



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Přímý antiglobulinový test v imuno hematologické laboratoři

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

Autor: Darina Domanská

Vedoucí práce: PharmDr. Hana Staňková

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*přímý antiglobulinový test v imuno hematologické laboratoři*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů 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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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 bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2. 5. 2023

.....

Darina Domanská

Poděkování

Tímto bych chtěla věnovat poděkování za ochotu, za odborné vedení, umožnění zpracování praktické části a cenné rady během vyhotovení mé bakalářské práce vedoucí PharmDr. Haně Staňkové. Další díky náleží paní Mgr. Olze Kopřivové, za její ochotu a pomoc. Mé poděkování směřuje také k mé mamince, která se mnou měla trpělivost v průběhu studia, a která mě ve všem podporovala.

Přímý antiglobulinový test v imuno hematologické laboratoři

Abstrakt

Imunohematologie je vědní obor zkoumající vlastnosti krve a krevních elementů vzhledem k imunitním reakcím probíhajícím v organismu. Základními imuno hematologickými pojmy je antigen a protilátka. K vyšetření antigenů na erythrocytech a protilátek v plazmě / séru se využívají serologické techniky, jejichž podkladem je aglutinace. V imunohematologii se uplatňují protilátky třídy IgM a IgG (výjimečně IgA). Protilátky třídy IgM způsobují přímou aglutinaci erythrocytů, protilátky třídy IgG erythrocyty pouze senzibilizují, přímo neaglutinují. K dosažení aglutinace se do reakce přidává antiglobulinové sérum (Antiglobulinový neboli Coombsův test) nebo enzym (enzymový test). Antiglobulinový test je základním testem v detekci protilátek proti erythrocytům. Přímý antiglobulinový test slouží k detekci protilátek a/nebo složek komplementu navázaných na erythrocyty in vivo. Nepřímý antiglobulinový test slouží k detekci protilátek proti erythrocytům, které jsou přítomny volně nenavázané v séru pacienta. Tématem této práce je právě přímý antiglobulinový test a jeho význam v imuno hematologické laboratoři. Přímý antiglobulinový test se provádí u klinických a/nebo laboratorních známek hemolytické anémie, vyšetření potransfuzní reakce, suspektně HON, u pozitivní autokontroly při identifikaci protilátek, u negativního screeningu protilátek a pozitivního testu kompatibility (kdy se vyšetřují erythrocyty transfuzního přípravku). Pozitivitu PAT mohou způsobit složky komplementu, aloprotilátky (potransfuzní reakce, HON), tepelné, chladové či bifazické autoprottilátky, léky, transplantace orgánů nebo hemopoetických buněk, choroby, pasivně přenesené protilátky, nespecificky adsorbované bílkoviny, aplikace monoklonálních protilátek při léčbě malignit. Pozitivita PAT se může prokázat i u zcela zdravých jedinců. Pozitivní přímý antiglobulinový se používá ke zjištění, zda jsou na povrchu erythrocytů navázané imunoglobuliny, nebo komplement, případně obojí. Tato senzibilizace erythrocytů nemusí mít žádný klinický význam nebo může znamenat významnou hemolýzu.

Klíčová slova

Imunohematologie; Přímý antiglobulinový test; Autoimunitní hemolytická anémie; Hemolytické onemocnění novorozence; Potransfuzní reakce

Direct antiglobulin test in an immunohematological laboratory

Abstract

Immunohematology is the study of the properties of blood and blood elements in relation to the immune reactions taking place in the body. The basic immunohematological concepts are antigen and antibody. Serological techniques based on agglutination are used to examine antigens on erythrocytes and antibodies in plasma / serum. In immunohematology, IgM and IgG class antibodies (rarely IgA) are used. IgM class antibodies cause direct agglutination of erythrocytes, while IgG class antibodies only sensitise erythrocytes and do not directly agglutinate them. To achieve agglutination, antiglobulin serum (Antiglobulin or Coombs test) or enzyme (enzyme assay) is added to the reaction. The antiglobulin test is a basic test in the detection of antibodies to erythrocytes. The direct antiglobulin test is used to detect antibodies and/or complement components bound to erythrocytes *in vivo*. The indirect antiglobulin test is used to detect antibodies to erythrocytes that are present unbound in the patient's serum. The topic of this paper is the direct antiglobulin test and its importance in the immunohematology laboratory. The direct antiglobulin test is performed for clinical and/or laboratory signs of hemolytic anemia, post-transfusion reaction testing, suspected HON, positive self-testing for antibody identification, negative antibody screening, and positive compatibility testing (when erythrocytes of the transfusion product are examined). PAT positivity can be caused by complement components, alloprotebrates (post-transfusion reactions, HON), thermal, cold or biphasic autoantibodies, drugs, organ or haemopoietic cell transplantation, diseases, passively transferred antibodies, non-specifically adsorbed proteins, monoclonal antibodies in the treatment of malignancies. PAT positivity can be demonstrated even in completely healthy individuals. A positive direct antiglobulin test is used to determine whether immunoglobulins or complement, or both, are bound to the surface of erythrocytes. This erythrocyte sensitization may have no clinical significance or may indicate significant hemolysis.

Key words

Immunohematology; Direct antiglobulin test; Autoimmune haemolytic anemia; Haemolytic disease of the newborn; Post-transfusion reactions

Obsah

1	Úvod	10
2	Základní pojmy v imuno hematologické laboratoři	12
2.1	Imuno hematologie	12
2.2	Erytrocytové antigeny	12
2.2.1	Terminologie krevních skupin	13
2.3	Protilátky	13
2.3.1	Třídy protilátek	14
2.3.2	Podtřídy	14
2.3.3	Dělení protilátek	14
2.3.4	Klinická významnost krevněskupinových protilátek	16
2.4	Reakce antigenu s protilátkou	17
2.4.1	Epitop	17
2.4.2	Paratop	17
2.4.3	Ovlivnění reakce antigen-protilátka	17
2.4.4	Důsledky reakce antigen-protilátka	18
3	Imuno hematologické testy	21
3.1	Přímá a nepřímá aglutinace	21
3.1.1	Přímá aglutinace	22
3.1.2	Nepřímá aglutinace	22
3.2	Antiglobulinová séra	23
4	Přímý antiglobulinový test	25
4.1	Provedení přímého antiglobulinového testu	25
4.2	Vlastní mechanismy imunitní destrukce erytrocytů	25
4.2.1	Přímá lýza erytrocytové membrány = intravaskulární imunní hemolýza ...	25
4.2.2	Fagocytóza = extravaskulární imunitní hemolýza	25
4.2.3	Mechanismus ADCC a nově popsany mechanismus hemolýzy	26

4.3	Princip testu	26
4.4	PAT pozitivní.....	26
4.4.1	Postup u PAT positivity.....	27
5	Využití přímého antiglobulinového testu	29
5.1	Autoimunitní hemolytická anémie (AIHA).....	29
5.1.1	AIHA s tepelnými protilátkami	29
5.1.2	AIHA s chladovými protilátkami	30
5.1.3	Paroxysmální chladová hemoglobinurie (PCH)	30
5.1.4	Smíšený typ AIHA.....	31
5.1.5	Polékový typ AIHA	31
5.2	Hemolytické onemocnění plodu/novorozence (HON)	32
5.2.1	Imunohematologické vyšetření těhotné	33
5.2.2	Imunohematologické vyšetření novorozence	33
5.3	Potransfuzní imunitní reakce červené řady.....	34
5.3.1	Intravaskulární hemolytická reakce z imunních příčin.....	35
5.3.2	Extravaskulární hemolytická reakce z imunitních příčin	35
5.3.3	Vyšetření PAT u potransfuzní reakce.....	35
5.4	PAT u dárce	35
6	Cíl práce a hypotézy	36
6.1	Cíl práce.....	36
6.2	Hypotézy.....	36
7	Metodika.....	37
7.1	Chemikálie, reagenty, spotřební materiál a přístroje.....	38
7.2	Princip sloupcové aglutinace	39
7.3	Hodnocení reakcí	39
7.4	Postup provedení.....	40

7.4.1	Přímý antiglobulinový test s polyspecifickým AGH metodou sloupcové aglutinace.....	40
7.4.2	Upřesnění typu senzibilizace erytrocytů s monospecifickými AGH metodou sloupcové aglutinace	40
7.4.3	Stanovení titru IgG metodou sloupcové aglutinace	41
7.4.4	Stanovení podtříd IgG metodou sloupcové aglutinace	42
7.4.5	Stanovení krevních skupin AB0/Rh	44
7.4.6	Reagencie.....	45
7.4.7	Vzorek.....	45
7.4.8	Příprava krevního vzorku.....	45
7.4.9	Provedení testu.....	45
7.4.10	Interpretace výsledků.....	45
8	Výsledky.....	47
8.1	Přímý antiglobulinový test (PAT).....	47
8.2	Upřesnění senzibilizace erytrocytů u pacientů	48
8.3	Vyšetření titru IgG u pacientů	50
8.4	Stanovení rizika hemolýzy erytrocytů	52
8.5	Přímý antiglobulinový test u novorozenců	53
8.6	Vyšetření antierytrocytárních protilátek u novorozenců	54
9	Diskuze	56
10	Závěr	59
11	Seznam literatury	60
12	Seznam příloh a obrázků.....	64
13	Přílohy.....	67
13.1	Příloha č. 1 – Výsledky vyšetření u pacientů za rok 2022.....	67
13.2	Příloha č. 2 – Senzibilizující protilátky u novorozenců za rok 2022.....	71
13.3	Příloha č. 3 – Výsledky PAT u dárců krve za rok 2022	72

13.4	Příloha č. 4 – Výsledky PAT u pacientů vyšetřovaných pro potravní reakci za rok 2022	72
13.5	Příloha č. 5 – Žádanka o imunohematologické vyšetření	73
13.6	Příloha č. 6 – ID-Centrifugace značky BIO-RAD a DiaMed pro ID karty	73
13.7	Příloha č. 7– AGH polyspecifické (zelené) (10 ml)	74
14	Seznam zkratk	75

1 Úvod

V této bakalářské práci se budu zabývat přímým antiglobulinovým testem, který patří mezi základní testy používané v imunohematologické laboratoři. PAT detekuje erythrocyty senzibilizované protilátkami *in vivo* v organismu. Používá se při průkazu imunitního typu hemolýzy u pacientů po transfuzích, transplantacích, u potransfuzních reakcí, u hemolytického onemocnění novorozenců, u pacientů s projevy autoimunity.

Téma své bakalářské práce jsem si vybrala proto, že mě daná problematika velice zajímá a ráda bych se touto problematikou ráda zabývala i do budoucna.

Hlavním cílem mé práce je zpracovat problematiku PAT, podat ucelený přehled využití PAT v imunohematologické laboratoři. Dalším cílem je osvojení si vlastního vyšetření PAT, a hlavně stanovení klinické významnosti tohoto testu.

Princip přímého antiglobulinového testu není složitý. Erythrocyty se testují přímo s antiglobulinovým sérem. Antiglobulinové sérum reaguje s lidskými protilátkami, případně se složkami komplementu. Jsou-li tyto protilátky nebo složky komplementu navázané na erythrocyty, dojde k aglutinaci.

Test se provádí v imunohematologické laboratoři na základě požadavku klinika při klinických a/nebo laboratorních známkách hemolytické anémie, u potransfuzní reakce či při podezření na hemolytické onemocnění novorozence. V imunohematologické laboratoři se navíc k PAT přistupuje např. při pozitivní autokontrolě, při identifikaci protilátek, u negativního screeningu protilátek a pozitivního testu kompatibility, kdy se vyšetřují erythrocyty transfuzního přípravku, u vyšetření potransfuzních reakcí.

Pro interpretaci pozitivity PAT je vhodné mít k dispozici údaje anamnézy, kliniky a případně další laboratorní testy pacienta.

Tato bakalářská práce na téma „Přímý antiglobulinový test v imunohematologické laboratoři“ se zabývá problematikou prokázání senzibilizace erythrocytů, kdy může dojít k urychlené destrukci erythrocytů na imunologickém podkladě s intravaskulární nebo extravaskulární hemolýzou ve slezině nebo játrech.

Teoretická část se zaměřuje na základní pojmy v imunohematologii, na popis imunohematologických testů, podrobné vysvětlení přímého antiglobulinového testu a jeho využití v praxi. Pro výzkum a jednotlivá vyšetření je nutné se v těchto základech orientovat.

Praktická část se zabývá vlastním vyšetřením PAT a laboratorním stanovením klinické významnosti pozitivního PAT. Využití přímého antiglobulinového testu je

rozděleno na několik částí, jedna se zabývá přímým antiglobulinovým testem u AIHA, druhá u HON, další u potransfuzních reakcí a poslední velmi krátce u dárců krve.

2 Základní pojmy v imuno hematologické laboratoři

2.1 Imunohematologie

Imunohematologie je vědní obor zkoumající vlastnosti krve a krevních elementů z hlediska zákonitostí imunitních reakcí probíhajících ve zdravém a nemocném organismu. Základními imuno hematologickými pojmy je antigen a protilátka (Fábryová et al. 2012).

Jedná se o studium reakcí antigen-protilátka a analogických jevů, jak se vztahují k patogenezi a klinickým projevům onemocnění krve (Ajmani, 2020).

2.2 Erytrocytové antigeny

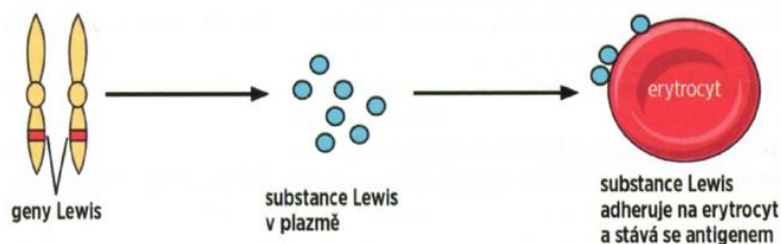
Antigen (Ag) je struktura membrány krevní buňky definovaná lidskou aloprotilátkou – tedy protilátkou produkovanou imunizovanou osobou, které daný znak na membráně chybí (Masopust, Písačka, 2016). Schopnost antigenu vyvolat imunitní odpověď se nazývá imunogenicitu a schopnost reagovat s protilátkou se nazývá antigenicitu (Fábryová et al., 2012).

Masopust a Písačka (2021) udávají celkový počet erytrocytových antigenů 378; z toho 345 v 43 systémech, 14 v 5 kolekcích, 16 v sérii LFA (antigeny s nízkou frekvencí výskytu) a 3 v sérii HFA (antigeny s vysokou frekvencí výskytu). S novými poznatky a citlivějšími metodami počty definovaných antigenů narůstají.

Z biochemického pohledu rozdělujeme antigeny na proteinové a na antigeny sacharidové. Z pohledu syntézy dělíme na antigeny endogenní a exogenní.

Antigeny endogenní: syntéza probíhá v erytrocytech, jsou zakotveny v membráně, patří sem většina systémů krevních skupin.

Antigeny exogenní: syntéza nastává v jiných buňkách než erytrocytech, jsou adsorbovány na povrch erytrocytů, patří sem 2 systémy – Lewis a Chido/Rodgers (Masopust, Písačka, 2016).



Obrázek č. 1. Příklad exogenního antigenu (Masopust, 2016, str. 18)

2.2.1 Terminologie krevních skupin

Systémy krevních skupin se rozumí soubor příbuzných fenotypů definovaných lidskými protilátkami (na principu reakce antigen-protilátka) se společnými vlastnostmi:

- známou biochemickou podstatou,
- definovanou chromozomální lokalizací,
- identifikovaným a sekvenovaným genem (1 lokus nebo 2 či více úzce spojených genů).

V systému může být jen jeden antigen (např. H, I), ale i desítky antigenů (Rh, MNS). Podkladem fenotypu je genetická informace – genotyp (Masopust, Písačka, 2016).

Antitické antigeny: obvykle pár antigenů kódovaných různými alelami jednoho genu, např. K a k, C a c (Masopust, Písačka, 2022).

Kolekce antigenů je soubor dvou a více antigenů se sérologickou, biochemickou, eventuálně genetickou příbuzností, ale zatím nesplňující všechna kritéria systému.

Série antigenů jsou antigeny zatím neodpovídající definovaným systémům a kolekcím.

LFA – ISBT série 700 jsou antigeny s nízkou frekvencí výskytu (low frequency antigens). Výskyt méně než 1 % v populaci.

HFA – ISBT série 901 jsou antigeny s vysokou frekvencí výskytu (high frequency antigens). Výskyt vyšší než 90 % v populaci (Masopust, Písačka, 2016).

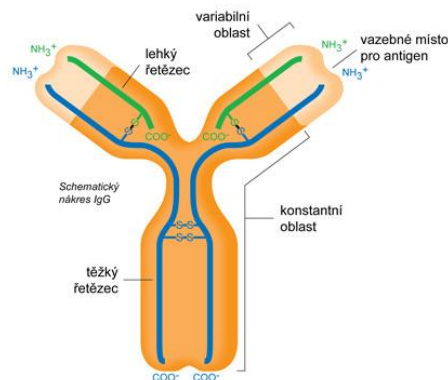
2.3 Protilátky

Protilátky patří ke globulinové frakci sérových bílkovin, které se nazývají imunoglobuliny (Ig) a jsou obsaženy v plazmě či séru. Vznikají jako odpověď na imunogen a reagují se specifickými antigeny (Engelfriet, Meulenbroek et al. 2003, Penka, Tesařová et al., 2012).

Jsou tvořeny plazmatickými buňkami, což je konečné stádium lymfocytů B. Lymfocyty B mají na svém povrchu receptor pro antigen, který je tvořen částí imunoglobulinové molekuly. Spolu s dalšími přídatnými strukturami celý komplex označují jako BCR. Po setkání s příslušným antigenem se lymfocyt B začne dělit, až z něj vznikne klon plazmatických buněk, které produkují protilátky proti antigenu, který reakci vyvolal. Povrchové molekuly typické pro lymfocyty B jsou CD19 a CD20 (Bartůňková et al. 2011).

Protilátky jsou chemicky glykoproteiny a mají strukturu molekuly uspořádané do

tvaru Y. Rozvětvená část Ig se nazývá variabilní a na ni se váže antigen. Variabilní část určuje specifitu protilátky, tj. proti jakému antigenu je namířena. Druhá část Ig se nazývá konstantní (fragment Fc), podle ní se rozlišuje pět tříd Ig: G, M, A, D a E. Části Fc se protilátka váže na buňky, které mají pro ni receptor (granulocyty, buňky NK, makrofágy) a pomáhá tak odstraňovat navázané cizorodé látky. Podélně se protilátka skládá z těžkých řetězců (γ , μ , α , δ , ϵ) a lehkých řetězců (κ , λ) (Bartůňková et al. 2011).



Obrázek č. 2. Struktura imunoglobulinu IgG (https://vydavatelstvi.old.vscht.cz/knihy/ui_d_es-002/ebook.html?p=imunoglobuliny)

2.3.1 Třídy protilátek

- **IgM** – jedná se o velkou molekulu, kompletní protilátku, která nemůže procházet placentou, je klinicky méně důležitá (s výjimkou anti-A, anti-B) a obvykle je to chladová protilátka (optimální teplota reakce $<20\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Masopust, Písačka, 2022).
- **IgG** představuje malou molekulu, klinicky důležitou. Jedná se o inkompletní protilátku, která se výhradně vyskytuje ve formě monomeru a díky této formě může procházet přes placentu, obvykle je to tepelná protilátka (optimální teplota reakce $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Hořejší, Bartůňková et al., 2017; Masopust, Písačka, 2022).
- **IgA** v imunohematologii se uplatňují jen výjimečně (Masopust, Písačka, 2022).
- **IgD** a **IgE** v imunohematologii se neuplatňují (Masopust, Písačka, 2022).

2.3.2 Podtřídy

- IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2 (Masopust, Písačka, 2022).

2.3.3 Dělení protilátek

Protilátky můžeme dělit:

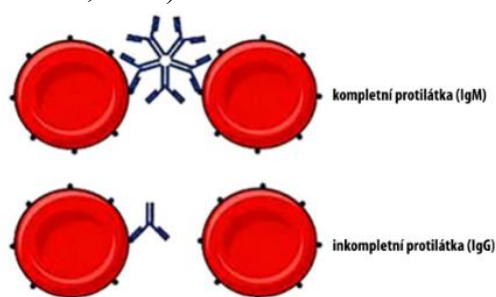
podle teploty na:

- **Tepelné** protilátky optimálně reagují při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; většinou třídy IgG a způsobují destrukci erytrocytů při tělesné teplotě,

- **chladové** protilátky optimálně reagují při teplotách pod 20 °C; většinou třídy IgM a navazují se na erythrocyty v částech těla vystavených nízké teplotě (např. v zimě),
- **bifazické** protilátky se vážou na antigen při nízkých teplotách a při teplotách kolem 37 °C dochází k hemolýze erythrocytu (Masopust, Písačka, 2022).

kompletní a inkompletní:

- **Kompletní** protilátky, jsou třídy IgM a propojují dva erythrocyty v solném prostředí,
- **Inkompletní** protilátky, jsou třídy IgG, nemohou způsobit přímou aglutinaci a propojení dvou erythrocytů se dosáhne za pomoci dodatečných faktorů (Masopust, Písačka, 2022).



Obrázek č. 3. Kompletní a inkompletní protilátka (Masopust, 2016, str. 26)

přirozené, imunní a pasivně přenesené protilátky

- **Přirozené** protilátky, které jsou přítomné v séru jedince, který nikdy nepřišel do styku s antigenem cestou transfuze nebo gravidity. Zřejmě jejich tvorbu způsobuje vystavení organismu antigenům prostředí, bakterií nebo virů; obvykle optimálně reagují při nižších teplotách a jsou třídy IgM. Některé přirozené přítomné protilátky jsou autoaglutininy jako anti-H a anti-I (Fábryová et al., 2012; Masopust, Písačka, 2022).
- **Imunní** protilátky, které se objevují po kontaktu organismu s cizím antigenem při transfuzi, transplantaci nebo v graviditě. Pravděpodobnost vzniku stoupá především u polytransfundovaných pacientů a u žen po vícečetných těhotenstvích (Fábryová et al., 2012).
- **Pasivně přenesené protilátky** podáním imunoglobulinu (nejčastěji po profylaktickém podání anti-D), dárcovské plazmy, lymfocytů z transplantovaného orgánu nebo hematopoetických buněk (Masopust, Písačka, 2022).

pravidelné a nepravidelné protilátky

- **Pravidelné** protilátky se vyskytují pravidelně – očekávaně – v lidské plazmě/séru; jsou to protilátky anti-A, anti-B (Masopust, Písačka, 2016).
- **Nepravidelné** protilátky jsou všechny ostatní protilátky kromě anti-A, anti-B; dále je dělíme na alogenní a autologní protilátky (Masopust, Písačka, 2016).

alogenní a autologní protilátky

- **Alogenní** protilátka (aloprotilátka) je protilátka proti antigenu, který u daného jedince není přítomen, a protilátka může reagovat pouze s erytrocyty nesoucími daný antigen, ale ne s erytrocyty jedince, který tyto protilátky vytvořil (Masopust, Písačka, 2022).
- **Autologní** protilátka (autoprottilátka) je protilátka proti antigenu, který nese na svých erytrocytech daný jedinec, protilátka často reaguje s většinou diagnostických i dárcovských erytrocytů (Masopust, Písačka, 2022).

2.3.4 Klinická významnost krevněskupinových protilátek

Mohou způsobovat:

- Potransfuzní reakci (potransfuzní hemolytickou reakci, aloimunizaci),
- hemolytické onemocnění plodu/novorozence,
- autoimunitní hemolytickou anémii (Masopust, Písačka, 2022).

Klinický význam krevně skupinových protilátek závisí na:

- a) Optimální teplotě reakce (tepelné protilátky se považují za klinicky významné, chladové protilátky mají většinou malý klinický význam),
- b) imunoglobulinové třídě a podtřídě (IgG1 a IgG3 mohou aktivovat komplement, zatímco IgG2 a IgG4 jen zřídka; makrofágy mají vysoce afinitní receptory pro IgG3, méně pro IgG1, velmi slabě afinitní pro IgG2 a žádné pro IgG4),
- c) schopnosti vázat komplement (IgM, které vážou komplement, mohou způsobit intravaskulární hemolýzu, protože po fixaci komplementu dojde k aktivaci celého komplementového systému. Většina protilátek třídy IgM jsou chladové protilátky, které často mají svůj hemolytický účinek omezen. Některé protilátky třídy IgG rovněž vážou komplement a jsou aktivní při 37 °C a mohou rovněž způsobovat intravaskulární destrukci erytrocytů),
- d) urychlené tvorbě protilátek po opakované antigenní stimulaci: sekundární imunitní odpověď (protilátky nejsou detekovatelné, po opětovném kontaktu

s antigenem se prostřednictvím paměťových lymfocytů rychle tvoří velké množství protilátek dané specificity) (Masopust, Písačka, 2022).

2.4 Reakce antigenu s protilátkou

Chemická reakce malého místa glykoproteinové molekuly protilátky (na Fab zakončení – paratopu s vazebnými místy – s epitopy na povrchu membrány erytrocytu (Masopust, Písačka, 2022).

2.4.1 Epitop

Je malá oblast antigenu, která reaguje s vazebným místem příslušné protilátky (Masopust, Písačka, 2016).

2.4.2 Paratop

Jedná se o oblast variabilní části protilátky, jež se specificky váže na epitop antigenu (Masopust, Písačka, 2022).

2.4.3 Ovlivnění reakce antigen-protilátka

Tuto vazbu ovlivňují faktory:

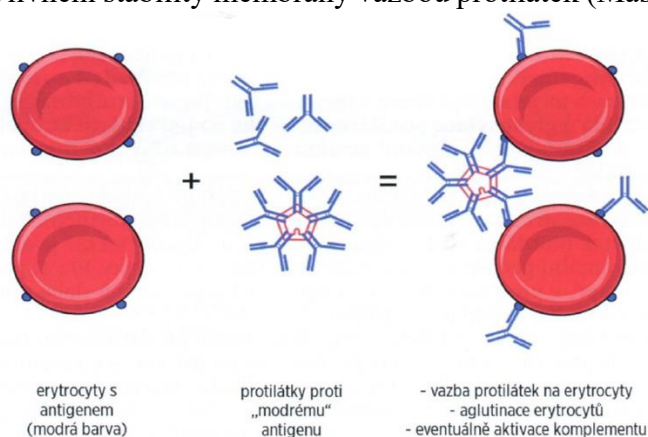
- **Teplota** – polární vazba antigen-protilátka – ve vodném prostředí dochází k tvorbě vodíkových můstků. Tato reakce je exotermní, a tudíž silnější za nižších teplot. V této vazbě se uplatňují hlavně sacharidové antigeny. Hydrofobní vazba antigen-protilátka – optimální při vyšších teplotách. V této vazbě se uplatňují především proteinové antigeny,
- **iontová síla prostředí** – oba typy protilátkových vazeb (polární a hydrofobní) jsou ovlivňovány ionty v reakčním prostředí – tyto totiž vytvářejí „obaly“ kolem opačně nabitých oblastí antigenů a protilátek a znesnadňují jejich interakci. Běžným diluentem pro reakce je izotonický fyziologický roztok. Pokud se použije roztok s nižším obsahem Na^+ a Cl^- iontů (low ionic strength solution – LISS), dosáhne se potřebných vazeb antigenů a protilátek rychleji,
- **pH** – většina protilátkových reakcí probíhá optimálně při hodnotách pH kolem 7 – za této situace mají protilátky slabě pozitivní náboj, což je vzhledem k negativnímu náboji erytrocytů optimální. Při výraznějším snížení pH může dojít až k falešně negativním výsledkům. K udržení optimálního pH pro reakce se doporučuje provádět laboratorní tedy v prostředí pufovaného fyziologického roztoku (PBS),

- **kvalitativní a kvantitativní vlastnosti antigenů a protilátek** – dostupnost antigenu pro vazbu protilátky je závislá na jeho vzdálenosti od povrchu membrány, a na jeho případném zakrytí/odkrytí jinými strukturami, na třídě, podtřídě a glykosylaci, hustotě exprese antigenu, koncentraci protilátek a na fenoménu prozóny (Masopust, Písačka, 2022).

2.4.4 Důsledky reakce antigen-protilátky

Funkcí protilátek je odstraňovat „cizí“ elementy z „vlastního“ organismu. Při destrukci erytrocytů působením protilátek jsou dosud popsány 3 mechanismy:

- aktivace komplementové kaskády – vede jak k intravaskulární, tak extravaskulární hemolýze,
- fagocytóza erytrocytů s navázanými IgG protilátkami s následnou extravaskulární hemolýzou,
- přímé ovlivnění stability membrány vazbou protilátek (Masopust, Písačka, 2022).



Obrázek č. 4. Reakce antigenu s protilátkou (Masopust, 2016, str. 29).

2.4.4.1 Komplementová kaskáda

Aktivace proteinů komplementu, která funguje na principu zymogen/enzym, slouží primárně k obraně organismu proti patogenům.

Klasická cesta aktivace komplementu: je zahajována reakcí antigen-protilátka.

Alternativní cesta: aktivátorem jsou přímo povrchy mikrobiálních patogenů, nádorových buněk, různých membrán aj. bez účasti protilátek (Masopust, Písačka, 2016).

Při aktivaci komplementové kaskády při vazbě protilátek na antigeny erytrocytové membrány jsou účinnější protilátky třídy IgM, protože se díky své pentamerické struktuře mohou jednotlivé podjednotky téhož imunoglobulinu navázat na antigeny v těsné blízkosti a tím splnit podmínku iniciální fáze aktivace. Při této fázi se totiž musí ocitnout dva Fc konce imunoglobulinových molekul, jejichž Fab konce jsou navázány na antigeny,

v těsné blízkosti a mezi nimi dochází k aktivaci 6 podjednotek C1q spolu s podjednotkami C1r a C1s. Vzniklý komplex následně aktivuje složky C2 a C4, které dále působí aktivaci složky C3 (Masopust, Písačka, 2022).

Masivní aktivace: např. u inkompatibility AB0 dochází k překonání regulačních mechanismů a k interakci složek komplementu C5, C6, C7, C8 a C9. Protilátka (vázájící komplement) se naváže na antigen, na protilátku se naváže složka C1. Složka C1 se aktivuje a následně aktivuje složku C4, která se štěpí na C4a a C4b; C4b se naváže na erytrocytovou membránu a aktivuje C2; C2 se štěpí na C2a a C2b; C2a se váže na erytrocytovou membránu. Dojde k aktivaci C3. Pak se aktivují C5, C6, C7, C8 a C9. Tyto aktivované složky vytvoří komplex, který se zabuduje do buněčné membrány a vytvoří v ní otvor, kterým dochází ke komunikaci s extracelulárním prostředím a následně k ruptuře membrány (lýza buněk).

Mírnější aktivace: např. non-AB0 inkompatibility, AIHA aj. Po navázání protilátky na antigen probíhá aktivace komplementu stejně jako u masivní aktivace, ale dochází k jejímu zastavení ve fázi aktivace složek C3, přičemž C3b složka adhezuje na povrch erytrocytů, je postupně degradována na složky C3c a C3d a působí opsonizačním efektem – indikuje fagocytózu a extravaskulární destrukci erytrocytů (Masopust, Písačka, 2022).

2.4.4.2 Intravaskulární a extravaskulární hemolýza

Intravaskulární hemolýza: protilátky, které vážou komplement a vedou k aktivaci celého komplementového systému, počínaje složkou C1 až po C9, jsou schopny indukovat poškození buněčné membrány. Vytvoření MAC (membrane attack complex) je schopen proděravět erytrocytovou membránu a způsobit únik hemoglobinu z erytrocytu (cytolýza). Hemolýza takto nastává přímo v krevním oběhu. Tento efekt způsobí zejména komplement vázájící protilátky třídy IgM (Masopust, Písačka, 2022).

Extravaskulární hemolýza: v případě destrukce erytrocytů nepřímým způsobem probíhá hemolýza extravaskulárně ve slezině nebo v játrech. Za tento způsob destrukce jsou zodpovědné dva rozdílné procesy:

- **destrukce ve slezině (lienální hemolýza),** kdy erytrocyty s navázanými protilátkami třídy IgG se vážou k Fc receptorům na membráně makrofágů. Tyto receptory reagují s Fc částí protilátek IgG, odtud jejich název. Erytrocyty, které adhezuje k makrofágům, jsou cytotoxicky destruovány vně makrofágové membrány nebo jsou fagocytovány. Tento proces se odehrává převážně ve slezině a nedochází k aktivaci komplementu,

- **destrukce v játrech (intrahepatální hemolýza)**, kdy protilátky vážou komplement, dochází k jeho aktivaci až po C3. Nenastává přímá lýza erytrocytů. Na jejich membráně zůstává navázaná C3b. Na makrofázích je receptor pro C3b, ke kterému tyto erytrocyty adherují, což následně vede k fagocytóze. C3b se postupně degraduje na C3c a C3d. Tento proces se odehrává v játrech. V játrech mohou být destruovány i erytrocyty s navázanými protilátkami třídy IgM, které neaktivují komplement (Masopust, Písačka, 2016).

2.4.4.3 *Fagocytóza senzibilizovaných erytrocytů*

Senzibilizací označujeme „označkování“ erytrocytů IgG protilátkami a/nebo C3 složkou komplementu. Monocyty a makrofágy v monocytomakrofágovém systému (MMS) jsou vybaveny receptory pro rozpoznání tohoto „označkování“ (Fc receptory reagují s Fc koncem protilátkové IgG molekuly, CR1 a CR3 rozpoznávají na membráně naadherované C3 složky komplementu) (Masopust, Písačka, 2016).

Protilátkami indukovaná destrukce erytrocytů – imunitní hemolýza: vazba protilátek na erytrocyty má za následek destrukci erytrocytů, přičemž mechanismy této destrukce a její intenzita se v jednotlivých případech liší – v závislosti na kombinaci dalších determinujících faktorů. Těmito faktory jsou jednak parametry protilátky (kvantita, specifita, třída, podtřída aj.), jednak vlastnosti antigenu (síla a erytrocytová/tkáňová/plazmatická specifita exprese antigenu) a konečně účinnost efektorových mechanismů hemolýzy (pohotovost k aktivaci komplementové kaskády, eventuálně (ne)schopnost její účinné regulace, „citlivost“ membrány ke komplementové hemolýze, účinnost monocytů a makrofágů v MMS při extravaskulární hemolýze – stav daných orgánů, polymorfismy Fc a CR receptorů, ovlivnění léčbou aj.)

Klinické projevy: od téměř bezpříznakového průběhu přes mírnější anémie, zvýšenou potřebu transfuzní substitute, mírné zhoršení zdravotního stavu až po fatální (Masopust, Písačka, 2016).

2.4.4.4 *Přímé ovlivnění vlastností membrány působením vazby protilátek*

Antiglykoforinové protilátky vazbou na sousedící molekuly GPA způsobují přechodnou změnu uspořádání membránového fosfatidyletanolaminu a vznik kation-prostupných (Ca^{2+}) lipidových pórů, destabilizaci membrány a rozpad erytrocytů. Uvedený mechanismus se uplatnil u klinicky velmi těžké AIHA, jeho uplatnění však není vyloučeno i u aloimunitních inkompatibilních stavů (Masopust, Písačka, 2022).

3 Imunohematologické testy

Základní vyšetření, která se provádí v imunohematologické laboratoři, jsou založena na aglutinační reakci. Pomocí aglutinace je možné vyšetřovat antigeny na erythrocytech (krevní skupiny) i protilátky proti erythrocytům v séru či plazmě (Penka et al., 2012).

Aglutinace je vazba protilátky na erythrocyt, která vyvolá shlukování erythrocytů. Přítomnost či absence aglutinace erythrocytů obsahujících hemoglobin je viditelná pouhým okem. Ke vzniku aglutinace jsou potřeba 2 podmínky:

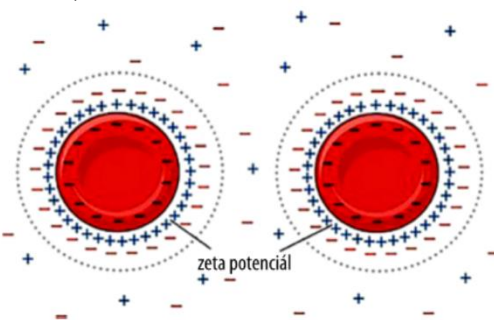
- vazba protilátky na antigen na povrchu erythrocytu, tj. senzibilizace erythrocytu,
- propojení 2 erythrocytů mezi sebou prostřednictvím protilátkové vazby.

Tyto dvě podmínky mohou splňovat protilátky třídy IgM, nazýváme je tedy v imunohematologii kompletními protilátkami (z pohledu aglutinace). IgG (až na ojedinělé výjimky) jsou schopny splnit pouze jednu z výše uvedených podmínek, nazýváme je tedy protilátkami inkompletními (Řeháček, Masopust et al., 2013; Masopust, Písačka, 2022).

Aglutinační testy je možné provádět sklíčkovou metodou, zkumavkovým testem, metodou pevné fáze nebo technikou sloupcové aglutinace (Penka et al., 2012).

3.1 Přímá a nepřímá aglutinace

Povrch erythrocytu nese za normálních okolností slabý negativní náboj a má okolo sebe dvojité „iontové oblaky“. Vnitřní vrstva je pozitivně nabitá a pevně přiléhá k membráně erythrocytu. Vnější vrstva nese negativní náboj. Diferenční potenciál mezi oběma vrstvami se nazývá zeta potenciál a způsobuje, že erythrocyty se navzájem odpuzují a udržují si odstup podle toho, jaká je tloušťka „iontového oblaku“ (Fábryová et al., 2012; Masopust, Písačka, 2022).



Obrázek č. 5. Zeta potenciál (Masopust, 2022, str. 155)

3.1.1 Přímá aglutinace

IgM molekula překlene vzdálenost mezi 2 erytrocyty (Masopust, Písačka, 2022). V diagnostice protilátek nám výlučně přímá aglutinace dané protilátky (nereaguje-li v antiglobulinovém testu) dává informace o její suspektní IgM třídě, a tudíž potencionální klinické benignosti (s výjimkou anti-A/-B a silných chladových protilátek). (Řeháček, Masopust et al., 2013).

Přímá aglutinace se využívá k detekci erytrocytových antigenů AB0 skupiny, RhD a řady dalších antigenů pomocí IgM protilátek, a k detekci antierytrocytových protilátek (Masopust, Písačka, 2022).

3.1.2 Nepřímá aglutinace

IgG molekula většinou vzdálenost mezi erytrocyty nepřeklene. Erytrocyty jsou těmito protilátkami senzibilizovány, ale neaglutinují. Podobné je to u protilátek IgA. K dosažení aglutinace je nutno do reakce přidat další substance – AGH, enzym, polybren (Masopust, Písačka, 2022).

Nepřímá aglutinace se využívá k detekci erytrocytových antigenů pomocí IgG protilátek a k detekci antierytrocytových protilátek třídy IgG (popřípadě IgA). Nepřímá aglutinace se uplatňuje u antiglobulinových testů a u enzymového testu. (Masopust, Písačka, 2022).

3.1.2.1 Antiglobulinový test (Coombsův test)

Jedná se o nejdůležitější imuno hematologický test (Penka et al., 2012). K „přemostění“ mezery mezi 2 erytrocyty s navázanými IgG protilátkami nebo aktivovanou C3 složkou komplementu se rutinně používá polyspecifické AGH (anti-IgG a anti-C3d). Rozlišují se přímý a nepřímý antiglobulinový test (PAT a NAT) (Masopust, Písačka, 2022).

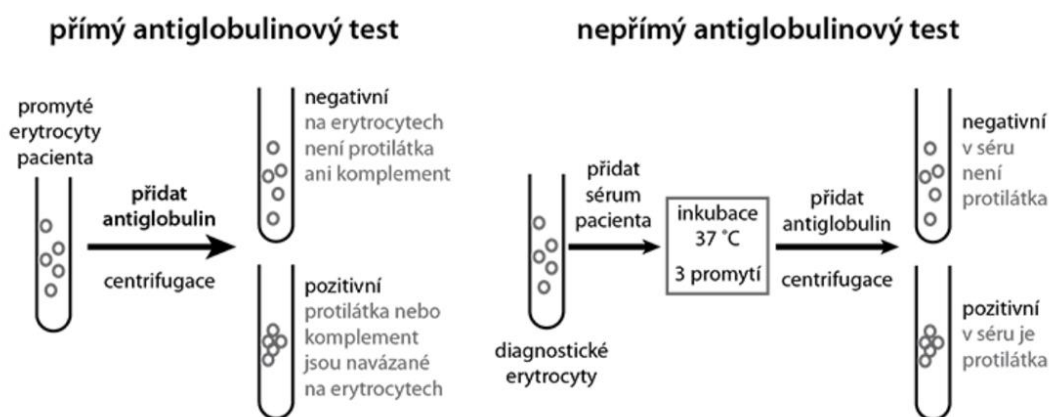
Přímý antiglobulinový test (PAT)

Slouží k detekci in vivo senzibilizace pomocí polyspecifického antiglobulinového séra (AGH; anti-IgG + anti-C3d). Pozitivní nálezy je možné upřesnit kvalitativně (pomocí monospecifických AGH) i kvantitativně (titr AGH). Provádí se sloupcovou aglutinací a v systému pevné fáze a výjimečně zkumavkovým testem (Řeháček, Masopust et al., 2013). Používá se při průkazu imunitního typu hemolýzy, tj. u pacientů po transfúzích, transplantacích, u hemolytického onemocnění novorozence, u potransfuzních reakcí a u pacientů s projevy autoimunity (AIHA) (Penka, Tesařová et al., 2012).

Nepřímý antiglobulinový test (NAT)

Detekuje vazbu erytrocyt – protilátka (a/nebo erytrocyt – C3 složka komplementu) vzniklou in vitro. Používá se jak pro vyšetření protilátek proti erytrocytům (screening, identifikace aj.), tak i pro detekci antigenů (např. Duffy, S, s) pomocí diagnostických IgG protilátek (Řeháček, Masopust et al., 2013). Je základním testem pro test kompatibility (Masopust, Písačka, 2022).

NAT lze provádět zkumavkovým testem (využívá se výjimečně), testem sloupcové aglutinace, testem pevné fáze (Řeháček, Masopust et al., 2013).



Obrázek. č. 6. Princip antiglobulinových testů: PAT, NAT (upraveno podle Coombs test Hinds Community College in Mississippi [online], 2011) (Penka, Tesařová et al., 2012, str. 25)

3.1.2.2 Enzymový test (ET)

Jedná se o test, kde se působením proteolytických enzymů (papain, bromelin, ficin) odštěpí extramembranózní části některých proteinů, zejména glykoforinů, a tím klesne vzájemné odpuzování krvinek a krvinky se mohou se více přiblížit (Řeháček, Masopust et al., 2013).

ET lze použít k průkazu senzibilizujících protilátek, jeho provedení sice není povinné, je však vhodné např. při vyšetření potransfuzních reakcí a u pacientů opakovaně transfundovaných s velkým rizikem imunizace (Penka, Tesařová et al., 2012).

Tento test je doplňková technika, pouze vzácně citlivější než NAT (Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL_07, verze 4 (2019_09)).

3.2 Antiglobulinová séra

Blaney a Howard (2013) tvrdí, že v roce 1945 Coombs, Mourant a Race prokázali, že červené krvinky se mohou spojovat s protilátkami, aniž by došlo k aglutinaci. Tito výzkumníci připravili protilátku, která reagovala s lidskými globuliny a použili toto

čínidlo k aglutinaci červených krvinek potažených protilátkou – připravili antiglobulinové (Coombsovo) sérum.

Antiglobulinové sérum obsahuje sekundární protilátky, které se vážou na primární protilátky a/nebo na složku komplementu (Masopust, Písačka, 2022). Existují 2 typy antiglobulinových činidel, a to polyspecifické a monospecifické (Blaney a Howard, 2013).

Pro rutinní testování antiglobulinové sérum musí vždy obsahovat anti-IgG složku (Quinley, 2020). Anti-IgA složka není nutná, protože zatím nebyly nalezeny protilátky patřící pouze do IgA třídy. Pokud jsou přítomny IgA protilátky, vždy jsou přítomny také IgG protilátky stejné specifity. Anti-IgM složka není rovněž nezbytná. IgM protilátky patří zpravidla k chladovým protilátkám a nejsou klinicky důležité. V každém případě mohou IgM protilátky aglutinovat erythrocyty přímo, a tak není anti-IgM složka požadována.

Pro většinu použití musí antiglobulinové sérum kromě anti-IgG složky obsahovat složku anti-komplementovou. Důležitá je přítomnost anti-C3d složky. Navíc může být přítomna složka anti-C3c. Jsou dva důvody, proč je důležitá anti-C3d složka. Za prvé, na krvinkách senzibilizovaných komplementem *in vivo* je přítomen C3d, nikoliv C3c. Za druhé, v průběhu dlouhých inkubačních dob (delších než 1,5 hodiny) se C3c od krvinek oddělí. Jak C3c a C3d jsou antigenními determinantami C3b molekuly. C3b se naváže na erythrocyty v průběhu aktivace komplementu.

Antiglobulinové sérum obsahující jak anti-IgG, tak anti-komplementovou složku se nazývá polyspecifické antiglobulinové sérum (Wang, Zhang et al., © 2021), které se hlavně používá v antiglobulinovém testu v solném roztoku, albuminu nebo LISS.

V případě pozitivní reakce s polyspecifickým antiglobulinovým sérem se zjišťuje příčina positivity PAT – typ senzibilizující protilátky. K rozlišení se používají monospecifická AGH séra, jako jsou anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-C3c a anti-C3d (Engelfriet, Meulenbroek et al., 2003).

Výsledky získané testováním s monospecifickými reagensy mohou pomoci při definování klinického stavu pacienta (Příbalový leták). Anti-IgG globulin AGH není specifický vůči těžkým řetězcům, a proto může být také schopen reagovat s lehkými řetězci Kappa a Lambda molekul IgA a IgM (Příbalový leták LISS/Coombs karta). Spolehlivě však přítomnost IgA a IgM prokáže pouze pozitivní reakce monospecifických anti-IgA a anti-IgM AGH (Masopust, Písačka, 2016). Polyspecifické AHG se používá pro rutinní detekci a identifikaci aloprotilátek, zkoušky kompatibility a PAT.

4 Přímý antiglobulinový test

Přímým antiglobulinovým (Coombsovým) testem se prokazují „in vivo“ navázané imunoglobuliny a/nebo složky komplementu na erytrocyty, tj. přímý antiglobulinový test prokazuje senzibilizaci erytrocytů.

PAT je jedním z nejpoužívanějších testů v laboratorní medicíně, který objevil v roce 1945 Robert R. A Coombs spolu s A. Mourantem, R. R. Racem. Coombs vyvinul princip antiglobulinového testu, který nese jeho jméno – Coombsův test (Pincock, © 2006).

Provádí se sloupcovou aglutinací, systémem pevné fáze a zkumavkovým testem (Masopust, Písačka, 2022).

4.1 Provedení přímého antiglobulinového testu

PAT se provádí v případě podezření na hemolytické onemocnění novorozenců, autoimunitní hemolytickou anémii, hemolytickou potransfuzní reakci, medikamentózně indukovanou hemolýzu a dále v případě podezřelých laboratorních nálezů jako např. u pozitivní autokontroly při identifikaci protilátek, u negativního screeningu protilátek a pozitivního testu kompatibility (vyšetří se erytrocyty transfuzního přípravku) (Masopust, Písačka, 2016).

4.2 Vlastní mechanismy imunitní destrukce erytrocytů

Pozitivní PAT u HON, AIHA nebo HTR diagnostikuje urychlenou destrukci erytrocytů na imunologickém podkladě s intravaskulární nebo extravaskulární hemolýzou ve slezině nebo játrech (Masopust, Písačka, 2016).

4.2.1 *Přímá lýza erytrocytové membrány = intravaskulární imunní hemolýza*

Nastává vždy při inkompatibilitě v AB0 a jiných systémech, kdy protilátka aktivuje komplement až do terminálního lytického komplexu (Masopust, Písačka, 2022).

4.2.2 *Fagocytóza = extravaskulární imunitní hemolýza*

- a) Autoprotilátky navázané na erytrocyty působí jejich opsonizací – vážou se pomocí Fc fragmentu na specifické receptory povrchu efektorových buněk (makrofágů), erytrocyty jsou tak také navázány na tyto buňky, dojde k fagocytóze a destrukci erytrocytů ve slezině. Tohoto procesu se neúčastní komplement. Makrofágy mají vysoce afinitní receptory pro IgG3, méně afinitní pro IgG1, velmi slabě afinitní pro IgG2 a žádné pro IgG4. Z toho vyplývá i vztah mezi množstvím molekul jednotlivých podtříd IgG potřebných k indukci fagocytózy: IgG3 cca 135-500

molekul, IgG1 1 000 – 4 000 molekul, IgG2 minimálně 10 000 molekul. Vzhledem k tomu, že existují funkční rozdíly mezi podtřídami IgG, je jejich určení důležité (Masopust, Písačka, 2022).

- b) Vazbou antigen-protilátka se aktivuje komplement, který se však neaktivuje v celé kaskádě, tudíž nenastává intravaskulární hemolýza. Složky komplementu mohou reagovat se specifickými receptory makrofágů, tím dojde k opsonizaci a následně k sekvestraci erytrocytů, tj. část erytrocytů je fagocytována v játrech. IgG 1 a IgG3 mohou aktivovat komplement, zatímco IgG2 a IgG4 jen zřídka (Masopust, Písačka, 2022).

4.2.3 Mechanismus ADCC a nově popsany mechanismus hemolýzy

Při imunitní destrukci senzibilizovaných erytrocytů se zřejmě uplatňuje i mechanismus ADCC (buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách) a nově popsany mechanismus hemolýzy, kdy autoprotiilátky vazbou na GPA ovlivňují uspořádání fosfolipidů v membráně erytrocytů, zvyšují její permeabilitu pro Ca^{2+} a vedou tak k jejímu rozpadu. Ke kterému z typů hemolýzy v daném případě dojde, závisí jednak na vlastnostech protilátek (třída, podtřída, koncentrace, specificita) a jednak na individuálních vlastnostech makrofágů (polymorfismy) (Masopust, Písačka, 2016).

4.3 Princip testu

K vyšetřovaným erytrocytům se přidává pouze AGH, primárně se používá polyspecifické AGH (anti-IgG + antiC3d), v případě positivity odděleně monospecifické anti-IgG a anti-C3d, v případě i anti-IgM, anti-IgA, anti-C3b (Masopust, Písačka, 2016).

4.4 PAT pozitivní

Pozitivitu PAT mohou způsobit:

- a) Složky komplementu – při aktivaci komplementu klasickou cestou při reakci antigen-protilátka (bakteriální infekce, autoprotiilátky, aloprotiilátky),
- b) aloprotiilátky – u akutních potransfuzních reakcí (při inkompatibilní transfuzi je pozitivní PAT jediným průkazem imunní hemolýzy), u pozdních potransfuzních reakcí, kdy je PAT pozitivita po 5-10 dnech nebo u HON (protilátky matky proti fetálním erytrocytům),
- c) tepelné, chladové nebo bifazické autoprotiilátky,
- d) léky,

- e) transplantace orgánů nebo homeopatických buněk – přenosem dárcovských lymfocytů, které tvoří protilátky proti antigenům AB0, ale i antigenů jiných krevně skupinových systémů,
- f) choroby – u srpkovité anémie, beta talasemie, onemocnění ledvin, mnohočetného myelomu, autoimunních onemocnění, AIDS,
- g) pasivně přenesené protilátky – po podání plazmy, IVIG, derivátů plazmy
- h) nespecificky adsorbované bílkoviny – při hypergamaglobulinémii,
- i) aplikace monoklonálních protilátek (např. daratumumab) při léčbě malignit,
- j) neznámá příčina – cca 10 % pacientů a 0,01 % dárců má PAT pozitivní, ale bez zkráceného přežívání erytrocytů (Masopust, Písačka, 2022).

4.4.1 Postup u PAT pozitivity

- a) Reakce s polyspecifickým AGH se používá pro screeningové vyšetření PAT. Další vyšetření a klinická významnost PAT se většinou určuje v případě pozitivní reakce $\geq 2+$.
- b) Reakce s monospecifickými AGH umožňuje prokázat jednotlivé třídy imunoglobulinů a aktivaci C3c a C3d na erytrocytech.
- c) Diluční test anti-IgG při průkazu senzibilizace erytrocytů imunoglobuliny třídy IgG je vhodný pro zjištění titru protilátky IgG, a z toho vyplývající riziko hemolýzy. Počet molekul IgG navázaných na erytrocyt ovlivňuje zrychlenou destrukci erytrocytů. Titr anti-IgG 1:30 je nevýznamný, není nutné stanovení podtříd.
- d) Titr anti-IgG $\geq 1:300$ je klinicky významný, pak je nutné stanovení podtříd IgG. Zjišťuje se přítomnost podtříd IgG1 a IgG3 ve dvou titrech (nízký titr 1:1, vysoký titr 1:100). Pozitivní reakce podtříd IgG1 a IgG3 v nízkém titru představuje střední riziko hemolýzy, pozitivní reakce podtříd IgG1 a IgG3 ve vysokém titru vysoké riziko hemolýzy. Z laboratorního pohledu riziko hemolýzy tedy nastává při průkazu senzibilizace erytrocytů protilátkou typu IgG v titru vyšším než 1:30, při průkazu podtřídy IgG1, a zvláště IgG3 a je potencováno průkazem aktivace složek komplementu. U AIHA z chladových protilátek nebo bifazických protilátek se prokazuje pouze aktivovaný komplement. Hodnocení rizika hemolýzy či HON se musí kombinovat s klinickým stavem pacienta, anamnézou, a jinými laboratorními údaji.

- e) Při vysokém titru jsou tepelné protilátky přítomny i volně v séru a lze je prokázat nepřímým antiglobulinovým a enzymovým testem (provádí se screening a identifikace antierytrocytárních protilátek, včetně autokontroly).
- f) K identifikaci protilátek navázaných na erythrocyty se využívají eluční testy, kdy z povrchu erythrocytů se protilátky uvolní a eluát se testuje s panelem diagnostických erythrocytů, případně s erythrocyty A1 a/nebo B (např. u susp. AB0 HON); případně s erythrocyty otce (susp. HON s anti-LFA). Eluce se provádí u PAT s anti-IgG $\geq 2+$, ev. i u slabšího nebo negativního PAT v případě klinicky významné hemolýzy. Neprovádí se u PAT pouze s anti-C3d.

Pozitivní PAT je nutné posuzovat společně s klinickým obrazem a dalšími laboratorními parametry – hemoglobin, hematokrit, laktátdehydrogenáza (LDH), haptoglobin, terikulocyty, hladina imunoglobulinů. Negativní PAT nevylučuje možnost procesu hemolýzy, daná protilátka může mít nízkou afinitu, nebo vazbu protilátky na erythrocyty nelze prokázat, protože je pod prahem citlivosti laboratorního testování.

5 Využití přímého antiglobulinového testu

5.1 Autoimunitní hemolytická anémie (AIHA)

Autoimunitní hemolytická anémie (AIHA) je heterogenní skupina patologických stavů, kterým je společný výskyt autoprotilátek proti antigenům červených krvinek a jimi zprostředkovaný zrychlený zánik erytrocytů (Řeháček, Masopust et al., 2013). Některé autoprotilátky však nezpůsobují žádné klinické problémy, protože nejsou aktivní v mechanismu, který je odpovědný za destrukci erytrocytů (Masopust, Písačka, 2016; Čermák, Písačka, © 2018). Výskyt AIHA je považován za neobvyklý, odhaduje se na 1 až 3 případy na 100 000 obyvatel ročně (Scheckel © 2022).

Rozeznáváme tyto typy AIHA (zkratky z anglických termínů):

- AIHA s tepelnými protilátkami (WAIHA),
- AIHA s chladovými protilátkami (syndrom chladových aglutininů, CAS),
- Smíšený typ AIHA s tepelnými i chladovými protilátkami,
- Polékový typ AIHA (DIHA) (Penka, Tesařová et al., 2012; Řeháček, Masopust et al., 2013),
- Paroxysmální chladová hemoglobinurie (PCH) (Penka, Tesařová et al., 2012).

5.1.1 AIHA s tepelnými protilátkami

Jde o autoimunitní onemocnění charakterizované zkráceným přežíváním erytrocytů v důsledku přítomnosti protilátek reagujících optimálně při 37 °C.

AIHA s tepelnými protilátkami může být idiopatická (tj. bez zjevné asociace s jinými chorobami), nebo sekundární (nejčastěji v dospělosti u lymfoproliferativních nebo autoimunitních onemocnění, v případě dětí u virových infekcí).

Tento typ tvoří cca 70 % všech AIHA, idiopatická forma postihuje častěji ženy (60 %) (Penka, Tesařová et al., 2012; Řeháček, Masopust et al., 2013). Hemolýza bývá v naprosté většině případů extravaskulární (Řeháček, Masopust et al., 2013).

5.1.1.1 Imunohematologické laboratorní nálezy u WAIHA

Základním nálezem je průkaz vazby autoprotilátek na krvinky – pozitivita přímého antiglobulinového testu (PAT). Jde v naprosté převaze o protilátky třídy IgG, které mohou, ale nemusí vázat komplement (pozitivní PAT s IgG nebo s IgG + C3d) a vedou k destrukci erytrocytů extravaskulárně. Zřídka se uplatňují protilátky třídy IgM (mohou

způsobit těžkou až fatální AIHA, bývají to tzv. hemolyziny) a výjimečně IgA, ev. v kombinaci s IgG.

Přibližně ve 40 % případů je současně prokazována přítomnost volných autoprotilátek v séru – pozitivita nepřímého antiglobulinového testu (NAT), častěji bývá prokazována pozitivita enzymových testů cca v 90 % (Řeháček, Masopust et al., 2013). Tepelné protilátky jsou namířeny nejčastěji proti antigenům Rh systému (zvláště anti-e) (Penka, Tesařová et al., 2012).

5.1.2 AIHA s chladovými protilátkami

Jde o autoimunitní hemolytickou anémii s protilátkami reagujícími při teplotách nižších než 32 °C (Penka, Buliková et al., 2009).

AIHA s chladovými protilátkami může být idiopatická nebo sekundární (nejčastěji u infekce *Mycoplasma pneumoniae* a EBV). Tento typ tvoří 25-30 % AIHA a postihuje obě pohlaví stejně často.

Chladové se navážou na erythrocyty při nízké teplotě v periferní cirkulaci a umožňují připojení komplementu na erythrocyty. Při průtoku erythrocytů v teplejších (centrálních) částech cirkulace se protilátky IgM z povrchu erythrocytů uvolňují, ale komplement na jejich povrchu zůstává. Dochází k extravaskulární hemolýze (Penka, Tesařová et al., 2012; Řeháček, Masopust et al., 2013).

5.1.2.1 Imunohematologické laboratorní nálezy u CAS

Chladové protilátky, resp. chladové aglutininy (CA), jsou obvykle IgM, vzácně i IgG a IgA. Pozitivita PAT je pouze s anti-C3d (na povrchu erythrocytů se detekuje pouze komplement) (Řeháček et al., 2013). V séru se chladové protilátky prokazují především při teplotách okolo 4 °C.

Chladové protilátky mohou být v nízkém titru přítomny i u jinak zdravých jedinců (1:64. při 4 °C ve zkumavkovém testu). Patologické chladové aglutininy bývají přítomny ve vysokých titrech (většinou více než 1:1000) a mají většinou široké teplotní rozmezí reaktivity protilátky (většinou reagují mezi 20-37 °C). Specifita protilátek bývá téměř v 90 % anti-I.

5.1.3 Paroxysmální chladová hemoglobinurie (PCH)

PCH je vzácné autoimunitní onemocnění charakterizované vznikem hemoglobinurie po expozici chladu. Hemolýzu a hemoglobinurii má v tomto případě na svědomí tzv. Donath-Landsteinerova protilátka. Jde o polyklonální chladovou komplement fixující protilátku třídy IgG, která je silným bifazickým hemolyzinem. V ochlazených částech

těla se váže na erythrocyty, v teplejších částech těla se protilátka uvolní z vazby na erythrocyty a dochází k aktivaci komplementu, následně k intravaskulární hemolýze s hemoglobinurií. K rozvoji onemocnění dochází u dětí po virovém onemocnění nebo po vakcinaci. Může se vyskytnout u starých lidí jako idiopatická chronická choroba (Penka, Buliková et al., 2009; Masopust, Písačka, 2022).

5.1.3.1 Imunohematologické nálezy u PCH

Nalézáme pozitivitu PAT způsobenou pouze vazbou C3d. Eluce se u tohoto typu AIHA neprovádí, nepřináší žádnou informaci. V séru jsou přítomny obvykle slabé chladové protilátky (test při 4 °C), vzácně i protilátky reagující při 37 °C. Samotný hemolyzin není prokazován na krvinkách, ale pouze v séru. Specifickým testem pro průkaz PCH je Donathův-Landsteinerův test (Řeháček, Masopust et al., 2013; Masopust, Písačka, 2022).

5.1.4 Smíšený typ AIHA

Smíšený typ AIHA s tepelnými a chladovými protilátkami postihuje přibližně 7 % pacientů s AIHA. Charakterizuje ho kombinace tepelných a chladových autoprotiátěk a tomu odpovídající smíšený laboratorní nález (Penka, Tesařová et al., 2012).

5.1.5 Polékový typ AIHA

Může jej způsobit mnoho různých léků. Skutečná incidence je neznámá vzhledem k obtížnému průkazu. Relativně často DIHA způsobují některé cefalosporiny druhé a třetí generace a nesteroidní antirevmatika.

Některé léky mohou u jednoho pacienta fungovat více způsoby a/nebo působit u různých pacientů odlišně (Masopust, Písačka, 2022).

5.1.5.1 Imunohematologické nálezy u DIHA

Sérologické testování v této oblasti není dosud dostatečně standardizováno, mnoho případů (zejména s lehčí hemolýzou) není diagnostikováno a často je diagnostika velmi obtížná (zejména pokud je vyvolávajícím činitelem nikoliv lék jako takový, ale jeho metabolit).

Nejčastější problém je pozitivní PAT a negativní eluát. Na polékovou AIHA se začne myslet až po vyloučení jiných příčin hemolýzy a když pacient dostává lék, který může způsobovat hemolýzu (Masopust, Písačka, 2016).

5.2 Hemolytické onemocnění plodu/novorozence (HON)

Hemolytická nemoc plodu a novorozence je charakterizována protilátkami tvořenými matkou proti „cizímu“ antigenu/ům na erytrocytech plodu, které zdědil od otce. Aloproutilátky třídy IgG pak prochází placentou, senzibilizují krvinky plodu a vedou k jejich zkrácenému přežívání v důsledku hemolýzy (Kostrouchová et al., © 2022).

Dojde-li k průniku erytrocytů plodu přes placentu do oběhu matky, začne si matka vytvářet protilátky proti antigenům, které sama nemá, tzn. ty, které dítě zdědilo od otce. K vycestování malých množství fetálních erytrocytů do krevního oběhu matky dochází obvykle v druhé polovině těhotenství, nejčastěji však při samotném porodu. Podstatné je, že přes placentu do krevního oběhu dítěte mohou pronikat jen protilátky třídy IgG, neboť protilátky IgM jsou pro přechod placentární bariérou příliš velké. To znamená, že přirozené aglutininy v AB0 systému onemocnění dítěte nevyvolávají.

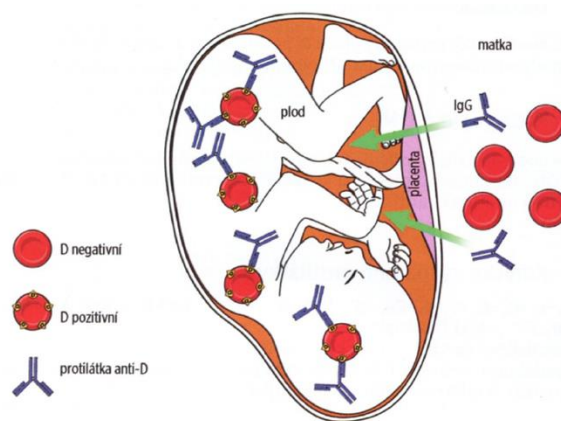
Vznikne-li fetomaternální inkompatibilita a imunní protilátky proniknou do krevního oběhu plodu, způsobí zkrácené přežívání erytrocytů. Ischemie tkání má za následek zvýšení erythropoézy extramedulárně, což vede k zvětšení jater a sleziny. V těžkých případech vzniká hluboká chudokrevnost, špatné prokrvení tkání až srdeční nedostatečnost a generalizovaný edém plodu – hydrops fetalis.

Po porodu do hry vstupuje dále vysoká hladina nekonjugovaného bilirubinu dítěte, které díky nezralosti jater dítěte nemůže být konjugován s kyselinou glukuronovou a pro nedostatečné množství ani vázán na albumin. Tento nenavázaný bilirubin může pronikat hematoencefalitickou bariérou a poškozovat mozek dítěte – jádrový ikterus. Před porodem nastává tato vážná komplikace jen u velmi těžkých případů, neboť organismus matky je většinou schopen nadbytečný bilirubin vznikající extravaskulární hemolýzou zpracovat (Penka, Buliková et al., 2009).

Na vzniku inkompatibility mezi matkou a plodem se může uplatnit více než 50, tedy většina erytrocytárních antigenů. Největší roli však hrají anti-D, -c, -K, -E, pak -e, -Ce, -cE, -Fy^a, Jk^a, anti-A, anti-B, vzácně další IgG reagující při 37 °C v NAT (Penka, Buliková et al., 2009; Masopust, Písačka, 2022).

HON můžeme podle specifity příčinných protilátek rozdělit do tří kategorií:

- Rh HON (protilátky anti-D, -D+C, -D+E) u matek RhD negativních, je-li plod po otci RhD pozitivní,
- AB0 HON (protilátky anti-A, -B) převážně u matek krevní skupiny 0, zatímco dítě má A či B, AB0 HON je častější než RhD HON,
- ostatní (Penka, Tesařová et al., 2012; Masopust, Písačka, 2016).



Obrázek č. 7. Hemolytické onemocnění novorozence (Masopust, 2016, str. 306)

5.2.1 Imunohematologické vyšetření těhotné

V průběhu těhotenství je běžnou praxí určovat krevní skupinu AB0 a antigen D všech těhotných, a provádět opakovaně screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. V případě pozitivního výsledku screeningu protilátek se provádí identifikace protilátek (Penka, Buliková et al., 2009).

U protilátek, které mohou ohrozit plod a/nebo novorozence se stanovuje titr, který se v průběhu těhotenství několikrát kontroluje. Cílem imunohematologického vyšetření těhotných je identifikovat těhotné, které jsou s rizikem HON a identifikovat RhD negativní ženy s potřebou profylaxe. Před senzibilizací RhD negativní matky v průběhu těhotenství a po porodu se aplikuje anti-D sérum, které případně přítomné erythrocyty v oběhu matky povleče, a tím zabrání vzniku imunitní reakce (Penka, Buliková et al., 2009).

5.2.2 Imunohematologické vyšetření novorozence

Rutiní imunohematologické vyšetření u všech novorozenců se nedoporučuje, ani u matek s krevní skupinou 0 (AB0 inkompatibilita by neměla znamenat přísnější sledování, protože u všech novorozenců by se měl zjišťovat a následně monitorovat ikterus).

Provádí se u matek novorozenců s potenciálně klinicky významnými protilátkami především kvůli případné transfuzi novorozence, dále u novorozenců matek s neprokázanými nepravidelnými protilátkami, kdy novorozenec má klinické známky HON a nejedná se o AB0 HON, a u suspektního AB0 HON (u matek novorozenců s KS 0). (Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČSL JEP č. STL2010_06).

Pozitivní PAT u novorozence s HON je výsledkem senzibilizace erythrocytů novorozenců *in vivo* mateřskými protilátkami povahy IgG. PAT je silně pozitivní

u anti-D a dalších protilátek Rh systému, anti-K, anti-Jk, anti-Fy. U AB0 inkompatibility bývá PAT často negativní či jen slabě pozitivní, pravděpodobně proto, že počet antigenních determinant A nebo B u novorozenců je malý. V případě positivity PAT se elučním testem mohou uvolnit protilátky navázané na erytrocyty, eluát se otestuje s panelem diagnostických erytrocytů. Eluce se provádí, pokud není jednoznačně identifikována protilátka u matky, u směsi protilátek k určení, která specifická protilátka se podílí na HON a u suspektního AB0 HON, jen v případě nedostupného či nejasného vyšetření imunních protilátek anti-A, anti-B.

Pozitivita PAT nepotvrzuje diagnózu HON, nemusí mít žádný klinický význam. Je nutné vyšetření hemoglobinu a sérového bilirubinu novorozence. Naopak u negativního PAT mohou být příznaky těžkého HON, a to nejen u AB0 inkompatibility (Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČSL JEP č. STL2010_06).

5.3 Potransfuzní imunitní reakce červené řady

Pojmem potransfuzní reakce jsou označovány všechny neočekávané nežádoucí účinky související s podáním transfuzních přípravků (Řeháček, Masopust et al. 2013). Velká část potransfuzních reakcí je zprostředkována imunitně. Vzniká na podkladě imunologické neslučitelnosti mezi dárce a příjemcem, vyskytují se v akutní a pozdní formě, hemolýza může probíhat intravaskulárně nebo extravaskulárně (Řeháček, Masopust et al., 2013; Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2019_14).

Při hemolýze po krevní transfuzi dochází k rychlé destrukci erytrocytů účinkem protilátek přítomných v plazmě příjemce, zřídka může dojít k rozpadu krvinek příjemce v důsledku přítomnosti protilátek dárce v transfuzním přípravku. Bezprostřední akutní hemolytická reakce vzniká v případě, kdy jsou protilátky v plazmě přítomny v čase transfuze. Jde-li o anamnestickou odpověď a protilátku začnou produkovat paměťové lymfocyty (obvykle za 7 až 14 dní), vzniká odložený – pozdní typ hemolytické potransfuzní reakce. Nejčastější příčinou těchto reakcí je přítomnost protilátek anti-K, anti-E, anti-Fy(a), anti-c, anti-D, anti-Jk(a), anti-Jk(b), anti-C a anti-e. Příčinou smrtelných forem je inkompatibilita v AB0 systému, nejčastěji pro záměnu příjemce, laboratorní chyba je vzácná (Penka, Buliková et al., 2009).

5.3.1 Intravaskulární hemolytická reakce z imunních příčin

Obvyklá příčina: záměna přípravku či pacienta, neslučitelnost ABO, vzácněji jiná protilátka vyvolávající akutní intravaskulární hemolýzu (IgM nebo IgG ve vysokém titru).

Laboratorní průkaz: pokles koncentrace hemoglobinu, zvýšení LDH a/nebo bilirubinu, pokles haptoglobinu v séru, hemoglobinurie, pozitivní PAT a pozitivní test kompatibility (protilátka lze ev. prokázat v eluátu) (Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČSL JEP č. STL2019_14).

5.3.2 Extravaskulární hemolytická reakce z imunitních příčin

Obvyklá příčina: nepravidelná antierytrocytární protilátka, která nevyvolává intravaskulární hemolýzu. K vytvoření protilátky může dojít až po podání TP (podané erytrocyty mohou cirkulovat v oběhu příjemce i 5-6 týdnů) a reakce je pak opožděná a bývá méně nápadná. Reakce může být vyvolána i vysokými dávkami i.v. imunoglobulinů (obsahují anti-A, anti-B).

Laboratorní průkaz: pokles hodnot červeného krevního obrazu, vzestup (nepřímého) bilirubinu, vzestup LDH, pokles haptoglobinu, hemoglobinurie, urobilinogen v moči, pozitivní PAT, průkaz antierytrocytové protilátky (Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČSL JEP č. STL2019_14).

5.3.3 Vyšetření PAT u potransfuzní reakce

Vyšetření přímého antiglobulinového testu (PAT) ze vzorku pacienta po transfuzi (i po podání plazmy či trombocytů). V případě jeho pozitivity se doplní PAT z původního vzorku pacienta a PAT z transfuzního přípravku (pokud šlo o přípravek obsahující erytrocyty) (Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČSL JEP č. STL2019_14).

U vzorku pacienta po transfuzi s pozitivním PAT a s negativním NAT se provede eluční test k identifikaci protilátky, která potransfuzní reakci způsobila.

5.4 PAT u dárce

PAT není součástí povinného testování dárců krve. Pozitivita PAT u zdravých dárců se většinou zjistí až při pozitivitě testu kompatibility. 0,01 % dárců krve má PAT pozitivní, ale bez kráceného přežívání erytrocytů (Masopust, Písačka, 2022).

6 Cíl práce a hypotézy

6.1 Cíl práce

Cíl č. 1: Literárně zpracovat problematiku PAT v imuno hematologické laboratoři.

Cíl č. 2: Osvojit si vyšetření PAT a stanovení klinické významnosti PAT.

6.2 Hypotézy

Hypotéza č. 1: Pozitivní PAT v imuno hematologické laboratoři je nejčastěji prokázán u pacientů s autoimunitou proti erytrocytům.

Hypotéza č. 2: Pozitivní PAT je nejčastěji způsoben protilátkami třídy IgG.

7 Metodika

V této části se věnuji vyšetření přímého antiglobulinového testu, který se provádí na TRS NEMCB. Jedná se o analýzu dat za období od 1. ledna do 31. prosince 2022. Vyšetření byla provedena na transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s.

Přímým antiglobulinovým testem se ověřuje, zda-li jsou erytrocyty senzibilizovány protilátkami a/nebo komplementem *in vivo*. PAT se tedy používá při vyšetřování autoimunitní hemolytické anémie, hemolytického onemocnění novorozence, hemolytických potransfuzních reakcí a u dárců krve při pozitivitě testu kompatibility při negativním screeningu nepravidelných antierytrocytárních protilátek.

Při AIHA se PAT nejprve provádí s polyspecifickým sérem AGH, které obsahuje anti-IgG a anti-C3d protilátky. V případě pozitivní reakce (PAT $\geq 2+$) s polyspecifickým AGH se zjišťuje příčina positivity PAT – typ senzibilizující protilátky. K rozlišení se používají monospecifická AGH séra, jako jsou anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-C3c a anti-C3d.

Mohou se také určit IgG podtřídy autoproti látek. Hemolytická aktivita IgG protilátek klesá následujícím způsobem: IgG3 > IgG1 > IgG2 a IgG4. V některých případech pozitivního PAT se určuje titer protilátek.

U novorozenců se PAT vyšetřuje zároveň s krevní skupinou na speciální kartě pro novorozence. V případě positivity se zjišťuje příčina. U RhD HON se jedná o protilátku anti-D, u AB0 HON jsou příčinou positivity PAT protilátky anti-A a anti-B třídy IgG a u ostatního HON může pozitivní PAT způsobit jiná antierytrocytární protilátka.

Vyšetření potransfuzní reakce se PAT vyšetřuje ze vzorku pacienta po transfuzi (i po podání plazmy či trombocytů). V případě jeho positivity se doplní PAT z původního vzorku pacienta a PAT z transfuzního přípravku (pokud šlo o přípravek obsahující erytrocyty) (Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2019_14).

U dárců krve se PAT vyšetřuje pouze s polyspecifickým AGH, v případě positivity se erytrocyty od dárce nepoužijí.

Vyšetření přímého antiglobulinového testu se provádí metodou sloupcové aglutinace a titer PAT je možné provést jak metodou sloupcové aglutinace, tak zkumavkovým testem, který se provádí zřídka.

7.1 Chemikálie, reagensie, spotřební materiál a přístroje

Chemikálie a reagensie:

- AGH polyspecifické, výrobce: IVT Imuno
- Anti-IgG monospecifické, výrobce: Sanquin
- Anti-C3c, C3d Pelikloon, výrobce: Sanquin
- Anti-IgM monospecifické, výrobce BIO-RAD
- Anti-IgG monospecifické, výrobce BIO-RAD
- ID-karta LISS/Coombs
- ID-karta DC-Screening I
- ID-karta DAT IgG1/IgG3
- ID-karta DAT IgG – Dilution
- ID-Diluent 2: modifikovaný LISS pro přípravu suspenze erytrocytů
- PBS

Spotřební materiál:

- Zkumavky
- Stojan na zkumavky
- Pipety
- Jednorázové 3ml pipety
- Pasteurky
- Rukavice

Přístroje a pomocná zařízení:

- ID-Pipetor nebo jiný Pipetor
- ID-Dispensor
- ID-pracoviště
- Laboratorní centrifuga
- ID-Centrifugace 24

Vyšetřovaný materiál:

- Vzorek krve odebraný do zkumavky s antikoagulantem (přednostně do EDTA)
 - Zabrání vazbě komplementu na erytrocyty po odběru vzorku, pozitivní výsledek je dokladem pouze senzibilizace *in vivo*. (Řízená dokumentace TRS NEMCB).

7.2 Princip sloupcové aglutinace

Sloupcová aglutinace je nejčastějším způsobem vyšetření na gelu, která kombinuje principy aglutinace a gelové filtrace.

Metoda je založena na kombinaci aglutinace a chromatografie (Pešlová, 2017). Aglutinace probíhá v mikrozkušavkách, které jsou vylišovány v plastové kartě, díky níž je snadná manipulace. Mikrozkušavku tvoří reagenční komůrka a gelový sloupec, kterým během centrifugace prochází materiál a působí jako filtr. Gelovým sloupcem migrují až na dno jednotlivé neaglutinované erythrocyty, shluky dvou a více krvinek jsou zadržovány v gelovém sloupci, velké shluky zůstávají v horní části sloupce. Předností této metody je snadná a jednoznačná interpretace výsledků (Rojková, 2013).

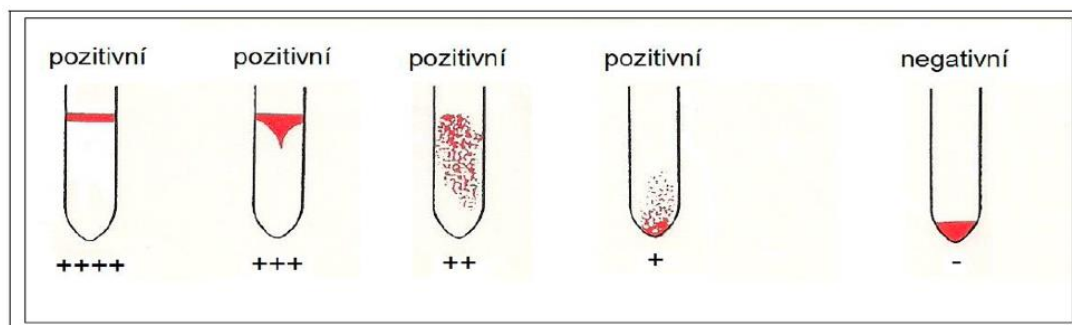
7.3 Hodnocení reakcí

- Kvalitativní (pozitivní, negativní)
- Semikvantitativní (síla pozitivní reakce se vyjadřuje prostřednictvím křížků, od + do ++++)
- Kvantitativní (provádí se titrem protilátky, kdy titr určuje prokazatelná aglutinace u nejvyššího ředění).

Je důležité, aby hodnocení bylo správné a řádně vedeno v dokumentaci (Tesařová et al., 2008).

Pozitivní reakce: aglutinované erythrocyty vytvářejí na povrchu gelu linku nebo jsou rozptýleny v gelu, reakce je hodnocena + až ++++. Mohou se vyskytnout i slabší reakce +/- případně stopové reakce. Pozitivní reakce infikuje senzibilizaci erythrocytů pacienta.

Negativní reakce: kompaktní sediment erythrocytů na dně zkumavky. Negativní reakce indikuje nepřítomnost protilátky nebo složky komplementu na erythrocytech.



Obrázek č. 8. Hodnocení reakcí sloupcové aglutinace; zdroj: Řízená dokumentace TRS NEMCB

7.4 Postup provedení

7.4.1 *Přímý antiglobulinový test s polyspecifickým AGH metodou sloupcové aglutinace*

- 1) Připravíme 0,8% suspenzi erytrocytů v ID Diluentu 2: napipetujeme 1,0 ml ID-Diluentu 2 do čisté zkumavky, přidáme 10 µl koncentrátu erytrocytů a jemně protřepeme.
- 2) Příslušnou mikrozkuhavku ID-karty LISS/Coombs označíme příjmením pacienta nebo číslem, které bylo pacientovi přiřazeno a které je zapsané na žádance i v laboratorní knize.
- 3) Z požadovaného počtu mikroskopavek ID-karty LISS/Coombs odstraníme aluminiovou fólii.
- 4) Do příslušné mikroskopavky napipetujeme 50 µl suspenze erytrocytů.
- 5) ID-kartu LISS/Coombs centrifugujeme v ID-centrifuze, počet otáček i doba centrifugace je nastavena výrobcem.
- 6) Odečteme a zapíšeme výsledek (Řízená dokumentace TRS NEMCB).

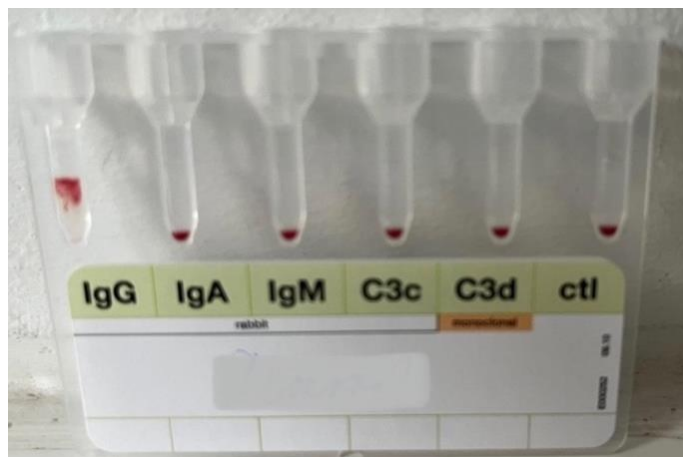


Obrázek č. 9. Výsledek vyšetření – PAT ++; zdroj: vlastní foto

7.4.2 *Upřesnění typu senzibilizace erytrocytů s monospecifickými AGH metodou sloupcové aglutinace*

- 1) Připravíme 0,8% suspenzi erytrocytů v ID-Diluentu 2: napipetujeme 1,0 ml ID-Diluentu 2 do čisté zkumavky a přidáme 10 µl koncentrátu erytrocytů. Jemně protřepeme. Erytrocyty by neměly být před přípravou suspenze promývány.
- 2) ID-kartu DC screening I (viz Obrázek č. 2) označíme příjmením pacienta nebo číslem, které bylo pacientovi přiřazeno, a které je zapsané na žádance i v laboratorní knize.
- 3) Z mikroskopavek ID-Karty DC screening I odstraníme aluminiovou fólii.

- 4) Do všech mikrozkušavek nepipetujeme 50 µl suspenze erytrocytů.
- 5) ID-Kartu DC screening I centrifugujeme v ID-Centrifuze počet otáček i doba centrifugace je nastavena výrobcem.
- 6) Odečteme a zapíšeme výsledek (Řízená dokumentace TRS NEMCB)



Obrázek č. 10. Výsledek vyšetření – PAT s IgG +++; zdroj: vlastní foto

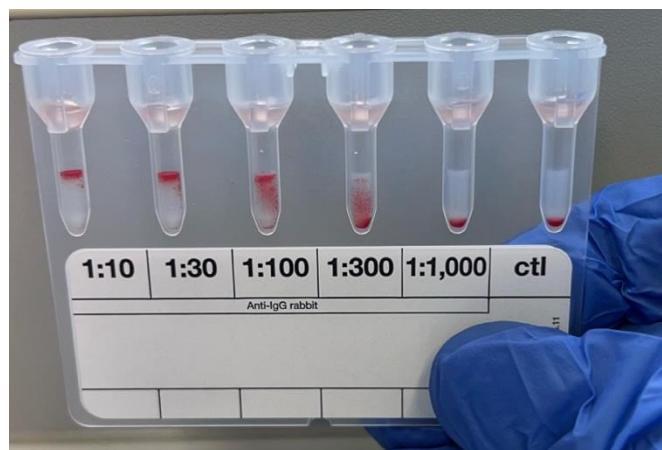
Hodnocení:

Negativní reakce: indikuje nepřítomnost detekovatelných protilátek nebo složek komplementu na erytrocytech.

Pozitivní reakce: indikuje senzibilizaci erytrocytů pacienta (Řízená dokumentace TRS NEMCB – PAT).

7.4.3 Stanovení titru IgG metodou sloupcové aglutinace

- 1) Před přípravou suspenze musí být erytrocyty 3x promyty v PBS. Poté připravíme 0,8% suspenzi erytrocytů v ID-Diluentu 2: napipetujeme 1,0 ml ID-Diluentu 2 do čisté zkumavky, přidáme 10 µl koncentráту erytrocytů a jemně protřepeme.
- 2) ID-kartu DAT IgG-Dilution označíme příjmením pacienta nebo číslem, které bylo pacientovi přiřazeno, a které je zapsané na žádance i v laboratorní knize.
- 3) Z mikrozkušavek ID-karty DAT IgG-Dilution odstraníme aluminiovou fólii.
- 4) Do všech mikrozkušavek odpipetujeme 50 µl suspenze erytrocytů.
- 5) ID-kartu DAT IgG-Dilution centrifugujeme v ID-Centrifuze, počet otáček i doba centrifugace je nastavena výrobcem.
- 6) Odečteme a zapíšeme výsledek (Řízená dokumentace TRS NEMCB).



Obrázek č. 11. Výsledek vyšetření – Stanovení titru IgG 1:300+; zdroj: vlastní foto

Zjišťuje se titr IgG protilátky a z toho vyplývající riziko vzniku hemolýzy. Pokud je výsledek pozitivní, aglutinované erythrocyty vytvářejí na povrchu gelu linku nebo jsou rozptýleny v gelu (Řízená dokumentace TRS NEMCB).

Tabulka č. 1 – Hodnocení reakcí reakcí IgG v ID-Kartě „DAT IgG-Dilution“

Ředění anti-IgG	1:10	1:30	1:100	1:300	1:1000	ctl
	++	±	-	-	-	-

Ředění anti-IgG	1:10	1:30	1:100	1:300	1:1000	ctl
	+++	+++	++	+	-	-

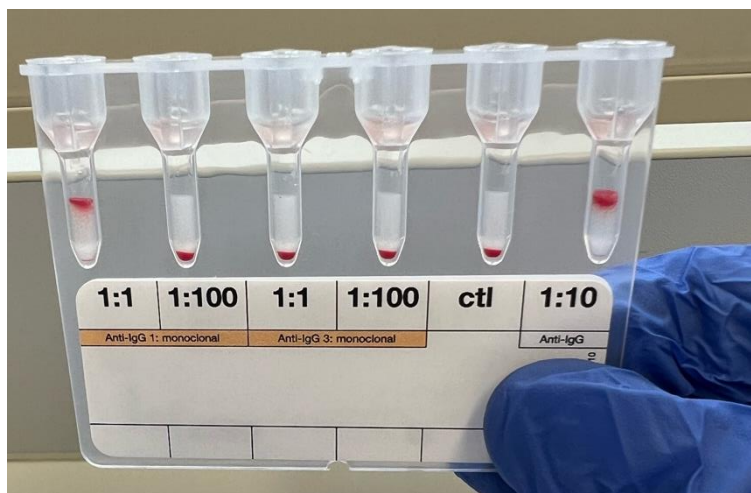
Zdroj: Příbalový leták BIO-RAD – Stanovení IgG

Titr Anti-IgG 1:30 v první tabulce není závažný a stanovení podtříd IgG není nutné. Titr Anti-IgG 1:300 ve druhé tabulce je klinicky závažný a představuje riziko hemolýzy; stanovení podtříd IgG je nezbytné (Příbalový leták DBIO-RAD).

7.4.4 Stanovení podtříd IgG metodou sloupcové aglutinace

- 1) Před přípravou suspenze musí být erythrocyty 3x promyty v PBS. Připravíme suspenzi erythrocytů v ID-Diluentu 2: napipetujeme 1,0 ml ID-Diluentu 2 do čisté zkumavky, přidáme 10 µl koncentráту erythrocytů a jemně protřepeme.
- 2) ID-kartu DAT IgG1/IgG3 označíme příjmením pacienta nebo číslem, které bylo pacientovi přiřazeno, a které je zapsané na žádance i v laboratorní knize.
- 3) Z mikrozkuvek ID-Karty DAT IgG1/IgG3 odstraníme aluminiovou fólii.

- 4) Do všech mikrozkušavek odpipetujeme 50 µl suspenze erytrocytů.
- 5) ID-kartu DAT IgG1/IgG3 centrifugujeme v ID-Centrifuze, počet otáček i doba centrifugace je nastavena výrobcem.
- 6) Odečteme a zapíšeme výsledek (Řízená dokumentace TRS NEMCB).



Obrázek č. 12. Výsledek vyšetření – Stanovení podtříd IgG1 titr 1:1; zdroj: vlastní foto

Tabulka č. 2 – Stanovení podtříd IgG

	IgG1		IgG3		ctl	IgG
	1:1	1:100	1:1	1:100		
Reakce interpretace	++	-	-	-	-	+++
	mírné riziko hemolýzy (podtřída IgG1, nízká koncentrace)					
Reakce interpretace	+++	++	-	-	-	+++
	vysoké riziko hemolýzy (podtřída IgG1, vysoká koncentrace)					
Reakce interpretace	+++	++	++	-	-	+++
	vysoké riziko hemolýzy (podtřída IgG1 vysoká koncentrace, IgG3 nízká koncentrace)					
Reakce interpretace	-	-	+++	++	-	+++
	vysoké riziko hemolýzy (podtřída IgG3, vysoká koncentrace)					
Reakce interpretace	-	-	++	-	-	+++
	mírné riziko hemolýzy (podtřída IgG3, nízká koncentrace)					
Reakce interpretace	++	-	+++	++	-	+++
	vysoké riziko hemolýzy (podtřída IgG1 nízká koncentrace, IgG3 vysoká koncentrace)					
Reakce interpretace	++	-	++	-	-	+++
	mírné riziko hemolýzy (podtřídí IgG1 a IgG3, nízká koncentrace)					
Reakce interpretace	+++	++	+++	++	-	+++
	vysoké riziko hemolýzy (podtřídí IgG1 a IgG3, vysoká koncentrace)					

Zdroj: Příbalový leták BIO-RAD – Stanovení podtříd IgG

7.4.5 Stanovení krevních skupin AB0/Rh

Ke stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti antigenů A/B na lidských erythrocytech jsou nutná diagnostická séra anti-A, anti-B a anti-AB. Zatímco u dospělých osob jsou antigeny A a B plně vyvinuty, u novorozenců můžeme pozorovat výskyt slabších reakcí a u podskupin se setkáváme s tím, že nemohou být identifikovány.

Sérum dospělých obsahuje přirozené protilátky proti antigenům A a B, které nejsou přítomny na jejich vlastních erythrocytech. Obě protilátky se objevují až po prvních 4 až 6 měsících života. Výsledkem toho je, že u novorozenců běžně neprovádíme vyšetření aglutinínů v séru nebo plazmě (Příbalový leták BIO-RAD – stanovení KS AB0/Rh).

Provedení konfirmačních testů je indikováno až je plně vyvinuta exprese antigenů A a B a plně vyvinuty izoaglutininy anti-A a anti-B (ve 2 až 4 letech života).

Antigen D, stejně jako slabé D, je již při narození plně vyvinut. Stanovení statutu RhD je při vyšetření KS novorozenců velmi důležité v případě, že je matka Rh negativní.

Provedení přímého Coombsova testu (PAT) je u novorozenců standardní postup, protože je důležité vědět, zda byly erythrocyty novorozence v děloze senzibilizovány protilátkami matky (Příbalový leták BIO-RAD – stanovení krevních skupin AB0/Rh).

Stanovení AB0 a RhD KS včetně PAT lze provádět s erythrocyty novorozenců na kartách ID-karty „DiaClon AB0/Rh for Newborns DVI-v“ využívající monoklonální reagenty a suspenzi vyšetřovaných erythrocytů v ID-Diluentu 2 (Příbalový leták BIO-RAD – stanovení krevních skupin AB0/Rh).



Obrázek č. 13. Výsledek vyšetření – Stanovení krevních skupin; zdroj: vlastní foto

7.4.6 Reagencie

ID-karta „DiaClon AB0/Rh for Newborns DVI-“ obsahuje v gelové matrix monoklonální anti-A, anti-B, anti-AB a anti-D. Mikrozkuhavka (ctl) je negativní kontrola.

Antihumánní globulinové sérum (AGH) je směsí králíčího anti-IgG a monoklonálního anti-C3d (Příbalový leták BIO-RAD – stanovení krevní skupiny AB0/Rh).

7.4.7 Vzorek

Krevní vzorky ose odebírají vhodnou technikou. K testování mohou být použity vzorky pupečnickové krve nebo vzorky krve, získané vpichem do patičky. Obvykle není nutné erythrocyty před testováním propírat. V případě použití vzorků z pupečnickové šňůry, je nutno zamezit kontaminaci Whartonovým rosolem.

Odběr krve by měl být přednostně proveden do citrátu, EDTA nebo CPD-A. Pro dosažení optimálních výsledků se provádí testování s čerstvě odebraným krevním vzorkem (Příbalový leták – stanovení krevní skupiny AB0/Rh).

7.4.8 Příprava krevního vzorku

Připraví se 0,8% suspenzi erythrocytů v ID-Diluentu 2 následujícím způsobem, kdy se Diluent vytemperuje na laboratorní teplotu. Poté se napipetuje 1 ml ID-Diluentu 2 do čisté zkumavky, přidá se 10 µl plné krve a jemně protřepe (Příbalový leták BIO-RAD – stanovení krevní skupiny AB0/Rh).

7.4.9 Provedení testu

Připravíme si ID-Kartu, která se následně označuje jménem nebo číslem pacienta a poté se odstraní aluminiová folie. Dále se napipetuje 50 µl suspenze erythrocytů do všech 6 mikrozkuhovek ID-Karty. ID-Karta se centrifuguje v ID-Centrifuze 10 minut a jako poslední se odečte a zaznamenají výsledky (Příbalový leták BIO-RAD – stanovení krevní skupiny AB0/Rh).

7.4.10 Interpretace výsledků

a) Princip

Pozitivní: aglutinované erythrocyty vytvářejí na povrchu gelu červenou linku, nebo jsou v gelu rozptýleny.

Negativní: kompaktní sediment erythrocytů na dně zkumavky (Příbalový leták BIO-RAD – stanovení krevní skupiny AB0/Rh).

b) Hodnocení reakcí AB0 krevních skupin

Tabulka č. 3 – Hodnocení reakcí AB0 krevních skupin

Diagnostikum			
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Krevní skupina
+ až +++++	negativní	+ až +++++	A
negativní	+ až +++++	+ až +++++	B
+ až +++++	+ až +++++	+ až +++++	AB
negativní	negativní	negativní	0

Zdroj: Řízená dokumentace NCB_TRS

V případě výskytu slabé nebo velmi slabé exprese antigenů mohou být reakce negativní. Monoklonální anti-B nereaguje se získaným B antigenem. Mikrozkumavky ctl musí vykazovat negativní reakci. Je-li ctl pozitivní, pak určení AB0 není platné (Příbalový leták BIO-RAD – stanovení krevní skupiny AB0/Rh).

c) Hodnocení reakcí RhD

Tabulka č. 4 – Hodnocení reakcí RhD

+++ až +++++	± až ++*	negativní
RhD pozitivní	RhD pozitivní	RhD negativní

Zdroj: Řízená dokumentace NCB_TRS

* ± stopové nebo slabé reakce by měly být podrobeny dalšímu vyšetření za účelem rozlišení mezi slabými D a parciálními typy antigenu D přiměřeně tomu, o jaký testovaný vzorek se jedná (Příbalový leták BIO-RAD – stanovení krevní skupiny AB0/Rh).

Použitá anti-D séra jsou vybrána tak, aby nereagovala s fenotypem DVI. Pokud je požadována detekce všech slabých/parciálních D, musí být všechny vzorky s negativními reakcemi opakovaně testovány. Mikrozkumavka ctl musí vykazovat negativní reakci. Je-li ctl pozitivní, pak určení RhD není platné.

d) Hodnocení přímého antiglobulinového testu (PAT)

Negativní reakce indikuje absenci detekovatelných protilátek na erytrocytech novorozenců.

Pozitivní reakce (± až +++++) indikuje, že erytrocyty novorozenců jsou senzibilizovány (potaženy) mateřskými protilátkami.

8 Výsledky

Výsledky jsou vyhotoveny za období od 1. 1. 2022 do 31. 12. 2022. Jedná se o výsledky z laboratoře TRS NEMCB, která je vyšším pracovištěm pro hematologicko-transfuzní oddělení Písek, Jindřichův Hradec, Pelhřimov a pro krevní sklady Tábor, Český Krumlov, Prachatice, Strakonice.

8.1 Přímý antiglobulinový test (PAT)

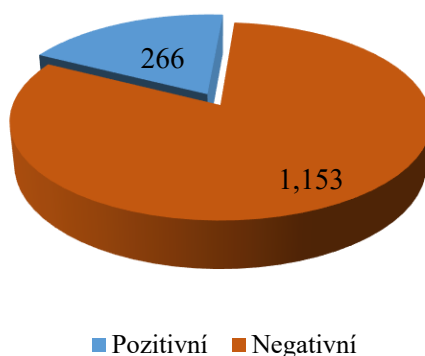
Za sledované období byl PAT vyšetřen u 1 419 vzorků, z toho byl PAT pozitivní u 266 vzorků a negativní u 1 153. Pozitivní PAT byl zjištěn u 201 pacientů, 60 novorozenců a u 5 dárců krve, u kterých bylo zjištěno na základě pozitivního testu kompatibility v rámci předtransfuzního vyšetření, i když screening protilátek byl negativní. Za sledované období byl PAT také vyšetřen u 17 pacientů, kteří byli vyšetřováni pro lehkou potransfuzní reakci, kde PAT byl negativní.

Tabulka č. 5 – Počet pozitivních a negativních PAT za sledované období

Název	Počet	%
Pozitivní	266	18,7
Negativní	1 153	81,3
Celkem	1 419	100

Zdroj: vlastní výzkum

Počet pozitivních a negativních PAT za sledované období



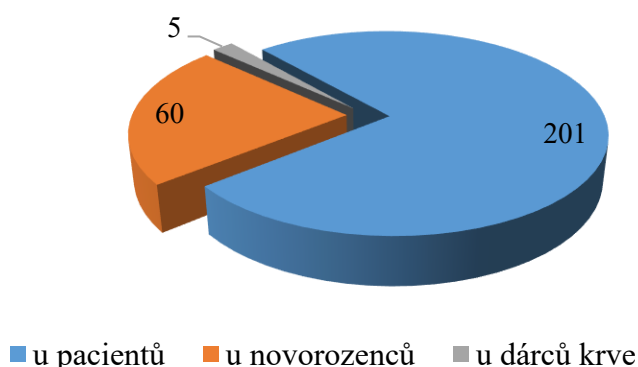
Obrázek č. 14. Graf počtu pozitivních a negativních PAT za sledované období; zdroj: vlastní výzkum

Tabulka č. 6 – Počet pozitivního PAT u pacientů, novorozenců a dárců za sledované období

Pozitivní PAT	počet	%
u pacientů	201	75,6
u novorozenců	60	22,6
u dárců krve	5	1,9

Zdroj: vlastní výzkum

Počet pozitivních a negativních PAT za sledované období



Obrázek č. 15. Graf počtu pozitivního PAT u pacientů, novorozenců a dárců za sledované období

8.2 Upřesnění senzibilizace erytrocytů u pacientů

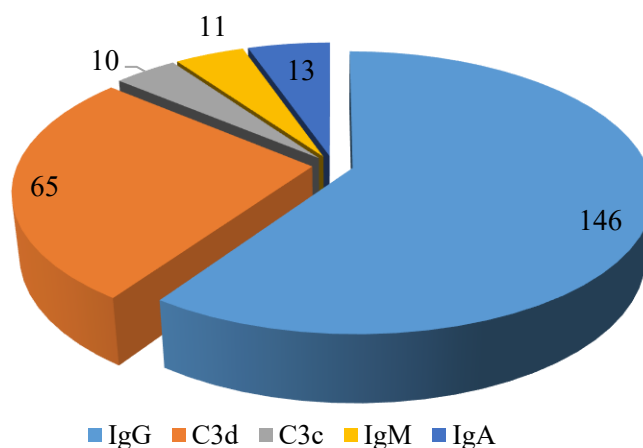
U 201 pacientů bylo provedeno upřesnění typu senzibilizace erytrocytů. Nejčastěji byly erytrocyty pacientů senzibilizovány protilátkou třídy IgG (60 %), u 65 pacientů navíc v kombinaci s přítomností složek komplementu C3c nebo C3d. Samostatná přítomnost složek komplementu byla zjištěna pouze 1 pacienta. U 13 pacientů byly erytrocyty senzibilizovány i protilátkami třídy IgA (5 %), a to vždy v kombinaci s protilátkami jiné třídy imunoglobulinů a/nebo v kombinaci se složkami komplementu. Samostatná senzibilizace protilátkami IgA nebyla u sledovaného souboru pacientů zjištěna. U 11 pacientů byly erytrocyty senzibilizovány i protilátkami třídy IgM (4 %), a to vždy v kombinaci s protilátkami jiné třídy imunoglobulinů a/nebo v kombinaci se složkami komplementu. Samostatná senzibilizace protilátkami IgM nebyla u sledovaného souboru pacientů zjištěna.

Tabulka č. 7 – Zastoupení jednotlivých tříd Ig a složek komplementu u pozitivních PAT za sledované období

Třída	počet	%
IgG	146	60
C3d	65	27
C3c	10	4
IgM	11	4
IgA	13	5

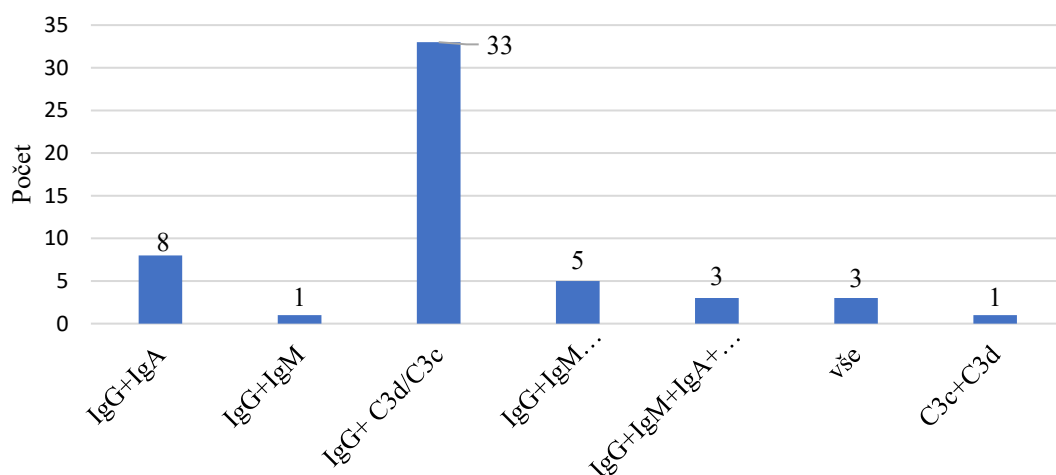
Zdroj: vlastní výzkum

Zastoupení jednotlivých tříd Ig a složek komplementu u pozitivních PAT za sledované období



Obrázek č. 16. Graf počtu zastoupení jednotlivých tříd Ig a složek komplementu u pozitivních PAT za sledované období; zdroj: vlastní výzkum

Kombinace zastoupení jednotlivých tříd Ig a složek komplementu u pozitivních PAT za sledované období



Obrázek č. 17. Graf kombinací zastoupení jednotlivých tříd Ig a složek komplementu u pozitivních PAT za sledované období; zdroj: vlastní výzkum

8.3 Vyšetření titru IgG u pacientů

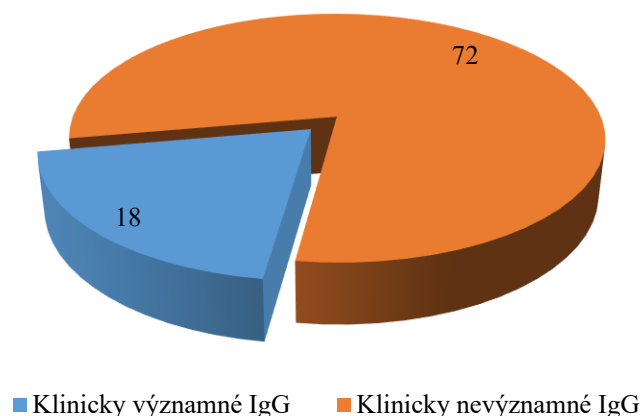
Titř IgG byl vyšetřen u 90 pacientů s pozitivním PAT a prokázanou senzibilizací protilátkami třídy IgG. Klinicky závažný titř 1:300 protilátky třídy IgG byl prokázán u 20 % pacientů z tohoto souboru. U 80 % pacientů byl titř IgG klinicky nezávažný.

Tabulka č. 8 – Vyšetření titru IgG u pozitivních PAT za sledované období

IgG	Počet	%
Klinicky významné IgG	18	20
Klinicky nevýznamné IgG	72	80

Zdroj: vlastní výzkum

Vyšetření titru IgG u pozitivních PAT za sledované období



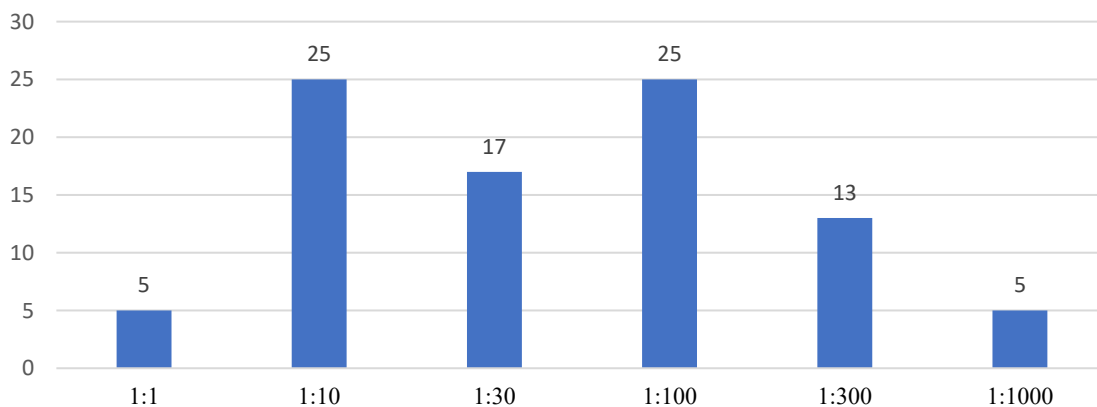
Obrázek č. 18. Graf vyšetření titru IgG u pozitivních PAT za sledované období; zdroj: vlastní výzkum

Tabulka č. 9 – Jednotlivé titry IgG a jejich zastoupení ve sledovaném souboru za sledované období

Celkový počet IgG	Počet vyšetřených IgG	Titř					
		1:1	1:10	1:30	1:100	1:300	1:1000
146	90	5	25	17	25	13	5

Zdroj: vlastní výzkum

Jednotlivé titry IgG a jejich zastoupení ve sledovaném souboru za sledované období



Obrázek č. 19. Graf jednotlivých titřů IgG a jejich zastoupení ve sledovaném souboru za sledované období; zdroj: vlastní výzkum

8.4 Stanovení rizika hemolýzy erytrocytů

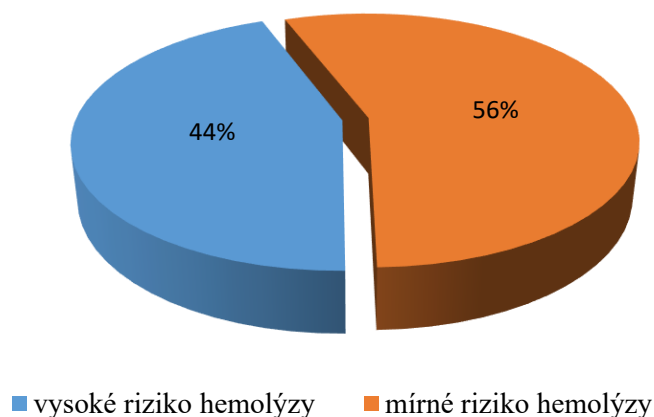
U 27 pacientů bylo provedeno stanovení titru podtříd IgG1, IgG3. Vysoké riziko hemolýzy bylo prokázáno u 12 pacientů (tzn. ve 44 % provedených vystřehí), nízké riziko hemolýzy bylo prokázáno u 15 pacientů (tzn. ve 56 % provedených vystřehí).

Tabulka č. 10 – Stanovení podskupin IgG1, IgG3 a interpretace výsledku za sledované období

Př. č.	titr IgG 1:10	IgG1		IgG3		Interpretace
		1:1	1:100	1:1	1:100	
1	+++	+++	++	neg	neg	vysoké riziko hemolýzy
2	+++	++	+	neg	neg	vysoké riziko hemolýzy
3	±	±	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
4	+++	+	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
5	+++	+++	++	neg	neg	vysoké riziko hemolýzy
6	+++	++	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
7	+++	+	neg	++	+	vysoké riziko hemolýzy
8	+++	+++	neg	++	+	vysoké riziko hemolýzy
9	+++	+	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
10	++	++	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
11	+++	+++	+++	neg	neg	vysoké riziko hemolýzy
12	+++	+++	+++	neg	neg	vysoké riziko hemolýzy
13	+++	++	+	neg	neg	vysoké riziko hemolýzy
14	+++	±	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
15	+++	+++	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
16	+++	+++	+++	neg	neg	vysoké riziko hemolýzy
17	+++	+++	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
18	+++	+++	++	neg	neg	vysoké riziko hemolýzy
19	+++	+++	++	neg	neg	vysoké riziko hemolýzy
20	+++	+++	+	neg	neg	vysoké riziko hemolýzy
21	+++	+++	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
22	+++	+++	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
23	+++	+++	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
24	+++	+	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
25	+++	++	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
26	+++	+++	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy
27	+++	+++	neg	neg	neg	mírné riziko hemolýzy

Zdroj: vlastní zdroj

Stanovení podtříd IgG1, IgG3 a interpretace výsledku za sledované období



Obrázek č. 20. Graf stanovení podskupin IgG1, IgG3 a interpretace výsledku za sledované období; zdroj: vlastní výzkum

8.5 Přímý antiglobulinový test u novorozenců

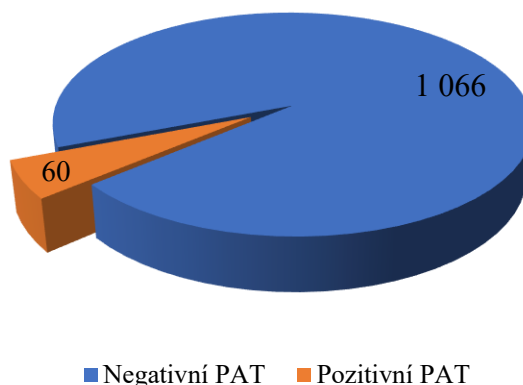
Za sledované období byl PAT proveden u 1 126 vzorků novorozenců. U 1 066 novorozenců byl PAT negativní, u 60 novorozenců byl PAT pozitivní.

Tabulka č. 11 – Počet pozitivních a negativních vyšetření PAT u novorozenců za sledované období

Negativní PAT	Pozitivní PAT	Celkem
1 066	60	1 126

Zdroj: vlastní výzkum

Počet pozitivních a negativních vyšetření PAT u novorozenců za sledované období



Obrázek č. 21. Graf pozitivních a negativních vyšetření PAT u novorozenců za sledované období; zdroj: vlastní výzkum

8.6 Vyšetření antierytrocytárních protilátek u novorozenců

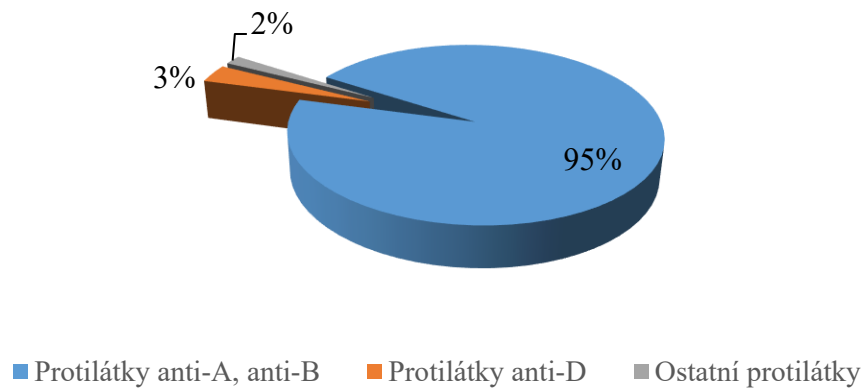
U 57 novorozenců byly zjištěny pozitivní inkompletní protilátky anti-A, anti-B, u 2 novorozenců byla zjištěna protilátka anti-D, kdy bylo ověřeno, že se nejedná o kontaminaci po podání imunoprofylaxe matce a 1 protilátka anti-s. U 95 % vyšetřovaných vzorků byly prokázány protilátky, které mohou způsobit AB0 HON. U 3 % vzorků byla u novorozenců prokázána protilátka, která může způsobit RhD HON. A v jednom případě se vyskytla protilátka anti-s, jejíž vliv na rozvoj HON je potřeba zvažovat individuálně.

Tabulka č. 12 – Zjištěné antierytrocytární protilátky u novorozenců s pozitivním PAT za sledované období

Protilátky u novorozenců s pozitivním PAT za rok 2022	Počet	%
Protilátky anti-A; anti-B	57	95
Protilátky anti-D	2	3
Ostatní protilátky (anti-s)	1	2
Celkem	60	100

Zdroj: vlastní výzkum

Procentuální zastoupení protilátek proti jednotlivým antigenním systémům



Obrázek č. 22. Graf procentuálního zastoupení protilátek proti jednotlivým antigenním systémům; zdroj: vlastní výzkum

9 Diskuze

V bakalářské práci jsem se zabývala přímým antiglobulinovým testem, který se provádí na TRS NEMCB u pacientů s autoimunitou proti erytrocytům, u hemolytického onemocnění novorozenců, u potransfuzních reakcí, u pozitivní autokontroly při identifikaci protilátek, u negativního screeningu protilátek a zároveň pozitivního testu kompatibility v rámci předtransfuzního vyšetření. Vyšetření se nejčastěji provádí pomocí sloupcové aglutinace.

Od 1. 1 - 31. 12. 2022 jsem shromáždila veškeré reakce u PAT, které se na TRS NEMCB vyšetřovaly. Nejdříve jsem všechny vzorky rozdělila podle výsledku vyšetření na pozitivní a negativní bez ohledu na to, o jakou indikaci šlo. Potvrdila jsem si, že screeningový PAT s polyspecifickým AGH je na denním programu imunohematologické laboratoře.

Další vyšetření vzorků s pozitivním PAT se odvíjelo od diagnózy pacienta, od požadavku klinika, od dalších laboratorních testů apod. Klinický význam má ve většině případů smysl stanovovat při $PAT \geq 2+$.

U AIHA jsou erytrocyty senzibilizovány autoprotiilátkami a/nebo složkami komplementu. Úkolem imunohematologické laboratoře je zjistit typ senzibilizujících autoprotiilátek a pro klinika určit typ AIHA, zda se jedná o tepelnou, chladovou nebo smíšenou AIHA, a stanovit riziko hemolýzy způsobené autoprotiilátkami. S polékovou AIHA vzhledem k obtížnému průkazu se na TRS NEMCB prakticky nepracuje. Paroxysmální chladová hemoglobinurie se vyskytuje velmi zřídka

U hemolytické anémie z imunitní příčiny mají postižené erytrocyty po navázání protilátky kratší dobu přežívání než obvyklých 120 dní. O hemolýze a jejím průběhu rozhoduje řada faktorů. Záleží jednak na vlastnostech protilátek (třída, podtřída, koncentrace, specifita), dále na expresi autoantigenů (jak hustě jsou na membráně zastoupeny), a konečně na individuálních vlastnostech makrofágů (Písačka, 2012). AIHA způsobují autoprotiilátky tříd IgG, IgM a vzácně IgA. Nejvíce zastoupená ze tříd imunoglobulinů se ukázala třída IgG, která způsobuje nejčastěji pozitivitu PAT. Nejvíce zprostředkována autoprotiilátkami, obvykle typu IgG je tepelná autoimunitní hemolytická anémie, která představuje až 70 % AIHA. Chladové protilátky, resp. chladové aglutininy (CA), jsou příčinou hemolýzy u cca 10 % AIHA, kdy se jedná o hemolýzu způsobenou převážně IgM autoprotiilátkami. Paroxysmální chladová hemoglobinurie je způsobená bifazickou autoprotiilátkou IgG zvanou Donath-Landsteinerova protilátka. Dříve byla

často spojována s infekcí syfilis, ale nyní se jedná o vzácný, přechodný stav, který postihuje téměř výhradně děti s virovou infekcí (Marina et al., 2023). Léky indukovaná imunitní hemolytická anémie je vzácný stav, který vzniká především v důsledku léky indukovaných protilátek, které se navazují na erytrocyty a jsou příčinou pozitivního PAT. Již je dokumentováno cca 100 různých léků, které mohou polékovou AIHA způsobit.

Dle Písačky (2012) je tepelná AIHA způsobena autoprotiilátkami třídy IgG a PAT je nejčastěji pozitivní s anti-IgG nebo s anti-IgG+C3d, chladová AIHA autoprotiilátkami třídy IgM a PAT je pozitivní s anti-C3d, U smíšené AIHA nacházíme autoprotiilátky tepelné i chladové a pozitivní PAT s IgG+C3d+IgA/IgM. Pro paroxysmální chladovou hemoglobinurii je typický pozitivní PAT s anti-C3d, u polékové AIHA je PAT pozitivní dle mechanismu účinku protilátek s anti-IgG, anti-C3d nebo anti-IgG+C3d.

PAT u novorozenců se na TRS NEMCB vyšetřuje zároveň s vyšetřením krevní skupiny novorozence. K tomu se používá a je přizpůsobená tzv. karta pro novorozence. V NEMCB je zvykem posílat k vyšetření vzorky novorozenců matek krevní skupiny 0, matek RhD negativních a matek s klinicky významnými antierytrocytárními protilátkami. Jedná se o novorozence, kteří mohou být v riziku AB0 HON, RhD HON a ostatní HON. Samozřejmě se vyšetřují vzorky všech novorozenců s klinickými známkami HON. Doporučení společnosti nedoporučuje rutinní vyšetřování všech novorozenců, ani u matek s krevní skupinou 0. AB0 inkompabilita by neměla znamenat přísnější sledování, protože u všech novorozenců by se měl zjišťovat a následně monitorovat ikterus. Vyšetření novorozence RhD negativních matek se provádí k určení žen, které jsou vhodné pro RhD profylaxi.

U novorozenců jsem vzorky rozdělila měsíčně také na negativní a pozitivní ve sledovaném období a dále jsem zkoumala pouze zjištěné protilátky navázané na erytrocyty s pozitivním PAT. Nejvíce zjištěných antierytrocytárních protilátek u novorozenců bylo v systému AB0 (95 %). Inkompabilita mezi matkou a plodem v systému AB0 byla častější než RhD inkompabilita, k čemuž dospěl i Mollison, Engelfriet, Contreras (© 1997).

Ve sledovaném období se nezachytila žádná aloprotilátka anti-D, což je překvapující. Protože i přes zavedení anti-D profylaxe představuje RhD aloimunizace problém i v současnosti. RhD aloimunizace je v současnosti jediná erytrocytární aloimunizace, které lze zabránit podáním anti-D imunoglobulinu při všech potencionálně senzibilizujících událostech (Holusková, Lubušský et al., © 2013). V těhotenství anti-D imunoglobulin je podáván RhD negativním ženám paušálně, po porodu ještě jednou RhD

negativním ženám, které porodí RhD pozitivní dítě. Skutečná RhD aloimunizace u těhotných žen není ve většině zemí známa. Z ostatních protilátek senzibilizujících erythrocyty novorozence byla zachycena aloprotilátka anti-s. Jedná se o protilátku, která se vyskytuje velmi vzácně, ale může způsobit i těžké hemolytické onemocnění novorozence.

Potransfuzní reakce je označována jako závažná nežádoucí reakce příjemce v průběhu transfuze nebo po transfuzi, která souvisí s podáním transfuzního přípravku (Jílková 2009). Od první transfuze lidské krve uběhla již celá staletí, a i přes neustále se zlepšující diagnostické a technologické postupy při zpracování krve a výrobě transfuzních přípravků je hemoterapie spojena s určitou mírou rizika potenciálních komplikací – transfuzních reakcí (Galuszková 2007). Akutní nežádoucí komplikace transfuze se vyskytují nejdéle do 24 hodin po aplikaci transfuze a pozdní reakce se vyskytují od 24 hodin do několika dnů či týdnů po aplikaci (Řeháček et al., 2013). Dle Jílkové (2009) je cílem vyšetření potransfuzní reakce odhalit záměnu vzorku, nesprávnost dokumentace, nesprávný laboratorní postup, chyby při výrobě transfuzního přípravku, dokumentovat sekundární imunitní odpověď pacienta, a podle zjištěných neshod navrhnout opatření k prevenci další nežádoucí reakce.

Za sledované období bylo hlášeno z klinických oddělení 17 potransfuzních reakcí po podání transfuzního přípravku. U všech reakcí byl vyšetřen PAT ve vzorku po transfuzi s negativním výsledkem. U žádné potransfuzní reakce se nepotvrdila imunitní příčina. Ostatní příčiny potransfuzních reakcí nejsou předmětem této práce.

U 5 dárců krve byl zjištěn pozitivní PAT, a to na základě pozitivního testu kompatibility v rámci předtransfuzního vyšetření, když screening protilátek byl negativní. Tato skutečnost koresponduje s informacemi uváděnými v odborné literatuře. Z neznámých příčin má 0,01 % dárců krve PAT pozitivní bez zkráceného přežívání erythrocytů, klinický význam tohoto zjištění je nejasný a v tomto případě nemá pozitivní PAT diagnostický význam (Masopust, Písačka, 2016).

Dříve se PAT provádělo zkumavkovou metodou, dnes už se tato metoda používá ojediněle. Vyšetřuje se nejčastěji sloupcovou aglutinací a také pevnou fází, které jsou daleko citlivější metody. Zkumavkový test má dle Masopusta (2012) mez citlivosti cca 200-250 molekul IgG/C3d na erythrocyt, citlivější sloupcová aglutinace 100-150 molekul IgG/C3d na erythrocyt.

10 Závěr

V bakalářské práci na téma „Přímý antiglobulinový test v imunohematologické laboratoři“ byly stanoveny 2 cíle a 2 hypotézy.

Prvním cílem bylo zpracovat problematiku PAT, podat ucelený přehled využití PAT v imunohematologické laboratoři. Test se provádí v imunohematologické laboratoři v rámci vyšetření AIHA, HON, potransfuzních reakcí. K PAT se nejvíce v imunohematologické laboratoři přistupuje při „podezřelých či nestandardních laboratorních nálezech“, jako je pozitivní autokontrola, při identifikaci protilátek, pozitivní Rh kontrola, u negativního screeningu protilátek a pozitivního testu kompatibility, kdy se vyšetřují erythrocyty transfuzního přípravku apod.

Mým druhým cílem bylo osvojení si vlastního vyšetření PAT, a hlavně stanovení klinické významnosti tohoto testu. K provedení přímého antiglobulinového testu (PAT) jsou zapotřebí pouze pacientovy červené krvinky, ke kterým se pak přidá protilátka proti lidským imunoglobulinům – antiglobulinové sérum. Pokud jsou na erythrocytech navázány imunoglobuliny, dojde v důsledku navázání námi podané protilátky na tyto imunoglobuliny nebo složky komplementu k aglutinaci erythrocytů. Aglutinace indikuje pozitivní výsledek, což znamená, že na pacientových krvinkách jsou přítomny navázané protilátky nebo složky komplementu, které je mohou potenciálně poškodit. V případě, kdy je reakce s anti-IgG $\geq 2+$ se určuje klinická významnost PAT.

Vyšetřovaným souborem vzorků s pozitivním PAT se potvrdila hypotéza, že pozitivní PAT je nejčastěji prokázán u pacientů s autoimunitou proti erythrocytům. Z vyšetřovaných pozitivních 266 vzorků jich bylo 201 pozitivních právě u pacientů s autoimunitou proti erythrocytům. V současné době jsou autoimunity na vzestupu.

Potvrdila se i druhá hypotéza, že pozitivní PAT je nejčastěji způsoben protilátkami třídy IgG. Z vyšetřovaných 201 pozitivních vzorků u pacientů bylo 146 vzorků způsobeno protilátkami třídy IgG. Nejčastějším typem AIHA je tepelná autoimunitní hemolytická anémie, její příčinou jsou autoprotilátky třídy IgG. Hemolytické onemocnění novorozence mohou způsobit pouze protilátky třídy IgG, protože mohou procházet placentou. S paroxysmální chladovou hemoglobinurií jsem se v rámci bakalářské práce neseťkala.

Pozitivní PAT je nutné posuzovat společně s klinickým obrazem a dalšími laboratorními parametry, jako je např. hematokrit, hemoglobin, hladina imunoglobulinů. Ojedinele se může stát, že zdraví jedinci mohou také vykazovat PAT pozitivitu.

11 Seznam literatury

- 1) AJMANI, P. S., 2020. *Immunohematology and Blood Banking: Principles and Practice*. Springer Nature Singapore. 208 p. ISBN 978-981-15-8434-3.
- 2) BARTŮŇKOVÁ, J a PAULÍK, M., a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2011. 172 s. ISBN 978-80-247-3533-7.
- 3) BINDER, T., a kol. *Porodnictví*. Karolinum, 2015. 978-80-246-1907-1.
- 4) BLANEY, K. D., HOWARD, P. R., 2013. *Basic & Applied Concepts of Blood Banking and Transfusion Practices*. 3. issue. United States: Elsevier. 408 p. ISBN 978-0-323-08663-9.
- 5) ČERMÁK, J., PÍSAČKA, M., 2018. *Autoimunitní hemolytická anémie* 64(5), 514-519. DOI: 10.36290/vnl.2018.072.
- 6) Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP. č. STL_2010_06 ze dne 1. 3. 2012 verze 3 (2010_06). *Imunohematologická vyšetření v těhotenství a po porodu [online]*. Copyright ©2022 [cit. 2022-11-26].
Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporucene-postupy#file-accordion-doporucene-postupy-stl>
- 7) Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL_07, verze 4 (2019_09). *Základní Imunohematologická laboratorní vyšetření červené řady – Obecné zásady a technické postupy*. Společnost pro transfuzní lékařství [online]. Copyright ©2022 [cit. 2022-11-26]
Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporuceni-stl/doporuceni-stl-c-7-zakladni-imunohematologicka-laboratorni-vysetreni-cervene-rada-obecne-zasady-a-technicke-postupy-12230>.
- 8) Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČSL JEP č. STL2019_14 ze dne 1. 5. 2019, verze 1. *Doporučený postup při řešení a vyšetřování potransfuzních reakcí [online]*. Copyright ©2022 [cit. 2022-12-05].
Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporuceni-stl/doporuceni-stl-c->

14-doporuceny-postup-pri-reseni-a-vysetreni-potransfuznich-reakci-priloha-zprava-o-nezadouci-reakci-na-transfuzi-12223.

- 9) ENGELFRIET, C. P.; MELUENBROEK, A. J. et al. *Imunohematologie*. Přel. Vugts S, Vaňák J; Amsterdam: Sanquin Reagens, 2003. 142 s. ISBN 90-5267-029-3.
- 10) FÁBRYOVÁ, V. *Imunohematológia a transfúzna medicína pre prax*. Praha: Grada, 2012. 232 s. ISBN 9788024743912.
- 11) GALUSZKOVÁ, D., 2007. Rizika krevních transfuzí. *Interní medicína pro praxi*. 9(11), 495-498. ISSN 1212-7299.
- 12) HOLUSKOVÁ, I., LUBUŠKÝ, M. et al. 2013. *Erythrocyte alloimmunization in pregnant women, clinical importance and laboratory diagnostics*. (78 (1), 89-99. PMID: 23607389.
- 13) HOŘEJŠÍ, V, BARTUŇKOVÁ J, BRDIČKA, T a ŠPÍŠEK, R. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. 297 s. ISBN 978-80-7553-250-3.
- 14) JÍLKOVÁ, H. *Transfuzní lékařství*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2009. ISBN 978-80-7395-151-1.
- 15) KOSTROUCHOVÁ, H., TYLEČKOVÁ, J., GERYCHOVÁ, R., *Transfúze Hematol. dnes*, 28, 2022, No. 4, p. 221-225 [online]. [cit. 2023-2-16]. DOI: 10.48095/cctahd2022prolekare.cz13.
- 16) MARINA, M.A., RUBIO, M.L., GARCÍA, L.C., 2023. Autoimmune haemolytic anemia. *Medicina Clínica*. 5 January 2023 (Volume 16, 1), 30-38. DOI: 10.1016/j.medcle.2022.07.020
- 17) MASOPUST, J., PÍSAČKA, M. *Praktická imunohematologie: erytrocyty*. Praha: Mladá fronta, 2016. Edice Postgraduální medicíny. 392 s. ISBN 978-80-204-3740-2.
- 18) MASOPUST, J., PÍSAČKA, M. *Praktická imunohematologie: erytrocyty*. 2., přepracované vydání. Praha: Grada, 2022. Edice Postgraduální medicíny. 448 s. ISBN 978-80-271-3377-2.

- 19) MOLLISON, P.L., ENGELFRIET, C.P., CONTRERAS, M., 1997. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 10 th edition. Blackwell Science, (754pp). DOI: 10.1046/j.1365-2044.1999.01037.x
- 20) PENKA, M., TESAŘOVÁ, E., a kol. *Hematologie a transfuzní lékařství II: Transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada, 2012. 192 s. ISBN 978-80-247-3460-6.
- 21) PENKA, M., Buliková, A., a kol. *Neonkologická hematologie*. 2. doplněné a zcela přepracované vydání. Praha: Grada, 2009. 240 s. ISBN 978-80-247-2299-3.
- 22) PEŠLOVÁ, Y., 2017. *Předtransfuzní vyšetření a aplikace transfuzních přípravků ve FN Motol*. Praha. Bakalářská práce ČVUT Fakulta biomedicínského inženýrství.
- 23) PINCOCK, S., *Robert Royston Amos (Robin) Coombs*[online]. APRIL 15, 2006 [cit. 2023-2-16]. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68528-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68528-0).
- 24) PÍSAČKA, M., 2012. *Imunohematologické aspekty autoimunitní hemolytické anémie (patologické mechanismy, laboratorní nálezy)*.
Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanky/imunohematologicke-aspekty-autoimunitni-hemolyticke-anemie-patogeneticke-mechanismy-laboratorni-nalezyl/>.
- 25) Příbalový leták BIO-RAD – DC-Screening II. *Přímý antiglobulinový test*.
Dostupné z: https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/B004831_50560_07.15_CZ.pdf
- 26) Příbalový leták BIO-RAD – DAT IgG-Dilution. *Stanovení IgG*. Dostupné z: https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/B004033_50870_08.13_CZ.pdf.
- 27) Příbalový leták BIO-RAD – DAT IgG1/IgG3 *Stanovení podtříd IgG*.
Dostupné z: <https://downloads.bio-rad.com/CDX/CZ/ALL?keycode=biorad0000934>
- 28) Příbalový leták BIO-RAD – *Stanovení krevních skupin AB0/Rh a přímý antiglobulinový test – pro novorozence*. Dostupné z: https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/B001017_50061_06.13_CZ.pdf

- 29) ROJKOVÁ, R., 2013. *Stanovení krevní skupiny AB0 a antigenu D, porovnání aglutinačních metod*. Brno. Bakalářská práce LF MU.
- 30) ŘEHÁČEK, V., MASOPUST, J., a kol. *Transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada, 2013. 240 s. ISBN 978-80-247-4534-3.
- 31) Řízená dokumentace TRS NEMCB
- 32) SCHECKEL DO, C.J., GO MD, R.S., 2022. *Autoimmune Hemolytic Anemia: Diagnosis and Differential Diagnosis*. *Hematology/Oncology* 36(2), 315-324. DOI: doi.org/10.1016/j.hoc.2021.12.001.
- 33) Společnost pro transfuzní lékařství: *Dárci krve*. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/darci-krve>.
- 34) WANG, S.-S., ZHANG, H., QU, L., ZHAO, Z., LI, L., 2021. *A renewed understanding of anti-human globulin reagents: interference constraints using an optimization method in pretransfusion compatibility tests*: *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 35(3). DOI: doi.org/10.1002/jcla.23695.
- 35) QUINLEY, E.D., 2020. *Immunohematology: Principles and Practice*. 3. ilustrované vydání. Jones & Bartlett Learning, 412 s. ISBN 9781284221374.
- 36) Žádanka o imunohepatologické vyšetření a o transfuzní přípravky. *Nemocnice České Budějovice, a. s.* [online]. Copyright ©2023 [cit. 2023-03-20] Dostupné z: https://www.nemcb.cz/upload/files/_adanka_2019.pdf

12 Seznam příloh a obrázků

Seznam obrázků:

Obrázek 1 – Příklad exogenního antigenu

Obrázek 2 – Struktura imunoglobulinu

Obrázek 3 – Kompletní a inkompletní protilátka

Obrázek 4 – Reakce antigenu s protilátkou

Obrázek 5 – Zeta potenciál

Obrázek 6 – Princip antiglobulinových testů; PAT, NAT

Obrázek 7 – Hemolytické onemocnění novorozence

Obrázek 8 – Hodnocení reakcí sloupcové aglutinace

Obrázek 9 – Výsledek vyšetření – PAT++

Obrázek 10 – Výsledek vyšetření –PAT s IgG+++

Obrázek 11 – Výsledek vyšetření – Stanovení titru IgG 1:300+

Obrázek 12 – Výsledek vyšetření – Stanovení podtříd IgG: IgG1 titr 1:1

Obrázek 13 – Výsledek vyšetření – Stanovení krevních skupin

Obrázek 14 – Graf počtu pozitivních a negativních PAT za sledované období

Obrázek 15 – Graf počtu pozitivního PAT u pacientů, novorozenců a dárců krve za sledované období

Obrázek 16 – Graf počtu zastoupení jednotlivých tříd Ig a složek komplementu u pozitivních PAT za sledované období

Obrázek 17 – Graf kombinací zastoupení jednotlivých tříd Ig a složek komplementu u pozitivních PAT za sledované období

Obrázek 18 – Graf vyšetření titru IgG u pozitivních PAT za sledované období

Obrázek 19 – Graf jednotlivých titrů IgG a jejich zastoupení ve sledovaném souboru za sledované období

Obrázek 20 – Graf stanovení podskupin IgG1, IgG3 a interpretace výsledku ve sledovaném období

Obrázek 21 – Graf pozitivních a negativních vyšetření PAT u novorozenců za sledované období

Obrázek 22 – Graf procentuálního zastoupení protilátek proti jednotlivým antigenním systémům

Seznam tabulek:

Tabulka 1 – Hodnocení reakcí IgG v ID-Kartě „DAT IgG-Dilution“

Tabulka 2 – Stanovení podtříd IgG

Tabulka 3 – Hodnocení reakcí AB0 krevních skupin

Tabulka 4 – Hodnocení reakcí RhD

Tabulka 5 – Počet pozitivních a negativních PAT za sledované období

Tabulka 6 – Počet pozitivního PAT u pacientů, novorozenců a dárců krve za sledované období

Tabulka 7 – Zastoupení jednotlivých tříd IgG a složek komplementu u pozitivních PAT za sledované období

Tabulka 8 – Vyšetření titru IgG u pozitivního PAT za sledované období

Tabulka 9 – Jednotlivé titry IgG a jejich zastoupení ve sledovaném souboru za sledované období

Tabulka 10 – Stanovení podskupin IgG1, IgG3 a interpretace výsledku za sledované období

Tabulka 11 – Počet pozitivních a negativních PAT u novorozenců za sledované období

Tabulka 12 – Procentuální zastoupení protilátek proti jednotlivým antigenním systémům

Seznam příloh:

Příloha 1 – Výsledky vyšetření u pacientů za rok 2022

Příloha 2 – Senzibilizující protilátky u novorozenců rok 2022

Příloha 3 – Výsledky PAT u dárců krve za rok 2022

Příloha 4 – Výsledky PAT u pacientů vyšetřovaných pro potransfuzní reakci za rok 2022

Příloha 5 – Žádanka o imuno hematologické vyšetření

Příloha 6 – ID-Centrifugace BIO-RAD a DiaMed pro ID karty

Příloha 7 – AGH polyspecifické (zelené) (10 ml)

13 Přílohy

13.1 Příloha č. 1 – Výsledky vyšetření u pacientů za rok 2022

Výsledky vyšetření u pacientů za rok 2022															
Číslo pacienta	PAT	IgG	IgA	IgM	C3c	C3d	Titr IgG					Podtřídy IgG			
							IgG					IgG1		IgG3	
							1:10	1:30	1:100	1:300	1:1000	1:1	1:100	1:1	1:100
1	++	++	neg	neg	neg	neg	+	neg	neg	neg	neg				
2	+++	+	neg	neg	neg	±	neg	neg	neg	neg	neg				
3	+++	++	neg	neg	neg	±	++	±	neg	neg	neg				
4	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	++	neg	neg	neg				
5	+++	+++	neg	neg	neg	neg									
6	±	+	neg	neg	neg	neg	+	neg	neg	neg	neg				
7	++++	++++	neg	neg	neg	neg	+++	++	+	neg	neg				
8	+++	++	neg	neg	neg	++	+	neg	neg	neg	neg				
9	+++	+++	neg	neg	neg	++	++	neg	neg	neg	neg				
10	+++	+++	neg	neg	neg	neg									
11	±	neg	neg	neg	neg	neg									
12	++++	++++	+++	neg	+++	++++	+++	+++	+++	++	+	+++	++	neg	neg
13	+	±	neg	neg	neg	neg	+++	++	+	neg	neg	++	+	neg	neg
14	++++	+++	neg	neg	neg	neg									
15	+	neg	neg	neg	neg	neg									
16	++	±	neg	neg	neg	+	±	neg	neg	neg	neg	±	neg	neg	neg
17	++++	++++	±	neg	neg	++	+++	+++	++	+	neg	+	neg	neg	neg
18	+++		neg	neg	neg	neg									
19	++++	+++	neg	neg	neg	neg	++++	+++	++	+	neg				
20	±	±	neg	neg	neg	neg									
21	++++	++++	neg	neg	neg	neg	+++	++	+	neg	neg				
22	+	+	neg	neg	neg	neg									
23	+	neg	neg	neg	neg	neg									
24	++++	+++	neg	neg	neg	+									
25	neg	neg	neg	neg	neg	neg									
26	neg	neg	neg	neg	neg	neg									
27	+	±	neg	neg	neg	neg									
28	+	+	neg	neg	neg	neg									
29	++++	++++	neg	++	+	+++	+++	++	+	±	neg				
30	+	neg	neg	neg	neg	neg									
31	++++	++++	±	neg	neg	neg	+++	+++	++	+	neg	+++	++	neg	neg
32	±	neg	neg	neg	neg	neg									
33	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	++	neg	neg	neg				
34	++	neg	neg	neg	neg	++									
35	++	++	neg	neg	neg	neg	±	neg	neg	neg	neg				
36	++	++	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg				
37	++	neg	neg	neg	neg	neg									
38	±	neg	neg	neg	neg	±									
39	+	+	neg	neg	neg	neg									
40	++	/	/	/	/	/									
41	+	neg	neg	neg	neg	neg									
42	++++	++++	neg	neg	neg	++	+++	++	±	neg	neg	++	neg	neg	neg
43	neg	neg	neg	neg	neg	++									
44	neg	/	/	/	/	/									
45	neg	/	/	/	/	/									
46	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	++	neg	neg	neg				
47	neg	/	/	/	/	/									
48	++	++	neg	neg	neg	neg	++	neg	neg	neg	neg				
49	++	/	/	/	/	/									
50	++++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	+++	++	neg	neg	+	neg	++	+
51	+++	neg	neg	neg	neg	neg									
52	++++	++++	neg	++	neg	+++	+++	+++	++	+	neg	+++	neg	++	+
53	++	neg	neg	neg	neg	neg									
54	++	++	neg	neg	neg	neg	++	neg	neg	neg	neg				
55	+	neg	neg	neg	neg	neg									
56	++++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	+++	++	++	neg				
57	++	++	neg	neg	neg	neg	±	neg	neg	neg	neg				
58	±	neg	neg	neg	neg	neg									

Číslo pacienta	PAT	IgG	IgA	IgM	C3c	C3d	Titr IgG					Podtřídy IgG			
							IgG					IgG1		IgG3	
							1:10	1:30	1:100	1:300	1:1000	1:1	1:100	1:1	1:100
59	++++	++++	neg	++	neg	+++	+++	+++	++	neg	neg				
60	++	++	neg	neg	neg	neg									
61	neg	/	/	/	/	/									
62	+++	±	neg	neg	neg	+++	±	neg	neg	neg	neg				
63	+++	++	neg	neg	neg	neg	++	neg	neg	neg	neg				
64	++	++	neg	neg	neg	neg	±	neg	neg	neg	neg				
65	+++	neg	neg	neg	++	+++									
66	+	neg	neg	neg	neg	neg									
67	+	neg	neg	neg	neg	neg									
68	+++	++	neg	neg	neg	±									
69	+	neg	neg	neg	neg	neg									
70	+	±	neg	neg	neg	neg									
71	++	neg	neg	neg	neg	+									
72	neg	/	/	/	/	/									
73	neg	/	/	/	/	/									
74	neg	/	/	/	/	/									
75	±	neg	neg	neg	neg	neg									
76	+++	+++	neg	neg	neg	++	+++	++	neg	neg	neg	+	neg	neg	neg
77	++	++	neg	neg	neg	neg									
78	neg	/	/	/	/	/									
79	+	±	neg	neg	neg	neg									
80	+++	+	neg	++++	++	+++	++	+	neg	neg	neg	++	neg	neg	neg
81	+++	+++	neg	neg	neg	++	++	+	±	neg	neg				
82	neg	/	/	/	/	/									
83	+	+	neg	neg	neg	neg									
84	++	++	neg	neg	neg	neg	±	neg	neg	neg	neg				
85	++++	++++	neg	neg	neg	++	+++	+++	++	neg	neg	+++	+++	neg	neg
86	+++	+++	neg	neg	neg	neg									
87	neg	/	/	/	/	/									
88	±	±	neg	neg	neg	neg									
89	neg	/	/	/	/	/									
90	++	neg	neg	neg	neg	neg	+	neg	neg	neg	neg				
91	+++	+++	neg	neg	neg	++	+++	++	neg	neg	neg				
92	neg	/	/	/	/	/									
93	+++	++	neg	neg	neg	neg									
94	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	++	±	neg	neg				
95	neg	/	/	/	/	/									
96	+++	+++	neg	neg	neg	neg	++++	+++	++	neg	neg				
97	++	++	neg	neg	neg	neg	±	neg	neg	neg	neg				
98	+	±	neg	neg	neg	neg									
99	+	+	neg	neg	neg	neg									
100	+++	++	neg	neg	neg	neg	+	+++	++	+	neg	neg			
101	++	neg	neg	neg	neg	++									
102	neg	/	/	/	/	/									
103	++	neg	neg	neg	neg	++									
104	++	/	/	/	/	/									
105	neg	/	/	/	/	/									
106	neg	/	/	/	/	/									
107	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	+++	++	+	neg	+++	+++	neg	neg
108	++	++	neg	neg	neg	++									
109	++	neg	neg	neg	neg	neg									
110	++	++	neg	neg	neg	neg	++	neg	neg	neg	neg				
111	neg	/	/	/	/	/									
112	±	neg	neg	neg	neg	neg									
113	+++	++++	neg	++	±	++									
114	±	neg	neg	neg	neg	neg									
115	++	++	neg	neg	neg	neg	++	+	neg	neg	neg				
116	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	+++	++	neg	neg				
117	++	++	neg	neg	neg	++									
118	++	neg	neg	neg	neg	++									
119	+	neg	neg	neg	neg	neg									
120	+++	++++	neg	++	neg	neg	+++	++	+	neg	neg	++	+	neg	neg
121	neg	/	/	/	/	/									
122	++	++	neg	neg	neg	neg	+	neg	neg	neg	neg				
123	±	neg	neg	neg	neg	neg									
124	neg	/	/	/	/	/									
125	+	neg	neg	neg	neg	neg									
126	++	++	neg	neg	neg	neg	++	+	neg	neg	neg				
127	neg	/	/	/	/	/									

Číslo pacienta	PAT	IgG	IgA	IgM	C3c	C3d	Titr IgG					Podtřídy IgG			
							IgG					IgG1		IgG3	
							1:10	1:30	1:100	1:300	1:1000	1:1	1:100	1:1	1:100
128	±	neg	neg	neg	neg	neg									
129	+++	++	neg	neg	neg	++	+	neg	neg	neg	neg				
130	neg	/	/	/	/	/									
131	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	++	+	neg	neg	±	neg	neg	neg
132	++	++	neg	neg	neg	neg	+++	++	neg	neg	neg				
133	neg	/	/	/	/	/									
134	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	++	+	neg	neg	+++	neg	neg	neg
135	neg	/	/	/	/	/	+++	++	±	neg	neg				
136	+	neg	neg	neg	neg	neg									
137	neg	/	/	/	/	/									
138	++++	++++	+++	+	±	++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	neg	neg
139	++	neg	neg	neg	neg	++									
140	++	++	neg	neg	neg	neg	+	neg	neg	neg	neg				
141	++	/	/	/	/	/									
142	+++	+++	neg	neg	neg	+	+++	+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
143	+++	++	neg	neg	neg	neg	+++	++	±	neg	neg				
144	neg	/	/	/	/	/									
145	neg	/	/	/	/	/									
146	+++	/	/	/	/	/									
147	neg	/	/	/	/	/									
148	+++	+	+	+++	+++	+++	±	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
149	++	±	neh	neg	neg	neg									
150	neg	/	/	/	/	/									
151	+++	neg	neg	neg	+	+++									
152	neg	/	/	/	/	/									
153	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	++	+	neg	neg				
154	±	±	neg	neg	neg	neg									
155	++	±	neg	neg	neg	+	+++	++	neg	neg	neg				
156	neg	/	/	/	/	/									
157	+++	/	/	/	/	/	+++	++	neg	neg	neg				
158	neg	/	/	/	/	/									
159	++	/	/	/	/	/									
160	±	+	neg	neg	neg	neg									
161	++++	++++	neg	neg	neg	++	+++	+++	+++	++	neg	+++	neg	neg	neg
162	++++	++++	neg	+	+	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	neg	neg
163	++	neg	neg	neg	neg	++									
164	±	neg	neg	neg	neg	neg									
165	++	/	/	/	/	/									
166	±	neg	neg	neg	neg	neg									
167	±	+	neg	neg	neg	neg	++	neg	neg	neg	neg				
168	+	neg	neg	neg	neg	neg									
169	neg	neg	neg	neg	neg	neg									
170	+	+	neg	neg	neg	neg									
171	neg	/	/	/	/	/									
172	++++	++++	++++	++	+	+	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	neg	neg
173	++	neg	neg	neg	neg	++									
174	++++	neg	neg	neg	neg	neg									
175	neg	/	/	/	/	/									
176	neg	/	/	/	/	/									
177	neg	/	/	/	/	/									
178	++++	/	/	/	/	/									
179	neg	/	/	/	/	/									
180	+++	+++	neg	neg	neg	neg									
181	+	neg	neg	neg	neg	neg									
182	+	neg	neg	neg	neg	neg									
183	+++	neg	neg	neg	neg	+++									
184	+++	++++	++	neg	neg	neg	+++	+++	+++	++	+	+++	+	neg	neg
185	neg	neg	neg	neg	neg	neg									
186	+++	neg	neg	neg	neg	++									
187	+++	+++	neg	neg	neg	neg									
188	±	neg	neg	neg	neg	neg									
189	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	++	+	neg	neg	+++	neg	neg	neg
190	neg	neg	neg	neg	neg	neg									
191	±	neg	neg	neg	neg	neg									
192	++	++	neg	neg	neg	neg	+	±	neg	neg	neg				
193	++	++	neg	neg	neg	neg	±	neg	neg	neg	neg				
194	++	neg	neg	neg	neg	neg									
195	++	neg	neg	neg	neg	++									
196	neg	/	/	/	/	/									

Číslo pacienta	PAT	IgG	IgA	IgM	C3c	C3d	Titr IgG					Podtridy IgG			
							IgG					IgG1		IgG3	
							1:10	1:30	1:100	1:300	1:1000	1:1	1:100	1:1	1:100
197	+++	++	neg	neg	neg	++	++	±	neg	neg	neg				
198	neg	/	/	/	/	/									
199	+++	++	neg	neg	neg	++	++	+	neg	neg	neg				
200	neg	/	/	/	/	/									
201	neg	/	/	/	/	/									
202	++++	++++	+++	neg	neg	neg	+++	+++	++	neg	±	+++	neg	neg	neg
203	neg	/	/	/	/	/									
204	neg	/	/	/	/	/									
205	++	/	/	/	/	/									
206	+++	/	/	/	/	/									
207	±	neg	neg	neg	neg	neg									
208	++++	++++	++	neg	neg	neg	++++	+++	++	neg	neg				
209	neg	/	/	/	/	/									
210	±	neg	neg	neg	neg	neg									
211	+++	/	/	/	/	/									
212	neg	/	/	/	/	/									
213	neg	/	/	/	/	/									
214	++++	++++	+++	neg	neg	neg	+++	+++	+++	++	neg	+++	neg	neg	neg
215	neg	/	/	/	/	/									
216	neg	/	/	/	/	/									
217	neg	/	/	/	/	/									
218	+++	/	/	/	/	/									
219	+++	++++	neg	neg	neg	neg	++++	+++	++	±	neg				
220	neg	/	/	/	/	/									
221	++	/	/	/	/	/									
222	neg	/	/	/	/	/									
223	neg	/	/	/	/	/									
224	+	+	neg	neg	neg	neg									
225	++	++	neg	neg	neg	±									
226	++	neg	neg	neg	neg	++									
227	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	++	+	neg	neg	+	neg	neg	neg
228	neg	/	/	/	/	/									
229	+++	++	neg	neg	neg	neg	++	+	neg	neg	neg				
230	+++	+++	neg	neg	neg	neg									
231	neg	/	/	/	/	/									
232	+++	+++	neg	neg	neg	++	±	neg	neg	neg	neg				
233	neg	/	/	/	/	/									
234	+++	++	neg	±	neg	+++	neg	neg	neg	neg	neg				
235	++	++	neg	neg	neg	neg									
236	+	±	neg	neg	neg	±									
237	+	neg	neg	neg	neg	neg									
238	++++	+++	++	neg	neg	neg	+++	+++	++	+	neg	++	neg	neg	neg
239	++++	++++	+	neg	neg	neg	+++	+++	++	+	neg	+++	neg	neg	neg
240	++	neg	neg	neg	neg	++									
241	neg	/	/	/	/	/									
242	++	±	neg	neg	neg	neg									
243	+++	/	/	/	/	/									
244	neg	/	/	/	/	/									
245	++++	++++	neg	neg	neg	neg	+++	++	+	neg	neg				
246	+++	+++	neg	neg	neg	+++	++	neg	neg	neg	neg				
247	+++	+++	neg	neg	neg	+++									
248	neg	/	/	/	/	/									
249	neg	/	/	/	/	/									
250	neg	/	/	/	/	/									
251	+++	+++	neg	neg	neg	+++	+	neg	neg	neg	neg				
252	neg	/	/	/	/	/									
253	neg	/	/	/	/	/									
254	++	++	±	±	neg	+++	±	neg	neg	neg	neg				
255	++++	++++	neg	neg	neg	+++	++	+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
256	±	±	neg	neg	neg	neg									
257	neg	/	/	/	/	/									
258	+++	+++	+	neg	neg	neg	+++	+++	++	+	neg	+++	neg	neg	neg
259	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	+++	++	+	neg				
260	+	neg	neg	neg	neg	++									
261	+	neg	neg	neg	neg	++									
262	+++	/	/	/	/	/									
263	neg	/	/	/	/	/									
264	neg	/	/	/	/	/									
265	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	++	+	neg	neg				

Číslo pacienta	PAT	IgG	IgA	IgM	C3c	C3d	Titr IgG					Podtřídy IgG					
							IgG					IgG1		IgG3			
							1:10	1:30	1:100	1:300	1:1000	1:1	1:100	1:1	1:100		
266	+	neg	neg	neg	neg	+											
267	+++	+++	neg	neg	neg	++	+++	++	+	neg	neg						
268	++	++	neg	neg	neg	neg	±	neg	neg	neg	neg						
269	+	+	neg	neg	neg	neg	±	neg	neg	neg	neg						
270	±	neg	neg	neg	neg	neg											
271	+++	+++	neg	neg	neg	neg	+++	++	+	neg	neg						

Zdroj: vlastní výzkum

13.2 Příloha č. 2 – Senzibilizující protilátky u novorozenců za rok 2022

Senzibilizující protilátky u novorozenců za rok 2022					
Měsíc	Počet	Protilátky anti-A; anti-B	Protilátky anti-D	Ostatní protilátky	Negativní
Leden	110	5	0	1 (s)	104
Únor	84	4	0	0	80
Březen	99	4	0	0	95
Duben	83	3	0	0	80
Květen	80	2	0	0	78
Červen	102	9	0	0	93
Červenec	82	3	0	0	79
Srpen	133	8	1	0	124
Září	105	9	0	0	96
Říjen	89	1	1	0	87
Listopad	81	3	0	0	78
Prosinec	78	6	0	0	72
Celkem	1126	57	2	1	1066

13.3 Příloha č. 3 – Výsledky PAT u dárců krve za rok 2022

Dárce	Číslo dárce	Reakce
1	21016920	pozit.
2	22002530	pozit.
3	22008666	pozit.
4	22010462	pozit.
5	22015770	pozit.


Zdroj: vlastní výzkum

13.4 Příloha č. 4 – Výsledky PAT u pacientů vyšetřovaných pro potravní reakci za rok 2022

pacient	reakce
1	neg
2	neg
3	neg
4	neg
5	neg
6	neg
7	neg
8	neg
9	neg
10	neg
11	neg
12	neg
13	neg
14	neg
15	neg
16	neg
17	neg

Zdroj: vlastní výzkum

13.5 Příloha č. 5 – Žádanka o imuno hematologické vyšetření

 NEMOCNICE CESKÉ BUDĚJOVICE, a.s.		Transfuzní oddělení Boženy Němcové 585/54, PSČ 370 01, tel. číslo: 387 873 361									
ŽÁDANKA O IMUNOHEMATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ A O TRANSFUZNÍ PŘÍPRAVKY											
Zde nalepte štítek nebo vyplňte Oddělení/IČZ: Příjmení: Jméno: Pohlaví: ... Rodné číslo: Dg.: Pojišťovna:		Anamnéza Krevní skupina Transplantace, Biologická léčba <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne kdy, jaká: Předchozí transfuze <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne kdy: Reakce po transfuzích <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne jaké: Imunní protilátky <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne jaké: Porody, potraty <input type="checkbox"/> ano <input type="checkbox"/> ne kdy: Začátek hospitalizace datum:									
Druh primárního vzorku: krev Imuno hematologické vyšetření <input type="checkbox"/> Krevní skupina <input type="checkbox"/> Screening protilátek <input type="checkbox"/> Test kompatibility <input type="checkbox"/> Přímý antiglobulinový test <input type="checkbox"/> Jiné		Žádáme o TRANSFUZNÍ PŘÍPRAVKY K podání (datum a čas) <input type="text"/> do rezervy <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Erythrocyty deleukotizované - ERD TU <input type="checkbox"/> ozářit <input type="checkbox"/> Erythrocyty promyté - EP (po dohodě s TRS) TU <input type="checkbox"/> ozářit <input type="checkbox"/> Plazmu - P TU <input type="checkbox"/> Trombocyty směsné - TBSDR T.D. <input type="checkbox"/> ozářit <input type="checkbox"/> Trombocyty z aferézy - TAD, TADR (po dohodě s TRS) T.D. <input type="checkbox"/> ozářit <input type="checkbox"/> Jiné (po dohodě s TRS)									
Časová naléhavost vyšetření <input type="checkbox"/> Standardně <input type="checkbox"/> STATIM		<table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Vyplní oddělení</th> <th style="width: 50%;">Vyplní laboratoř TRS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Datum a čas odběru:</td> <td>Datum a čas příjmu:</td> </tr> <tr> <td>Jmenovka a podpis sestry:</td> <td>Jmenovka a podpis laboranta:</td> </tr> <tr> <td>Jmenovka a podpis lékaře:</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Vyplní oddělení	Vyplní laboratoř TRS	Datum a čas odběru:	Datum a čas příjmu:	Jmenovka a podpis sestry:	Jmenovka a podpis laboranta:	Jmenovka a podpis lékaře:	
Vyplní oddělení	Vyplní laboratoř TRS										
Datum a čas odběru:	Datum a čas příjmu:										
Jmenovka a podpis sestry:	Jmenovka a podpis laboranta:										
Jmenovka a podpis lékaře:											
Výdej TP bez předtransfuzního vyšetření <input type="checkbox"/> VITÁLNÍ INDIKACE											
VYSVĚTLIVKY K ŽÁDANCE NA DRUHÉ STRANĚ Strana 1 z 2											

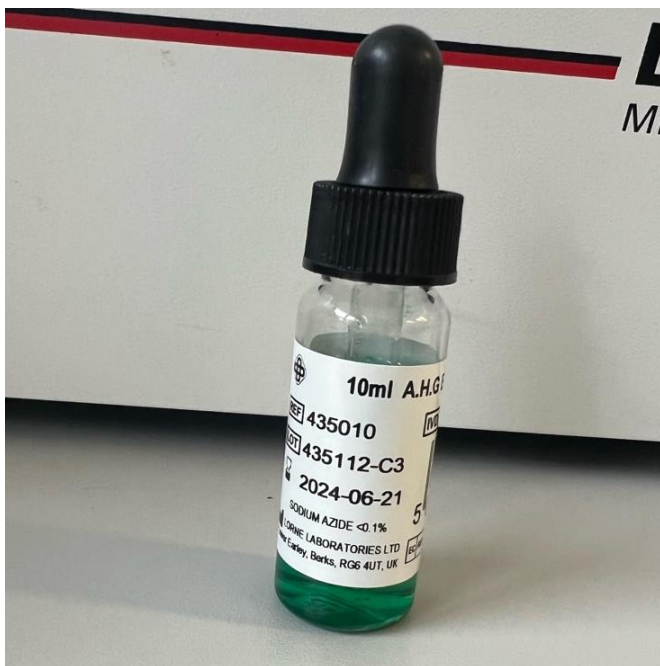
Zdroj: <https://www.nemcb.cz>

13.6 Příloha č. 6 – ID-Centrifugace značky BIO-RAD a DiaMed pro ID karty



Zdroj: vlastní foto

13.7 Příloha č. 7– AGH polyspecifické (zelené) (10 ml)



Zdroj: vlastní foto

14 Seznam zkratek

Ag	antigen
Ag-Ab	komplex antigen-protilátka
AGH	antiglobulin (z AJ anti humanum globulinum)
AIHA	autoimunitní hemolytická anémie
aj.	a jiné
anti-IgG	protilátka proti imunoglobulinu G
C3d	složka komplementu
Ctl	monoklonální kontrola
č.	číslo
ET	enzymový test
event.	eventuelně
HFA	high frequency antigens
HON	hemolytické onemocnění novorozence
Ig	imunoglobulin
IgG	imunoglobulin třídy G
IgM	imunoglobulin třídy M
IgA	imunoglobulin třídy A
IgD	imunoglobulin třídy D
IgE	imunoglobulin třídy E
i.v.	in vivo
KS	krevní skupina
LOW	low frequency antigen
NAT	nepřímý antiglobulinový test

PAT	přímý antiglobulinový test
PBS	Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok
STL	společnost pro transfuzní lékařství
tj.	to je
TP	transfuzní přípravek, transfuzní přípravky
TRS NEMCB	Transfuzní oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s.
tzn.	to znamená