krve matky. [26]

Porovnála jsem dvě různé metody vyšetření titru antierytrocytárních protilátek, jejich výhody a nevýhody, zpracovala do tabulek a grafů, které jsou součástí této bakalářské práce.

Titrační vyšetření je široce dostupné orientační vyšetření, které se běžně používá ke sledování těhotných s klinicky významnými protilátkami. Sleduje se při tom hodnota titru a její změna s postupujícím těhotenstvím, porovnávána v po sobě následujících vyšetřeních.

Transfuzní oddělení používají k vyšetření titru antierytrocytárních protilátek metodu sloupcové gelové aglutinace a zkumavkovou metodu. Reakce vyšetřovaného séra v postupném dvojnásobném ředění se suspenzí erytrocytů s antigenem odpovídajícím vyšetřované protilátce v prostředí NAT. Obě tyto metody jsou doporučeny Společností pro transfuzní lékařství ČLS JEP. [20] Z dostupných literárních zdrojů nemohu zcela přesně určit, která z těchto dvou metod se ve světě používá více. Ale dá se předpokládat, že podle studie v Severní Americe v letech 2005-2010, která se zabývala studiem různých metod vyšetření protilátek a testu kompatibility na různých pracovištích transfuzních oddělení, jejichž principem je též nepřímý antiglobulinový test, je zřejmé, že se stále více přechází od zkumavkových metod k metodám gelovým. [27] V České republice je zastoupení těchto metod k vyšetření titru protilátek rovnoměrné. [28, 29, 30, 31]

Výsledky vyšetření titru antierytrocytárních protilátek metodou sloupcové gelové aglutinace jsem porovnávala při jejím manuálním provedení s manuálním provedením zkumavkovou metodou. Výsledky vyšetření se liší většinou o dva řády. Metoda sloupcové gelové aglutinace vykazuje vyšší citlivost než zkumavková metoda.

Výsledky mé bakalářské práce potvrzují správnost volby vedení TRS provádět vyšetření stanovení konečné hodnoty titru antierytrocytárních protilátek metodou sloupcové gelové aglutinace. Výhody této metody oceňuji v tom, že je to rychlá metoda, s menší spotřebou vzorku a reagentů, není zde fáze promývání senzibilizovaných erytrocytů, je zde dobrá interpretace výsledků.

Při manuálním provedení nelze vyloučit chyby lidského faktoru. Velmi slabou stránkou zkumavkové metody v prostředí NAT je fáze promývání a z tohoto důvodu vykazuje tato metoda daleko menší citlivost než metoda gelová, která v poslední době zkumavkové testy stále více nahrazuje.

6 Závěr

Metoda sloupcové gelové aglutinace a zkumavková metoda (obě na principu nepřímého antiglobulinového testu) pro vyšetření titru antierytrocytárních protilátek u těhotných žen jsou vhodné metody, které nás mohou včas upozornit na možné nebezpečí rozvinutí hemolytického onemocnění novorozence, doporučit sledování ženy během jejího těhotenství a nastítnit sledování plodu jinou než imunohematologickou metodou.

Vyšetření titru antierytrocytárních protilátek metodou sloupcové gelové aglutinace bylo vyšetřeno u 287 vzorků těhotných žen. U 31 těhotných byla stanovena riziková hranice pro HON a u těchto vzorků byl následně vyšetřen titr zkumavkovou metodou. Metoda sloupcové gelové aglutinace vykazuje vyšší citlivost než zkumavková metoda. Výsledky vyšetření pro stanovení možného rizika hemolytického onemocnění novorozence se liší pouze ve dvou případech, kdy zkumavková metoda vykazovala výsledky pod hranicí rizika HON. V ostatních případech jsou výsledky téměř srovnatelné.

Z provozně ekonomického hlediska se oba typy provedení liší. Sloupcová gelová aglutinace cca 242 Kč, zkumavková metoda cca 55 Kč.

Výhodou metody sloupcové gelové aglutinace je její krátký celkový čas vyšetření (cca 30 - 35 min.), zůstává ale riziko chyb lidského faktoru.

Výhodou zkumavkové metody jsou její nízké finanční náklady. Nevýhodou zůstává delší čas potřebný k vyšetření (cca 75 - 80 min.), fáze promývání, která u gelových metod odpadá. Také zůstává riziko chyb lidského faktoru.

7 Seznam použité literatury

1. Moore, P. *Krev a spravedlnost: příběh pařížského lékaře, který se v 17. století stal průkopníkem krevní transfuze*. Praha: BB/art s. r. o., 2005. 256 s.
2. Hrubíško, M., a kol. *Hematologie a krevní transfúze II: Krevní transfúze*. Praha: Avicenum, 1983. 206 s.
3. Kubisz, P. a kol. *Hematológia a transfuziológia*. Praha: Grada, 2006. 323 s.
4. Čermáková, Z., Kořístka, M., Malušková, A. *Imunohematologie*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2008. 69 s.
5. Řeháček, V., Masopust, J., a kol. *Transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2013. 240 s.
6. Bartůňková, J., Paulík, M., a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. vydání. Praha: Grada, 2011. 168 s.
7. Engelfriet, C. P., Meulenbroek, A. J., et al. *Imunohematologie*. Amsterdam: Sanquin Blood Supply Foundation, 2003. 142 s.
8. Sakalová, A., Lipšic, T. a kol. *Hematológia a transfuziológia*. Martin: Osveta, 1995. 527 s.
9. Tesařová, E., a kol. *Vybrané kapitoly: Transfuzní lékařství a imunohematologie*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství nelékařských zdravotnických oborů Brno, 2007. 112 s.
10. Penka, M., Tesařová, E., a kol. *Hematologie a transfuzní lékařství II: Transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2012. 192 s.
11. Eckstein, R. *Imunohematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Diag Human, 1994. 173 s.
12. Standardní operační postupy Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s.
13. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství č. STL2011_07 Základní imunohematologická laboratorní vyšetření červené řady – Obecné zásady a technické postupy. Dostupné z:
<<http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>>

14. Fábryová, V., a kol. *Imunohematológia a transfúzna medicína pre prax*. Bratislava: Grada, 2012. 224 s.
15. Koelewijn, J. M., Vrijkotte, T. G. M., Van der Schoot, C. E., Bonsel, G. J., De Haas, M. *Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands*. *Transfusion*. 2008 May; 48(5):941-952 [cit. 2014-03-31]. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01625.x.Epub 2008 Feb 1. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18248570>>
16. Jílková, H. *Transfuzní lékařství*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2009. 198 s.
17. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství č. STL2012_10 Vyšetřování antigenu D. Dostupné z: <<http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>>
18. Kout, M., Májský, A., Herzog, P. *Vyšetřovací metody v imunohematologii*. Praha: Avicenum, 1975. 342 s.
19. Davey, M. G., Zipursky, A.: *McMaster conference on preventiv of Rh immunization. 28-30 September, 1977*. *VoxSang*. 1979; 36(1):50-64.
20. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství č. STL2010_06 Imunohematologická vyšetření v těhotenství a po porodu. Dostupné z: <<http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>>
21. Laboratorní příručka Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s. Dostupné z: <http://www.nemcb.cz/_data/files/NCB_TRS_SME_12_002%20Laboratorni%20Prirucka.pdf>
22. Pracovní postupy Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s.
23. Materiály firmy DiaMed. Dostupné z: <<http://www.eurexmedica.cz/>>
24. Materiály firmy Sanquin. Dostupné z: <<http://www.sanquin.nl/>>
25. Laboratorní příručka Transfuzního a tkáňového oddělení Fakultní nemocnice Brno. Dostupné z: <<http://www.fnbrno.cz/nemocnice-bohunice/transfuzni-a-tkanove-oddeleni/laboratorni-prirucka/t4556>>

26. Žižka, Z., Calda, P. *Erytrocytární aloimunizace v těhotenství – aktuální problémy* [online]. Lékařské listy. 2002; 32 [cit. 2014-04-15]. Dostupné z: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/erytrocytarni-aloimunizace-v-tehotenstvi-aktualni-problemy-147154>>
27. Downes, K. A., Shulman, I. A. *Pretransfusion testing practices in North America, 2005-2010: an analysis of the College Of American Pathologist Interlaboratory Comparison Program J-survey data, 2005-2010* [online]. Arch Pathol Lab Med. 2012 Mar; 136(3):294-300 [cit. 2014-03-31]. DOI: 10.5858/2011-0127-CPR.1. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22372905>>
28. Laboratorní příručka Oddělení hematologie a krevní transfuze, Úsek centrálních laboratoří Ústřední vojenské nemocnice Praha. Dostupné z: <http://www.transfuzne-uvn.cz/laboratorni_prirucka.html>
29. Laboratorní příručka Transfuzního oddělení Nemocnice v Chebu. Dostupné z: <<http://www.kkn.cz/272-transfuzni-oddeleni.html?chng=1>>
30. Laboratorní příručka Transfuzního oddělení Nemocnice v Karlových Varech. Dostupné z: <<http://www.nemkv.cz/609-laboratorni-prirucky.html>>
31. Laboratorní příručka Hematologicko-transfuzního oddělení Městské nemocnice Čáslav. Dostupné z: <http://www.nemcaslav.cz/storage/lab_pri_hemat.pdf>
32. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství č. STL2011_08 Předtransfuzní laboratorní vyšetření. Dostupné z: <<http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>>

8 Klíčová slova

antierytrocytární protilátky
hemolytické onemocnění novorozence
imunoprevence
titrace protilátek

Key words

anti-erythrocyte antibodies
haemolytic disease of the newborn
immuno-prevention
antibody titration

9 Přílohy

Příloha 1: 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-Kp(a)	Vzácně	Negativní test kompatibility Ve směsi s jinou protilátkou negativní pro daný antigen
Duffy protilátky anti-Fy(a), -Fy(b)	Ano	Negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
Kidd protilátky anti-Jk(a), -Jk(b)	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-Le(a), -Le(a+b)	Vzácně	Negativní test kompatibility
anti-Le(b)	Ne	Lze ignorovat
anti-Lu(a)	Vzácně	Negativní test kompatibility
Protilátky s vysokým titrem a nízkou aviditou (HTLA)	Neppravděpodobná	Podle doporučení specializované či referenční laboratoře
Protilátky proti antigenům s nízkou/vysokou frekvencí	Podle specifity	Podle doporučení specializované či referenční laboratoře

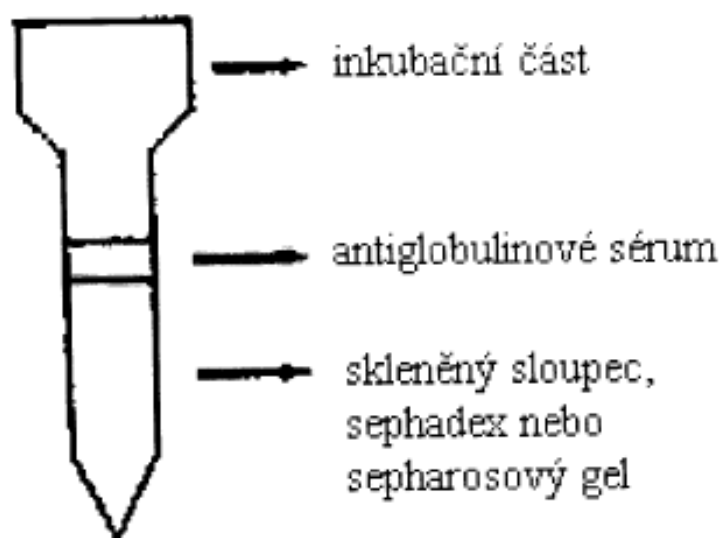
Zdroj: Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP [32]

Příloha 2: Denní kontrola kvality imunohematologické diagnostiky

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

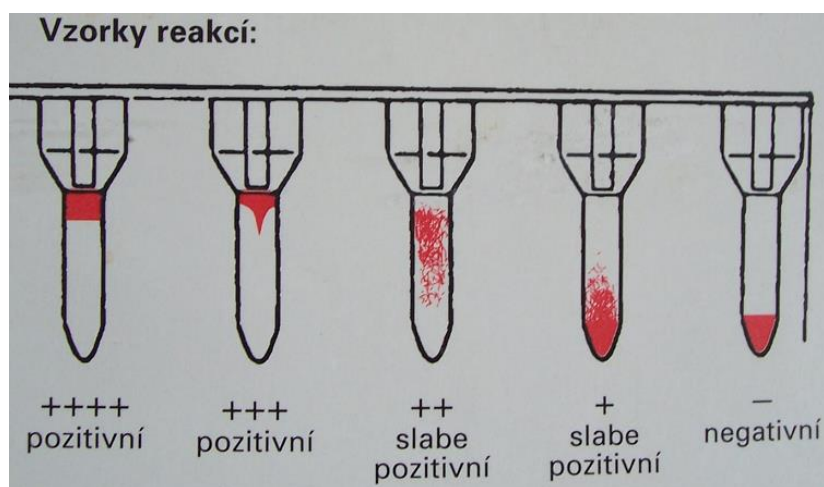
Zdroj: Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP [13]

Příloha 3: Schematické zobrazení gelového sloupce



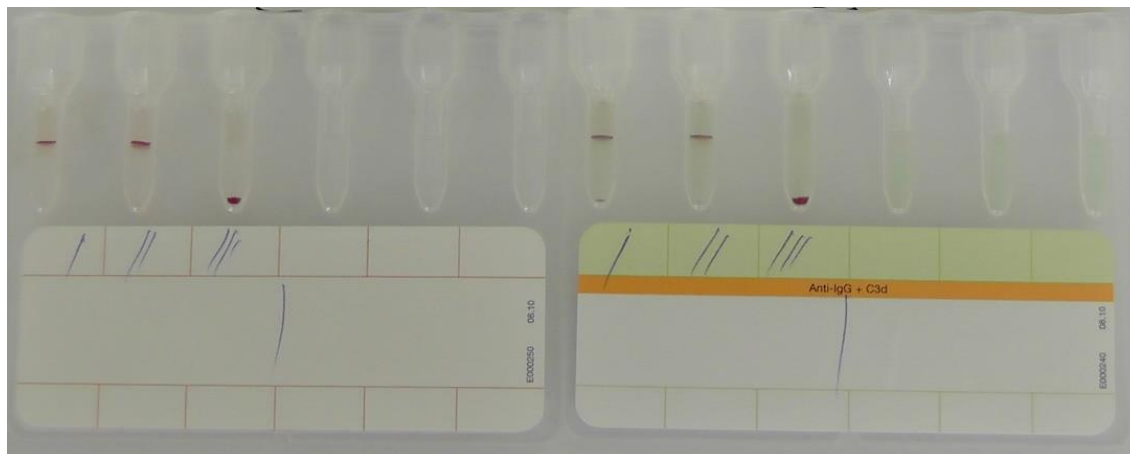
Zdroj: Imunohematologie [7]

Příloha 4: Hodnocení reakcí sloupcové gelové aglutinace



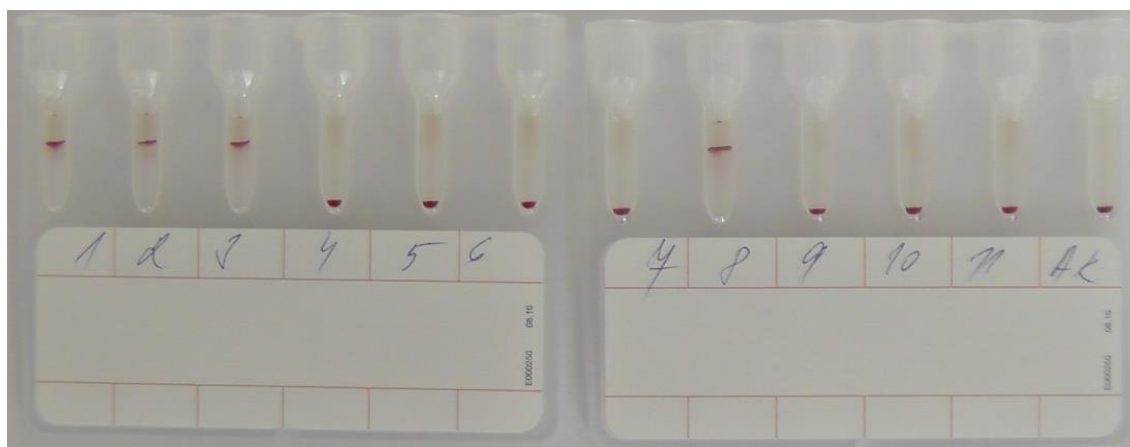
Zdroj: Materiály firmy DiaMed [23]

Příloha 5: Screening protilátek ET a NAT



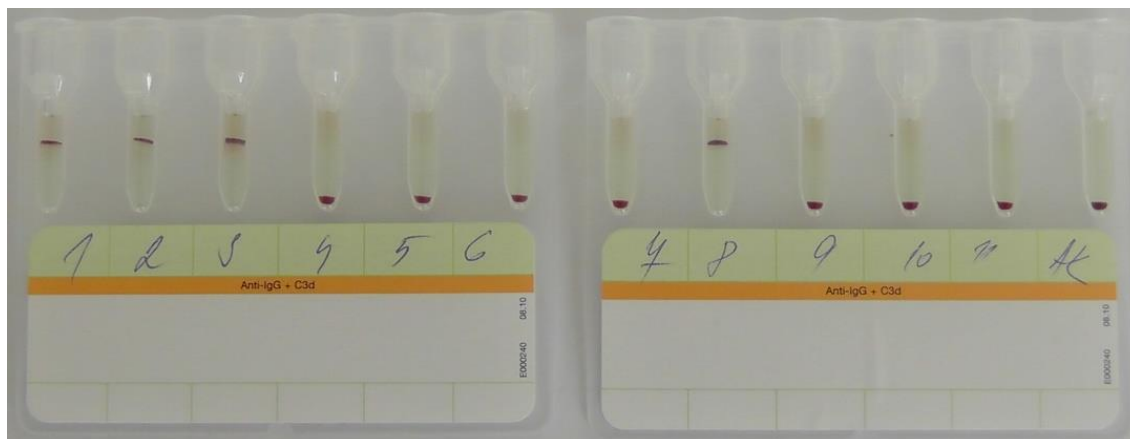
Zdroj: Autor

Příloha 6: Identifikace protilátek ET ID-DiaPanel-P



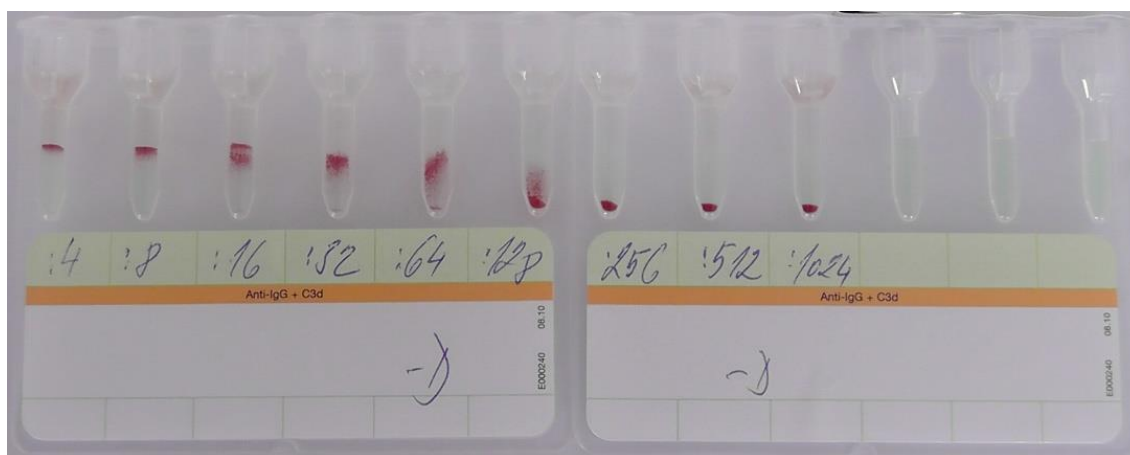
Zdroj: Autor

Příloha 7: Identifikace protilátek NAT ID-DiaPanel



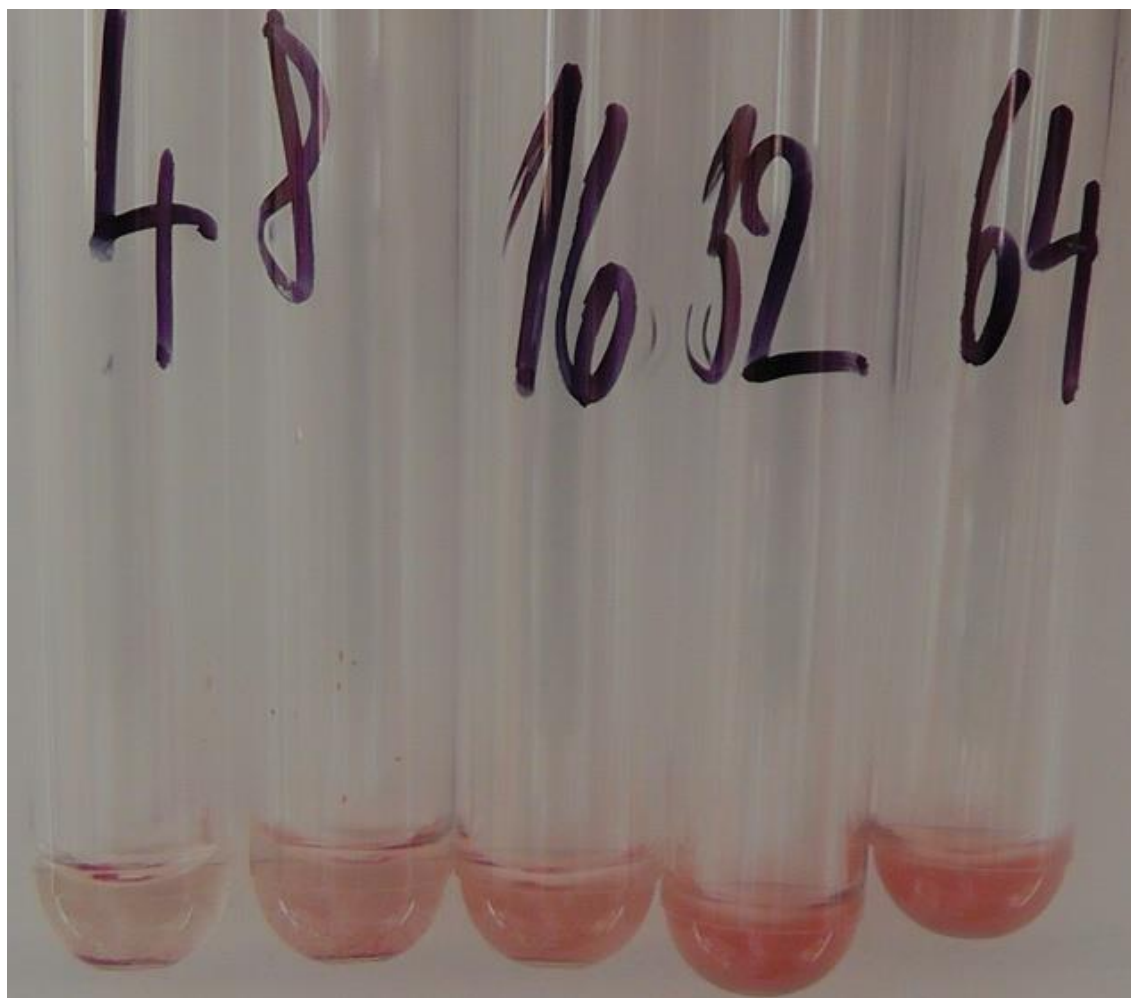
Zdroj: Autor

Příloha 8: Titrace protilátek sloupcová gelová aglutinace



Zdroj: Autor

Příloha 9: Titrace protilátek zkumavková metoda



Zdroj: Autor