



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

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

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

Bakalářská práce

Záchyt chladových protilátek v hematologické laboratoři při stanovování krevního obrazu

Vypracovala: Michaela Stárková
Vedoucí práce: MUDr. Marie Láďová

České Budějovice 2016

Abstrakt

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala záchytem chladových protilátek v hematologické laboratoři při stanovování krevního obrazu.

Cílem této práce bylo upozornění na možnost ovlivnění hodnot krevního obrazu chladovými protilátkami, praktické laboratorní metody - měření hodnot krevního obrazu na hematologickém analyzátoru firmy Abbott, dále ovlivnění výsledků stanovování chladových protilátek preanalytickou fází a nakonec vyhodnocení a získání výsledků přibližně u 20 pacientů.

První část práce je zaměřena na obecné informace z oboru imuno hematologie, kde je popsán antigen, protilátka a struktura imunoglobulinů. Dále jsem se zabývala fyziologií a složením krve, krevním obrazem a jeho parametry. Na závěr jsou uvedené informace o autoimunitních hemolytických anémiích a chladových protilátkách, kde je popsána preanalytická, analytická a postanalytická fáze.

Metodická část práce byla provedena v Biochemicko-hematologické laboratoři Stafila, s. r. o. Veškeré mé měření bylo provedeno pod dohledem laborantky na úseku hematologie. Stanovení krevního obrazu bylo vykonáno u 24 pacientů pomocí multiparametrického plně automatizovaného analyzátoru firmy Abbott. V této části práci nejprve popisují specifikace analyzátoru. V dalším kroku jsou uvedené pracovní pomůcky, které byly použity. V závěru je podrobně popsán průběh vlastního měření.

Při hodnocení naměřených hodnot byla pozornost věnována hlavně červené krevní řadě, konkrétně ovlivnění hodnot erytrocytů, hemoglobinu, MCH a MCHC.

V další části práce jsou zpracované naměřené hodnoty krevního obrazu u 24 vzorků, které jsem následně zanesla do tabulek a grafů.

Z naměřených hodnot mohu vyhodnotit, že z 24 měřených vzorků byly pouze 4 vzorky s neobvyklými hodnotami červené řady, které mohou značit možnou přítomnost chladových protilátek.

Klíčová slova:

Chladové protilátky, krevní obraz, erytrocyty, měření

Abstract

In my Bachelor thesis I followed up cold antibodies capture in a hematology laboratory during the blood cell count statement.

The main goal of this thesis was to point out the possible influence of blood counts through the cold antibodies, practical laboratory methods – measurement of blood count values with hematological Abbott analyser, furthermore influencing the results of setting the cold antibodies through preanalytical phase and finally the assessment of received results in amount of 20 patients.

The first part of this thesis focuses on general information of imunohematology which describes antigen, antibodies, structure of immunoglobulins. Moreover I dealt with physiology and blood composition, the blood counts and its parameters. In the end of this thesis there are information of autoimmune hemolytic anemia and cold antibodies including their preanalytical, analytical and postanalytical phase.

The methodological part of this thesis was carried out in Biochemical-hematological laboratory Stafila s.r.o. All my measurements were made under the supervisory of hematological laboratory assistant. Stating the blood count was made with 24 patients through multiparametric fully automatic Abbott analyser. In that part, I firstly describe analyser specifications. In the following step I indicate the working aids which were used. Finally, there is described the process of the measurements in detail.

Within the assessment of the measured values the main attention was paid to red blood line, especially influencing the values of erythrocyte, the hemoglobin, MCH and MCHC.

In another part of this thesis are all the blood counts calibres of 24 samples, which I entered into graphs and charts.

Out of all 24 measured values I can evaluate that only 4 samples were of unusual values of red line, which can indicate the presence of cold antibodies.

Key words:

Cold antibodies, blood cell count, erythrocytes, measurements

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích dne 29. 4. 2016

.....

Michaela Stárková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala všem, kteří mi pomohli při tvorbě této bakalářské práce. Především mé vedoucí práce paní MUDr. Marii Ládové za její odbornou pomoc, cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla upřímně poděkovat Bc. Romaně Sladké a Ivě Němcové za jejich ochotu a cenné rady při zpracování mé práce.

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
Úvod	10
1 TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1 Imunohematologie	12
1.2 Antigen.....	13
1.3 Protilátky.....	13
1.3.1 Struktura imunoglobulinu.....	15
1.3.2 Třídy IgG, IgM, IgA, IgD, IgE.....	16
1.4 Detekce antigenů a protilátek	18
1.5 Reakce antigenů a protilátek.....	18
1.5.1 Faktory ovlivňující reakci antigenů a protilátek.....	19
1.6 Hematologie.....	19
1.6.1 Fyziologie krve.....	20
1.6.2 Složení krve.....	20
1.7 Krevní obraz	23
1.7.1 Parametry krevního obrazu	24
1.7.2 Ovlivnění hodnot.....	25
1.8 Anémie – chudokrevnost	26
1.9 Chladové protilátky.....	28
1.9.1 Odběr	29
1.9.2 Vyšetření	30
1.9.3 Výsledek vyšetření	31
1.9.4 Léčba	31
Cíle práce	32
2 METODIKA	33
2.1 Specifikace analyzátoru CELL-DYN Ruby	33
2.2 Pracovní pomůcky	36
2.3 Průběh vlastního měření	36

3	VÝSLEDKY	41
4	DISKUZE	45
5	ZÁVĚR	48
6	SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ	49
7	PŘÍLOHY	54

Seznam použitých zkratek

APC	buňka předkládající antigen (Antigen Presenting Cell)
AIHA	autoimunitní hemolytická anémie
Fab	antigen vázající fragment (Fragment Antigen Binding)
Fc	krystalizující fragment (Fragment crystallisable)
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
KO	krevní obraz
MAC	komplex atakující membránu (Membrane Attack Complex)
CA	chladové aglutininy
Ag	antigen
PAT	přímý antiglobulinový test
K ₃ EDTA	antikoagulační činidlo (tri-draselná sůl kyseliny etylen-diamin-tetraoctové)
RBC	erytrocyty (Red Blood Cells)
HGB	hemoglobin
HCT	hematokrit
MCV	střední objem erytrocytů
MCH	hemoglobin v erytrocytu
MCHC	koncentrace HGB v erytrocytu
RDW	distribuční šíře erytrocytů
PLT	trombocyty (platelets)
MPV	střední objem trombocytů
WBC	leukocyty (White Blood Cells)
LIS	laboratorní informační systém

MAPSS	separace polarizovaného rozptýleného světla pod různými úhly (Multi-Angle Polarized Scatter Separation)
NEU	absolutní koncentrace neutrofilů
%N	procentuální podíl neutrofilů na počtu WBC
LYM	absolutní koncentrace lymfocytů
%L	procentuální podíl lymfocytů na počtu WBC
MONO	absolutní koncentrace monocytů
%M	procentuální podíl monocytů na počtu WBC
EOS	absolutní koncentrace eozinofilů
%E	procentuální podíl eozinofilů na počtu WBC
BASO	absolutní koncentrace bazofilů
%B	procentuální podíl bazofilů na počtu WBC
RETC	absolutní koncentrace retikulocytů
%R	procento retikulocytů
USB	univerzální sériová sběrnice (Universal Serial Bus)
CBC	celkový počet krevních buněk
CBC + NOC	CBC s výhledem optického počítání jader
CBC + RRBC	CBC s rezistentními RBC
RETIC	retikulocyty

Úvod

Tuto bakalářskou práci na téma Záchyt chladových protilátek v hematologické laboratoři při stanovování krevního obrazu jsem si zvolila po konzultaci s MUDr. Marií Ládovou, která se stala zároveň i mou vedoucí této práce.

Chladové protilátky jsou kompletní protilátky třídy IgM, které váží komplement. Reagují při nižší teplotě než 37 °C a mají schopnost aglutinovat erythrocyty. Tyto protilátky se u pacientů mohou projevit různými příznaky, jako je například slabost, únava, bledost či bolest hlavy. Po kontaktu s chladem může dojít k bolestivému zbarvení terminálních částí těla, například uší, nosu, prstů, které je způsobené právě aglutinací erythrocytů. Chladové protilátky mohou být příčinou autoimunitní hemolytické anémie, která je spíše známá pod názvem nemoc chladových aglutininů. Již zmíněná anémie může souviset s celou řadou chorob, mezi které patří například infekce vyvolané *Mycoplasma pneumoniae* nebo hematologické a jiné malignity.

Přítomnost chladových protilátek v krvi se vyskytuje ve velmi malé míře, mnohdy se o ní člověk během života nemusí ani dozvědět. U některých případů je síla protilátek tak malá, že se projeví pouze zbarvením některých částí těla při dlouhodobém vystavování se chladu. V dalších případech mohou být chladové protilátky příčinou mnoha jiných závažných onemocnění. Bohužel je o této problematice chladových protilátek téměř nulová informovanost. Touto prací bych chtěla veřejnosti přiblížit závažnost této možné přítomnosti chladových protilátek v krvi.

Práci jsem rozdělila na část teoretickou a metodickou. V první zmíněné části jsou uvedené obecné informace z oboru imuno hematologie, kde jsem popsala antigen a protilátky, dále informace z oboru hematologie. V té jsem se zabývala fyziologií a složením krve, dále krevním obrazem a jeho parametry. V následující teoretické části jsem vypsala informace o autoimunitních hemolytických anémiích a chladových protilátkách. U této kapitoly jsme se zabývala odběrem, vyšetřením a léčbou chladových protilátek. V druhé části metodické je uvedena specifikace analyzátoru, na kterém jsem prováděla měření u vybraného počtu 24 pacientů. Dále je zde popsán

průběh vlastního měření, které spočívalo ve stanovování krevního obrazu na možný záchyt přítomnosti chladových protilátek.

V závěru mé práce jsem zpracovala tabulky naměřených hodnot krevního obrazu u 24 pacientů na možný záchyt pravděpodobné přítomnosti chladových protilátek.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Imunohematologie

Imunohematologie je vědní obor, který se zabývá studiem imunitního systému a krve a zároveň jeho diagnostikou. Dále detekcí antigenů krevních buněk a protilátek proti nim. Řeší problémy krevních transfuzí, transplantací kostní dřeně, dále se zabývá změnami krevního obrazu (Čermáková *et al.*, 2008).

Jednou z hlavních funkcí imunitního systému je rozpoznání cizorodých antigenů a následná reakce proti nim tvorbou protilátek. Tato funkce je souhrnem mnoha spouštěcích mechanismů, které se projevují jako obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled. První z těchto tří projevů rozpoznává vnější škodliviny a zároveň brání organismus proti patogenním mikroorganismům. Autotolerance je funkce, při které imunitní systém rozeznává vlastní tkáň a udržuje toleranci vůči nim. Posledním z projevů je imunitní dohled, který se vyznačuje tím, že IS odstraňuje průběžně staré, poškozené a zmutované buňky. Tyto obranné mechanismy vytvořené proti cizím organismům se nazývají imunita (Engelfriet *et al.*, 2003; Hořejší, 2013).

Imunitní systém je tvořen různými typy buněk, kde nejvýznamnější postavení mají lymfocyty. Lymfocyty se kromě periferní krve nacházejí v thymu, ve slezině, dále v lymfatických uzlinách a ve tkáních. IS je skládá z nespecifické a specifické složky. Složku nespecifickou představují složky fyzikální a fyziologické bariéry, to je například kožní epitel a různé buňky (monocyty/makrofágy, granulocyty). Specifická složka je tvořena T a B lymfocyty a protilátkami tvořené B lymfocyty. Dále je mířena proti určité cizí struktuře, například bakterií, virů nebo cizích buněk (Engelfriet *et al.*, 2003).

Imunitní odpověď je nejprve zahájena rozpoznáním antigenu jako cizí látky, kterou je nutné z těla odstranit. Následující fází je úprava antigenu, kterou vykonají makrofágy nebo dendritické buňky, jako antigen prezentující buňky (APC). Po této antigení prezentaci je zahájen složitý proces reakcí, který zahrnuje dva typy reakcí: imunitu humorální a buněčnou. U buněčné imunity organismus produkuje cytotoxické

T lymfocyty. Tyto lymfocyty nesou na svém povrchu molekuly, které se nazývají T-buněčné receptory. V této podobě je cytotoxický T lymfocyt schopen navázat se na cizí antigen. Tento antigen může být následně odstraněn z organismu. U humorální imunity reakce probíhá tak, že se aktivují B lymfocyty, které se vyvíjejí v plazmatické buňky. Ty dále produkují protilátky, které napadají cizí struktury (antigeny), (Engelfriet *et al.*, 2003).

1.2 Antigen

Látky, na které může reagovat imunitní systém, nazýváme antigeny. Jakékoli chemické struktury mohou působit jako antigeny. Obvykle se jedná o molekulárně velké struktury, makromolekuly, jakož jsou proteiny, komplexní sacharidy, lipidy a lipoproteiny. Díky tomu je může imunitní systém rozeznat (Engelfriet *et al.*, 2003; Hořejší, 2013). Struktury antigenu, mají schopnost vyvolat tvorbu protilátek, neboli navodit specifickou imunitní odpověď (Ferenčík, 2004). Důležitými pojmy jsou pro antigeny *imunogenicita* a *antigenicita*. První zmíněný termín znamená schopnost antigenu vyvolat imunitní odpověď. Antigenicita, jak již z názvu vypovídá, je schopnost antigenu vyvolat protilátkovou odpověď (Fábryová *et al.*, 2012). V nynější době rozeznáváme 329 antigenů, ze kterých se dále 292 řadí do 33 systémů krevních skupin (Hořejší 2013; Řeháček *et al.*, 2013).

1.3 Protilátky

Protilátky jsou látky bílkovinné povahy, které vznikají v rámci humorální imunity produkcí B lymfocytů a plazmatických buněk. Protilátky, které se poté uvolňují do krevního oběhu, nazýváme imunoglobuliny, které jsou základní jednotkou, ty poté napadají antigen. Dále se pak naváží na určité místo antigenu, které je rozeznáváno imunitními receptory, to se nazývá epitop. V případě fixace protilátky na cizí buňky se zahajují různé typy reakcí. Protilátka je rozpoznána fagocytární buňkou, například makrofágem, ten následně stráví cizí buňku i s povlečenou protilátkou. Proces povlečení

buněk se nazývá opsonizace. Absorpce povlečených buněk makrofágy se nazývá fagocytóza. V případě, že jsou protilátky navázané na buňky ke komplement-vázajícím imunoglobulinům, dochází k navázání faktorů komplementu na protilátky. Tyto faktory jsou nadále rozpoznány fagocytárními buňkami a následně způsobí fagocytózu cizí buňky. Dále mohou vytvořit „komplex napadající membránu“ (MAC). Tento komplex naruší její stěnu, poté dojde k destrukci cizí buňky (Engelfriet *et al.*, 2003; Jílková, 2009; Ferenčík, 2005).

Při prvním kontaktu jedince s cizím antigenem následuje vždy primární imunitní reakce. V rámci humorální odpovědi dojde k rozmnožení B lymfocytů, které byly aktivovány pomocí antigenu a T pomocnými lymfocyty. Zde dochází k diferenciaci na plazmatické buňky, které produkují protilátky. Většina plazmatických buněk nejprve produkuje IgM protilátky, po několika následujících dnech i IgG protilátky. Poté následuje doba trvání dvou až šesti týdnů, než dojde k detekování specifických protilátek v krvi. Protilátky přetrvávají v krvi pouze určitý čas. Jejich koncentrace se postupně snižuje někdy až na hladinu, ve které není možná již žádná detekce. Primární odpověď není jedinou, a tak zde působí i sekundární odpověď, která vytváří lymfocyty, které jsou nosičem paměti pro příslušný antigen. Proto v případě obnovení kontaktu s antigenem jsou lymfocyty schopny velmi rychle produkovat velké množství protilátek. Těmto lymfocytům říkáme paměťové buňky. Zde dochází k vytvoření převážně IgG protilátek (Engelfriet *et al.*, 2003).

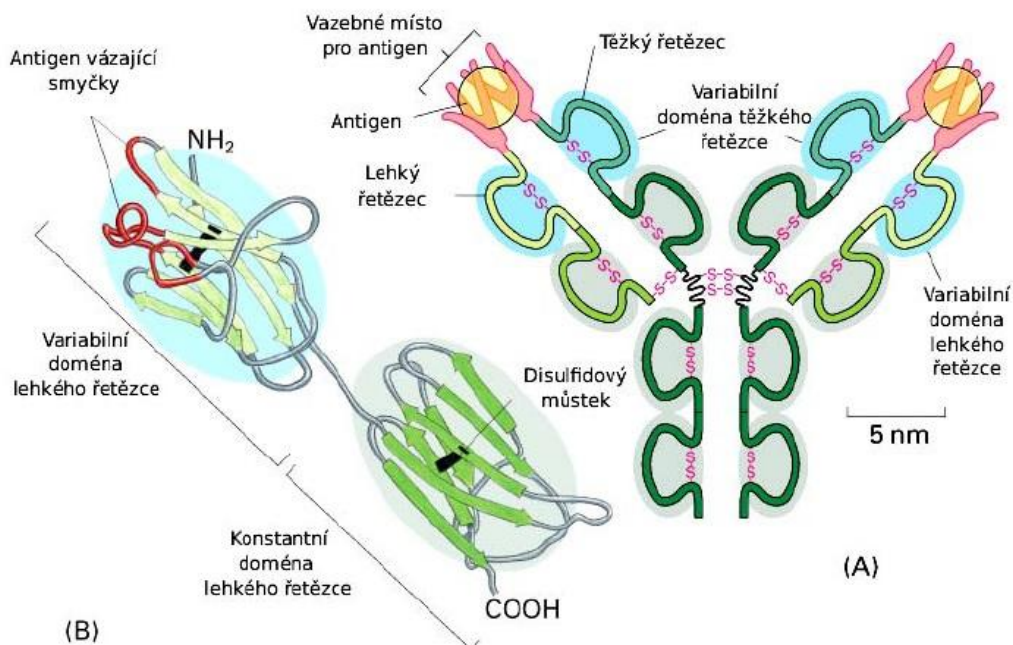
Protilátky obecně dělíme podle několik specifik a to podle:

- původu (lidské, zvířecí, rostlinné a umělé)
- specifity (reakce s jedním antigenem – *specifické*, nebo s více antigeny – *nespecifické*)
- způsobu vzniku (*imunní*, které vznikají po celou dobu kontaktu s antigenem; *přirozené*, které se vytvoří po kontaktu s antigenem; *autoprotilátky* jsou určitý typ protilátek namířen proti vlastním antigenům)
- sérologické reakce (kompletní – protilátky mířené proti vlastním erytrocytům, typ IgM; inkompletní – k jejich důkazu je zapotřebí laboratorní úprava testu, typ IgG)

- tepelného optima reakce (*tepelné*, kdy se jedná o aglutinující erytrocyt za teploty 37 °C, převážně IgG; *chladové* aglutinující naopak při nízké teplotě, nejlépe v rozmezí 23 °C až 20 °C nebo nižších, většinou IgM), (Fábryová *et al.*, 2012).

1.3.1 Struktura imunoglobulinu

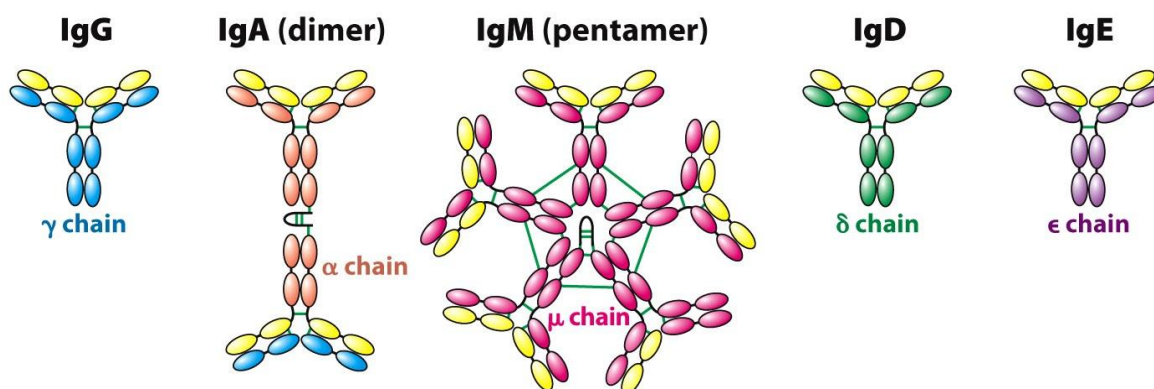
Imunoglobuliny (Ig) nazýváme protilátky patřící ke globulinové frakci sérových bílkovin. Základní strukturou těchto imunoglobulinových molekul jsou dva identické těžké (m. h. 50 000 – 70 000 Daltonů) a dva identické lehké polypeptidové řetězce (m. h. 25 000 Daltonů). Tyto řetězce navzájem spojují disulfidové vazby (mezi dvěma atomy síry), (Engelfriet *et al.*, 2003; Jílková, 2009). Těžké řetězce se dále skládají ze čtyř domén. Doména je tvořena sekvencí 110 – 120 aminokyselin. Prostorová struktura těchto domén se podobá jakémusi soudku, který je tvořený smyčkami polypeptidových řetězců. Naopak lehké řetězce se skládají pouze ze dvou domén (Hořejší *et al.*, 2013).



Obrázek č. 1: Znárodnění struktury imunoglobulinu (převzato a upraveno z Alberts, 2004)

1.3.2 Třídy IgG, IgM, IgA, IgD, IgE

Rozdělení imunoglobulinů řadíme do 5 tříd (izotopů) a to IgG, IgM, IgA, IgD a IgE. Každý imunoglobulin má dva těžké řetězce, a to IgG γ (gamma), IgM μ (mí), IgA α (alfa), IgD δ (delta) a IgE ϵ (epsilon). Aminokyselinová sekvence na těžkém řetězci určuje imunoglobulinovou třídu. Dále rozeznáváme dva lehké typy řetězců κ (kappa) a λ (lambda). Tyto dva řetězce však nejsou specifické pro určitou Ig třídu. U jednotlivé imunoglobulinové molekuly jsou však typy lehkých i těžkých řetězců vždy identické (Engelfriet *et al.*, 2003).



Obrázek č. 2: Znázornění typů imunoglobulinů (převzato a upraveno z J. M. Berg *et al.*, 2012)

Rozdělení imunoglobulinové molekuly lze provést pomocí určitých enzymů, a to na tři části: dvě Fab (Fragment antigen binding) a jednu Fc (Fragment crystallisable) část. Obě dvě první části jsou identické s obsahem L - řetězce a částečného H - řetězce. Tyto Fab části jsou nositeli protilátkové specifity kompletní Ig molekuly, a to díky schopnosti vázat antigen (Engelfriet *et al.*, 2003).

IgG molekula

IgG molekula existuje pouze ve formě monomeru a skládá se z jedné imunoglobulinové jednotky se dvěma těžkými a dvěma lehkými řetězci. Ze všech

imunoglobulinů tvoří 80 %. Výjimečností je to, že pouze tato jediná protilátka je schopna procházet placentou. Receptory pro Fc část IgG se v tomto případě nachází na monocytech a makrofázích. Podtřídy IgG se navzájem liší sekvencí aminokyselin na specifické části gama řetězce. Tím dochází ke vzniku rozdílné biologické charakteristiky. Pro porovnání IgG₁ a IgG₃ dobře váže komplement, na rozdíl od IgG₂, který je tohoto schopen jen v některých případech, zatímco IgG₄ komplement neváže vůbec (Engelfriet *et al.*, 2003; Jílková, 2009).

IgM molekula

IgM se na rozdíl od IgG molekul vyskytuje ve formě pentameru a obsahuje těžké řetězce μ – typu. Oproti molekule IgG tvoří pouze 6 % ze všech imunoglobulinů. Podle názvu již můžeme usoudit, že pentamer se skládá z pěti základních imunoglobulinových jednotek, které se navzájem propojují tzv. J (join), což je krátký polypeptidový řetězec. Z hlediska struktury obsahuje molekula IgM deset antigenních vazebných míst. Protilátky velmi dobře vážou i aktivují komplement. Z tohoto důvodu stačí pouze jedna navázaná IgM molekula na buněčném povrchu, aby komplement buňku zničil. Oproti IgG molekulám tyto molekuly neprochází placentou (Engelfriet *et al.*, 2003; Jílková, 2009).

IgA molekula

Molekulu IgA nalezneme ve formě monomeru i dimeru. Procentuální zastoupení ze všech imunoglobulinů je 13 %. Stejně jako molekuly předchozího imunoglobulinu neprochází placentou. Výskyt je převážně na mukózních membránách, kde zastávají funkci preventivní, jako ochrana proti vniknutí mikroorganismů do těla. Při destrukci erytrocytů IgA protilátkami hrají důležitou roli receptory Fc části IgA, které se nacházejí na monocytech a makrofázích (Engelfriet *et al.*, 2003; Jílková, 2009).

IgD molekula

Molekula IgD se vyskytuje na povrchu lymfocytů, je zabudovaná v cytoplazmatické membráně, neaktivuje komplement a ani neprochází placentou.

Má nejméně známou funkci a tvoří 0-1 % ze všech imunoglobulinů (Jílková, 2009; Ferenčík, 2004).

IgE molekula

Tyto molekuly mají nejmenší procentuální zastoupení ze všech imunoglobulinů, a to pouze 0,002 %. Stupňují účinnost antimikrobiálních systémů, a tak se uplatňují při ochraně vnějšího povrchu těla. Množství IgE se zvyšuje při parazitárních onemocněních a způsobuje příznaky atopické alergie. IgE neprochází placentou (Jílková, 2009).

1.4 Detekce antigenů a protilátek

Jednou z prvních technik jsou tzv. sérologické techniky, které slouží k vyšetřování antigenů a protilátek. Imunohematologický rozvoj počal objevením hemaglutinace, dále jen aglutinace, což je shlukování erytrocytů působením protilátek proti antigenům, které jsou přítomny na těchto krvinkách. Tyto techniky zůstaly i po sto letech základním postupem z důvodu jednoduchosti (Řeháček *et al.*, 2013).

K samotnému vzniku protilátkové aglutinace – shluků krvinek je potřeba těchto dvou podmínek. První podmínkou je vazba protilátky na antigen, který se nachází na povrchu krvinky. A za druhé je nutné propojení dvou krvinek mezi sebou pomocí protilátkové vazby. Tyto dva požadavky splňují pouze protilátky třídy IgM, tedy kompletní protilátky. Oproti IgM protilátkám, splňují IgG protilátky, tedy inkompletní, na ojedinělé výjimky, pouze jednu z výše vepsaných požadavků (Řeháček *et al.*, 2013).

1.5 Reakce antigenů a protilátek

Jde o chemickou reakci, ve které se jedná o vazbu malého místa glykoproteinové molekuly protilátky s vazebnými místy, neboli epitopy na povrchu membrány. Mezi faktory ovlivňující tuto vazbu patří teplota, iontová síla prostředí a pH (Řeháček *et al.*, 2013).

1.5.1 Faktory ovlivňující reakci antigenů a protilátek

Teplota

U protilátek se využívají dva typy vazeb, a to vazba polární a vazba hydrofobní. Nejčastěji jde o polární vazbu při interakci sacharidových antigenů, kdy jde o výměnu elektronů mezi donorskou a akceptorskou molekulou. Dochází k tvorbě vodíkových můstků ve vodném prostředí. Tato reakce je silnější za nižších teplot, je tedy exotermní. Protilátky, které takto reagují, patří většinou do třídy IgM. Tyto protilátky označujeme jako chladové, protože reagují při teplotě nižší, než je teplota tělesná. Právě z tohoto důvodu je teplota hlavním faktorem, který ovlivňuje celý záchyt chladových protilátek. Jak jsem již uvedla, druhým typem je vazba hydrofobní, která probíhá při vyšších teplotách a je ve většině případů spojena s proteinovými antigeny. Takto reagují hlavně protilátky třídy IgG, které jsou označovány jako protilátky tepelné (Řeháček *et al.*, 2013).

Iontová síla

Již oba typy zmíněných vazeb jsou ovlivňovány ionty v reakčním prostředí, které vytvářejí tzv. obaly okolo oblastí antigenů a protilátek, jež jsou opačně nabitě. V případě použití roztoku, kde je obsah iontů nižší (LISS), se rychleji dosáhne potřebných vazeb antigenů a protilátek (Řeháček *et al.*, 2013).

pH

Optimální pH hodnota je ve většině protilátkových reakcí rovna 7. Laboratorní testy je doporučováno provádět v prostředí pufovaného fyziologického roztoku (PBS), aby došlo k udržení optimálního pH (Řeháček *et al.*, 2013).

1.6 Hematologie

Obor hematologie, dříve jen podobor vnitřního lékařství s velmi zajímavou historií, v posledních letech nabyl na své obsažnosti a rozšířenosti. V minulosti omezený obor

na vnitřní lékařství, opírající se o klinická či patologicko-anatomická pozorování, dnes výrazně pomáhá nejen v samotném oboru hematologie, ale i v oborech vzdálených, však velice důležitých (Donner, 1985).

Základním vyšetřením v oblasti hematologie je bezpochybně vyšetření krve. Vyšetřují se vlastnosti krve a její složení, mezi které patří například množství hemoglobinu, dále tvar a počet erytrocytů, krevní srážlivost a jiné (Rozsypalová *et al.*, 2002). Někdy můžeme krev považovat za samostatný orgán či složku pojiva s ohledem na její fyziologické funkce (Navrátil *et al.*, 2008).

1.6.1 Fyziologie krve

Tato životně důležitá tělní tekutina se skládá z buněk, v tomto případě z krvinek, dále z plazmy, což je tekutá část, která obsahuje nejen bílkovinné, tukové či sacharidové látky, ale také organické i anorganické soli a plyny (Sakalová *et al.*, 1995). Krev zajišťuje neustálou výměnu látek mezi buňkami a napomáhá tím tak udržovat stálost vnitřního prostředí, a sice tkáňových i krevních buněk. Nejzákladnější funkcí krve je však transportní funkce, která zajišťuje převod O_2 a CO_2 z plic do tkání a naopak. Aby k tomuto dění mohlo dojít, krev musí v těle kolovat, což jí umožňuje uzavřený cévní systém, řadí se tedy mezi extracelulární tekutiny. Přibližně tvoří krev 6 – 8 % z hmotnosti celého těla. V přepočtu na litry činí objem krve 5 – 6 litrů u dospělých mužů a u žen je tato kapacita kolem 4,5 litrů (Dylevský, 2000; Mourek, 2005; Navrátil, 2008).

1.6.2 Složení krve

Jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole, krev obsahuje hlavní dvě složky, mezi které neodmyslitelně patří krevní plazma a krevní buňky. První z nich, krevní plazma, je tekutá nažloutlá složka krve, která je z největší části složena z vody (91 %). Zbytek složky tvoří organické a anorganické látky, které jsou například albuminy, globuliny, glukóza, fibrinogen, ionty a soli. Druhou složkou jsou krevní buňky, jinak řečeno

elementy, které zahrnují červené krvinky (erytrocyty), bílé krvinky (leukocyty) a destičky (trombocyty), (Dylevský, 2000; Mourek, 2005; Novotný *et al.*, 2003).

Erytrocyty

Červené krvinky neboli erytrocyty jsou bezjaderné buňky obsahující hemoglobin, což je červené krevní barvivo složené z bílkoviny globinu a barevné části hemu, na který se váže kyslík a oxid uhličitý. Buňky jsou bikonkávního tvaru, který umožňuje zvětšení buňky o 30 %. Během transportu do krevního oběhu erytrocyty ztrácí své jádro. Tyto bezjaderné buňky nejsou schopny dělení, a proto je jejich životnost pouze 100 až 120 dní. Jsou ohraničené cytoplazmatickou membránou, která je pevná a elastická. V průběhu svého života se erytrocyty důsledkem krevního oběhu opotřebovávají a ve slezině dochází k jejich úplnému zániku. Erytrocyty se významně podílejí na metabolismu železa. Standardní počet erytrocytů u mužů je $4,0 - 5,8 \times 10^{12}/l$ a u žen $3,8 - 5,2 \times 10^{12}/l$ (Mourek, 2005; Dylevský, 2000; Penka, 2011; Pecka, 2006; Ferenčík, 2004).

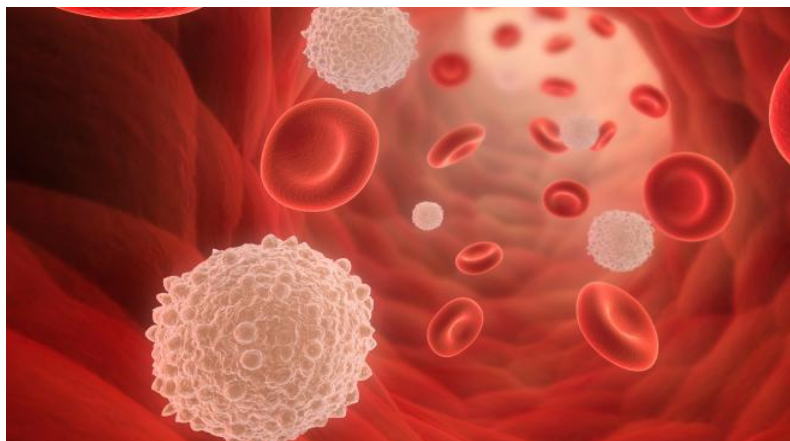


Obrázek č. 3: Znárodnění erytrocytů, (převzato a upraveno z The Franklin Institute, 2016)

Leukocyty

Bílé krvinky neboli leukocyty produkují skupinu různotvarých buněk. Leukocyty dělíme podle tvaru jader, barvitelnosti a velikosti buněk na granulocyty a agranulocyty.

Liší se obsahem enzymů. Granulocyty dále dělíme na neutrofilní, bazofilní a eozinofilní leukocyty. Agranulocyty rozlišujeme na lymfocyty a monocyty, kde lymfocyty jsou T a B. Celkové množství všech leukocytů se standardně u dospělého pohybuje v rozmezí $4,0 - 10,0 \times 10^9/l$ (Mourek, 2005; Dylevský, 2000; Penka, 2011).



Obrázek č. 4: Znázornění leukocytů, (převzato a upraveno z The Franklin Institute, 2016)

Trombocyty

Krevní destičky neboli trombocyty jsou bezjaderná tělíska nepravidelného tvaru, která vznikají v kostní dřeni odškrcováním obrovských buněk dřene, megakaryocytů. Proto jsou tělíska malá a velmi křehká. Právě díky křehkosti plní svoji funkci v krvi. V krevním oběhu se dožívají přibližně 4 dny. V případě poškození cévní stěny, se důsledkem krevního proudu rozbíjejí a uvolňují látky, které startují krevní srážení – tromboplastin. Společně s tím se uvolňují i další látky zvyšující lepivost destiček a tím dochází k vytváření krevní zátky. Další látky vyvolané tímto procesem podporují smršťování poškozených cév. U dospělého člověka se při běžném stavu považuje počet trombocytů $150 - 350 \times 10^9/l$ (Dylevský, 2000; Penka, 2011).



Obrázek č. 5: Znárodnění trombocytů, (převzato a upraveno z Thrombocyte, 2016)

1.7 Krevní obraz

Jak již bylo zmíněno v předešlých kapitolách ohledně hematologie či fyziologie krve, je právě krev hlavním faktorem při jakémkoliv vyšetření. Z tohoto důvodu je nejzákladnější metodou vyšetřování téměř vždy rozbor krve, kdy se odebírá srážlivá krev nebo v opačném případě krev s protisrážlivým roztokem (Rozsypalová *et al.*, 2002). V případě mého výzkumu jsem krevní obraz stanovovala ve zkumavkách K₃EDTA.

V dnešní době nalezneme v oboru hematologie více než 400 vyšetřovacích metod, ale jak jsem již zmínila, základem vyšetření zůstává stále stanovení krevního obrazu. Krevním obrazem nazýváme vyšetření již zmíněných krevních elementů s jejich vlastnostmi, jako je například počet krevních buněk a jejich velikost. Výsledky naměřených parametrů nám napomáhají k diferenciální diagnostice vnitřních chorob, jako jsou například záněty a nádory. Celkový krevní obraz s diferenciálním rozpočtem se již v dnešní době ve většině laboratoří stanovuje pomocí plně automatických analyzátorů krevních elementů. Ty poskytují přes třicet parametrů KO, včetně diferenciálního rozpočtu leukocytů a histogramů erytrocytů, leukocytů a trombocytů. Výhodou analyzátorů je však rychlost, přesnost a správnost (Navrátil, 2008; Penka, 2001; Kotačková, 2016; Dobrotová *et al.*, 2006).

1.7.1 Parametry krevního obrazu

Při vyšetření krevního obrazu jsou vždy stanoveny a zahrnuty tyto následující parametry, mezi které patří erytrocyty, hemoglobin, leukocyty a trombocyty, o kterých jsem se již zmiňovala v kapitole 1.6.2. Dále do hodnot zahrnujeme hematokrit, který znamená procentuální počet erytrocytů v celkovém množství krve, střední objem erytrocytů (MCV), což značí průměrnou velikost erytrocytu. MCH, hemoglobin v erytrocytu znamená průměrnou hmotnost hemoglobinu v erytrocytu. Dalším parametrem je průměrná koncentrace HGB v erytrocytu (MCHC). Distribuční šíře erytrocytů (RDW) nám udává přehled ve variabilitě ve velikosti erytrocytů. Střední objem trombocytů (MPV) určuje průměrnou velikost trombocytu. U těchto uvedených hodnot společně s doplňujícím vyšetřením krevního obrazu, což je diferenciační rozpočet leukocytů, vymezím nyní jejich referenční meze.

- erytrocyty (RBC)
 - muži: $4,0 - 5,8 \times 10^{12}/l$
 - ženy: $3,8 - 5,2 \times 10^{12}/l$
- hemoglobin (HGB)
 - muži: 130 – 175 g/l
 - ženy: 120 – 160 g/l
- hematokrit (HCT)
 - muži: 0,39 – 0,51
 - ženy: 0,35 – 0,47
- střední objem erytrocytů (MCV): 84 – 96 fl
- hemoglobin v erytrocytu (MCH): 28 – 34 pg
- koncentrace HGB v erytrocytu (MCHC): 320 – 370 g/l
- distribuční šíře erytrocytů (RDW): 10,0 – 15,2 % CV
- trombocyty (PLT): $150 - 350 \times 10^9/l$
- střední objem trombocytu (MPV): 7,8 – 11,0 fl
- leukocyty (WBC): $4,0 - 10,0 \times 10^9/l$
 - neutrofilní segmenty: 45 – 70 %; abs. počet: $2,0 - 7,0 \times 10^9/l$

- neutrofilní tyče: 0 – 4 %; abs. počet: $0,6 - 1,2 \times 10^9/l$
 - lymfocyty: 20 – 45 %; abs. počet: $0,8 - 4,0 \times 10^9/l$
 - monocyty: 2 – 12 %; abs. počet: $0,08 - 1,20 \times 10^9/l$
 - eozinofily: 0 – 5 %; abs. počet: $0,00 - 0,50 \times 10^9/l$
 - bazofily: 0 – 2 %; abs. počet: $0,00 - 0,20 \times 10^9/l$
- (Penka, 2011; Kotačková 2016).

1.7.2 Ovlivnění hodnot

K ovlivnění hodnot krevního obrazu může dojít z mnoha příčin. Vzhledem k mému tématu bakalářské práce se budu nadále zabývat především ovlivněním hodnot červené krevní řady při stanovování krevního obrazu (Kotačková, 2016).

Ovlivnění hodnot červené krevní řady

Při stanovení krevního obrazu může dojít k ovlivnění parametrů červené řady z různých příčin, a to z důvodů krvácivých, maligních nebo infekce, která může být akutní nebo chronická. Je-li zjištěn pokles hodnot červené řady, již tehdy můžeme myslet na diagnózu anémie. Dále může dojít k ovlivnění krevního obrazu protilátkami. Při hodnocení krevního obrazu může na možnou přítomnost chladových protilátek upozornit hlavně snížená hladina erytrocytů a hemoglobinu. Mimo tyto dvě ovlivněné hodnoty se dále abnormálně zvyšuje střední objem erytrocytu (MCV), dále hladina hemoglobinu v erytrocytu (MCH) a koncentrace HGB v erytrocytu (MCHC). To vše je způsobené shlukováním erytrocytů za nižší teploty, než je teplota tělesná. Důležitá je zde preanalytická fáze, která může významně ovlivnit tyto hodnoty (Kotačková, 2016; Dvořáková *et al.*, 2009).

1.8 Anémie – chudokrevnost

Dle Krantze, 1994 jsou anémie nejčastějšími projevy poruchy červených krvinek. Anémie mohou vznikat ze dvou příčin, z primární a sekundární. Sekundární příčinu doprovázejí jiné chorobné stavy. Anémie je tedy doprovodným syndromem jiného onemocnění, například maligní nemoci, krvácení, aj. Snížení koncentrace hemoglobinu v krvi je hlavní kritérium pro určení, zda se jedná o anémii. Pokud hodnoty hemoglobinu neodpovídají hodnotám normálního jedince, můžeme tento stav pokládat za anémii. Toto snížení je často doprovázeno i snížením počtu červených krvinek a hematokritu. Rozlišujeme tři příčiny anémie. První příčinou mohou být krevní ztráty, dále zvýšený zánik erytrocytů a třetí příčinou je nedostatečná tvorba červených krvinek. Tyto příčiny se mohou vyskytovat samostatně nebo v kombinacích (Pecka, 2006).

1.8.1 Autoimunitní hemolytické anémie (AIHA)

Tyto anémie patří do skupiny anémií ze zvýšené destrukce erytrocytů. Společným znakem těchto anémií je zvýšený předčasný zánik erytrocytů, změny tvaru a funkce erytrocytů mohou způsobit jejich předčasné odbourávání neboli hemolýzu (Pecka, 2006).

Autoimunitní hemolytické anémie jsou heterogenní skupina patologických stavů, u kterých zánik červených krvinek způsobuje přítomnost protilátek namířených proti vlastním krvinkám. Důsledek vzniku autoimunitní hemolytické anémie je porucha regulace spolupráce mezi T a B lymfocyty, a to při procesu autotolerance. Autoimunitní hemolytickou anémií trpí přibližně 0,001 % lidí. U primární neboli idiopatické AIHA není znám původ onemocnění, určitá část hemolytických anémií může být sekundární, tu doprovází různé nemoci, infekce, záněty nebo nádorová onemocnění. Příčina hemolýzy však není většinou zjištělná (Pecka, 2006; Penka *et al.*, 2012; Řeháček, 2013; Harmening, 2009).

Klasifikace

Autoimunitní hemolytické anémie rozdělujeme do čtyř kategorií dle teplotní reaktivity protilátek:

- AIHA s tepelnými protilátkami
- AIHA s chladovými protilátkami
- smíšený typ AIHA s tepelnými a chladovými protilátkami
- polékový typ AIHA (Pecka, 2006).

AIHA s tepelnými protilátkami

Autoimunitní hemolytická anémie s tepelnými protilátkami tvoří 80 % všech AIHA. Je to tedy nejčastější příčina hemolytických anémií u dospělých, s mírně zvýšenou frekvencí u žen, než u mužů. Většinový výskyt této anémie je u lidí starších 40 let. U 99 % případů jde o protilátky třídy IgG a jsou polyklonální. Jejich optimum účinnosti je při 37 °C, s poklesem teploty se jejich afinita snižuje. Tyto tepelné protilátky jsou většinou mířené proti antigenům Rh systému. Dělí se na idiopatické a sekundární (Pecka, 2006; Penka *et al.*, 2012; Harmening, 2009).

AIHA s chladovými protilátkami

Výskyt AIHA s chladovými protilátkami je přibližně 1 % všech hemolytických anémií. Optimum účinnosti těchto protilátek je při 0 – 4 °C, reaktivita se však může projevit již pod 7 °C. V tomto případě jde většinou o protilátky třídy IgM, které mají nejčastěji specifitu anti-I, poté méně často anti-i. Tato anémie se dělí na AIHA s vysokým titrem chladových aglutininů a na Paroxysmální chladovou hemoglobinurii (PCHH), (Pecka, 2006; Penka *et al.*, 2012; Harmening, 2009).

Smíšený typ AIHA

Tento smíšený typ AIHA s tepelnými a chladovými protilátkami se vyskytuje asi u 7 % pacientů s autoimunitní hemolytickou anémií. Jde o kombinaci tepelných a chladových protilátek, tomu tedy i odpovídá smíšený laboratorní nález (Penka *et al.*, 2012).

Polékový typ AIHA

Polékový typ AIHA postihuje 12 % pacientů. Tento typ dělíme podle mechanismu působení léků. U těchto anémií působí lék jako stimulator tvorby protilátek proti některým antigenům, dále tvoří imunokomplexy, které se váží na povrch erytrocytů. Lék může také působit jako stimulator tvorby protilátek proti některým antigenům (Pecka, 2006; Penka *et al.*, 2012).

1.9 Chladové protilátky

Chladové protilátky, popřípadě chladové aglutininy (CA) jsou protilátky, které jsou produkovány imunitním systémem a které reagují při nižší teplotě než 37 °C. Většinou to jsou protilátky třídy IgM, jsou kompletní a váží komplement. Pokud je komplement aktivován úplně, dochází k lýze erytrocytů. Pokud však částečně, chladová protilátka se při tělesné teplotě z krvinky uvolňuje. Dále mají schopnost přímo shlukovat (aglutinovat) erytrocyty, jsou tedy chybně mířeny proti vlastním erytrocytům. Reagují optimálně s erytrocyty při teplotě, která je nižší než tělesná. Pokud by však došlo za přítomnosti chladových protilátek k výrazné destrukci erytrocytů, následovala by hemolytická anémie se sníženým počtem RBC a hemoglobinu. Tato vskutku vzácná forma autoimunitní hemolytické anémie je spíše známa pod jiným názvem, a to nemoc chladových aglutininů. Nemoc může mít dvě formy - primární a sekundární (Řeháček *et al.*, 2013; Chladové aglutininy, 2014; Penka, 2001; Cold Agglutinins Test, 2014).

Primární typ nemoci, neboli idiopatická forma, postihuje nejvíce lidi ve středním a pokročilém věku a má tendenci překlenout v dlouhodobou – chronickou. Sekundární, symptomatická, forma nemoci však může postihnout člověka v jakémkoliv věku a může mít akutní i chronický průběh. Anémie rozeznáváme ve vyšším a nižším stupni a mohou souviset s celou škálou chorob, jakož jsou například:

- *infekce vyvolané Mycoplasma pneumoniae* – u této infekce je u více než 75 % pacientů zvýšená hladina chladových protilátek

- *infekční mononukleóza* – u více než 60 % pacientů má zvýšený titr chladových aglutininů
- *hematologické a jiné malignity*, a další

Díky včasnému upozornění pečlivé a všímavé laborantky na možnou přítomnost chladových protilátek v krvi pacienta lze zachytit jiná závažnější onemocnění, která mohou souviset právě s chladovými protilátkami. Je zde také velice důležitá spolupráce a komunikace mezi laboratořemi a lékaři (Cold Agglutinins Test, 2014).

Oproti dřívější době, se dnes vyšetření chladových aglutininů běžně neprovádí. V minulosti bylo toto testování součástí chorob, u kterých se mohou chladové protilátky vyskytovat, jako například u již zmíněné infekce *Mycoplasma pneumoniae* (Řeháček *et al.*, 2013; Chladové aglutininy, 2014).

Při již zmíněných infekcích u syndromu chladových aglutininů jde o protilátky polyklonální, a to s titrem nejčastěji do 2000, prakticky pokaždé se aktivuje komplement (C3d pozitivní PAT). Oproti tomu u primární formy jsou protilátky monoklonální s vysokým titrem přes 2000. U chladových protilátek jsou antigeny I/i nejčastější specificitou. Specificitu anti-I mají protilátky IgM v 90 %, anti-i v 10 %. Další specificita může být kupříkladu rozdílná reaktivita s nativními a upravenými erytrocyty, které jsou upravené proteázami, dále zde není příliš zjevná souvislost se systémy krevních skupin (Řeháček *et al.*, 2013, Pecka, 2006).

1.9.1 Odběr

Jednou z částí preanalytické fáze je odběr vzorku, který se provádí za přísných podmínek, mezi které patří co nejrychlejší transport a určité teplotní rozmezí. Vzorek musí být vyšetřen ihned po doručení do laboratoře. Pro zachování kvality vzorku není před vyšetřením nutná žádná příprava pacienta. Takto by měl probíhat odběr vzorku při vědomí přítomnosti chladových protilátek v krvi (Chladové aglutininy, 2014).

Ve fázi přípravy vzorku a následného transportu se nejčastěji objevují komplikace kvůli charakteru právě chladových protilátek, dále také v testech při teplotě nižší než 37 °C, jakož je určování AB0, detekce Ag, IgM diagnostiky, a další. Při odběru

a transportu vzorku je nutné dodržovat postupy, které zamezí vlivu snížené teploty na vyšetření (teplota místnosti a odběrových nádob, oddělení plazmy a erytrocytů za tepla, transport v termoboxu do laboratoře a jiné), to vše pro správnou reprodukovatelnost a interpretaci. U většiny případů se na možnou přítomnost chladových protilátek přijde víceméně náhodně při stanovování krevního obrazu z nějakého jiného důvodu, a to díky ovlivnění preanalytickou fází. U těchto pacientů není brán zřetel na možnou přítomnost CA v krvi, proto nejsou transportní nároky tak specifické. Vzorky se do laboratoře sváží v transportních boxech při teplotě 2 – 8 °C do určité doby. Tím dochází k aglutinaci erytrocytů a k obtížnému stanovení krevního obrazu (Řeháček *et al.*, 2013).

1.9.2 Vyšetření

Vyšetření je požadováno v případě, že má člověk reakci po expozici nízkých teplot a vykazuje určité příznaky hemolytické anémie. Tyto příznaky mohou být v podobě slabosti, únavy, bledosti, závratě a bolesti hlavy, dále to může být žloutenka, zvětšení sleziny a jater. Příznakem ve spojitosti po kontaktu s chladem je cyanotické bolestivé zbarvení doprovázené znecitlivěním terminálních částí těla, a to prstů na ruce a nohou, uší a nosu. To je způsobené aglutinací červených krvinek s nízkou teplotou krve (Chladové aglutininy, 2014; Penka, 2001; Adam *et al.*, 2007; Kavanagh, 2014).

Jak už bylo v této práci uvedeno, vyšetření se používá k diagnostice nemoci CA a následně ke zjišťování příčiny hemolytické anémie. Jedná se o test, který následuje po vyšetření krevního obrazu, kde byly prokázány nesrovnalosti hodnot červené krevní řady, především pokud mohl být pacient vystaven chladu. Právě toto vyšetření je hlavním tématem této práce, ve kterém se jedná o samotný možný záchyt pravděpodobné přítomnosti chladových protilátek v hematologické laboratoři (Chladové aglutininy, 2014; Dvořáková *et al.*, 2009; Kavanagh, 2014).

Princip testu spočívá v sérii postupného ředění krevního vzorku, který je poté ochlazován na obvyklé 4 °C. Následný výsledek se udává jako titr ředění, což je nejvyšší ředění za stavu, kdy jsou erytrocyty ještě rozpoznatelné. Záleží tedy na síle protilátek. Jak již bylo několikrát zmíněno, chladové protilátky erytrocyty v chladu

viditelně shlukují, ovšem po zahřátí vzorku se shluky rozpouští. U jednotlivých CA se teplotní rozmezí, ve kterém protilátky reagují, může lišit (Chladové aglutininy, 2014; Cold Agglutinin Titer, Serum, 2014).

1.9.3 Výsledek vyšetření

Samotný výsledek vyšetření CA je typicky ve formě titru, 1:64 nebo 1:512. Tyto výsledné hodnoty nám udávají množství protilátek v krvi, tudíž se stoupající hodnotou počet protilátek stoupá a naopak. V momentě výskytu vyššího titru a současné reaktivitě protilátek při vyšší teplotě by se mohla očekávat hemolytická anémie, ovšem s horšími klinickými projevy. Stupeň hemolytické anémie a hemolýzy erytrocytů se však může lišit u každého pacienta, stejně tak jako jejich příznaky a projevy po jednotlivých expozicích chladu. Některé choroby, jako např. mononukleóza, mohou být velice často sdruženy se zvýšením CA, ale velmi výjimečně s anémií (Chladové aglutininy, 2014; Thomson, 2014; Cold Agglutinin Titer, Serum, 2014).

1.9.4 Léčba

Lékař určuje následnou léčbu podle příčiny výskytu chladových protilátek. Nejvíce užívaným lékem u většiny nemocných je podávání kortikosteroidů. Účinnost kortikosteroidů spočívá ve změně alterací exprese a funkce receptorů Fc fragmentu imunoglobulinu na povrchu makrofágů. To způsobí potlačení odstraňování erytrocytů s navázanou protilátkou z cirkulace. Mimo jiné mohou kortikosteroidy tlumit produkci protilátek a snižovat tím jejich hromadění. Oproti tepelným protilátkám je efektivita podávání kortikosteroidů o mnoho nižší. Procento efektivity je podle norské studie necelých 15 % u nemocných. Dávkování samozřejmě závisí na stupni hemolýzy či anémie (Čermák, 2012). Avšak účinnou, někdy i zcela dostatečnou prevencí v mnoha případech je ochrana pacienta před vystavováním se nízkých teplot, dále nošení vhodného oblečení a dostatečná informovanost (Penka, 2001; Kavanagh, 2014).

Cíle práce

1. Upozornění na možnost ovlivnění hodnot krevního obrazu chladovými protilátkami.
2. Praktické laboratorní metody – měření hodnot krevního obrazu na hematologickém analyzátoru firmy Abbott.
3. Ovlivnění výsledků preanalytickou fází stanovování chladových protilátek.
4. Vyhodnocení a získání výsledků stanovování chladových protilátek přibližně u 20 pacientů.

2 METODIKA

Praktickou část své bakalářské práce jsem vykonávala v Biochemicko-hematologické laboratoři Stafila, s. r. o., která sídlí v Českých Budějovicích. Laboratoř má vlastní odběrová místa v Českých Budějovicích, Strakonících, Vodňanech, Třeboni a Kaplici. Tato odběrová místa zajišťují požadavky preanalytické fáze. Vedoucí laboratoře je MUDr. Marie Ládová, která je zároveň vedoucí mé bakalářské práce. Při práci na mne dohlížela Bc. Romana Sladká. Laboratoř, kde jsem prováděla praxi, se dělí na tři úseky, a to biochemický, hematologický a mikrobiologický. Laboratoř Stafila je akreditována Českým institutem pro akreditaci, o. p. s., ČSN EN ISO 15189: 2007. Stafila funguje jako denní laboratoř. Tato laboratoř spolupracuje s lékaři z celého Jihočeského kraje. Z tohoto důvodu probíhá svoz biologického materiálu i vícekrát denně. Do laboratoře jsem docházela během mého studia na vysoké škole, po domluvě s vedoucí laboratoře ohledně vzorků vhodných pro tuto práci. Během mého trvání v této laboratoři jsem provedla měření krevního obrazu 24 vzorků na multiparametrickém plně automatizovaném hematologickém analyzátoru firmy Abbott, CELL-DYN Ruby. Bližší informace k tomuto přístroji uvádím v další kapitole.

2.1 Specifikace analyzátoru CELL-DYN Ruby

Jak jsem již zmínila v předchozí kapitole při uvedení tohoto přístroje, jedná se o multiparametrický automatický hematologický analyzátor určený pro diagnostiku *in vitro* v klinických laboratořích (viz. Příloha č. 1). Analyzátor využívá technologii zvanou MAPSS, což je separace polarizovaného rozptýleného světla pod různými úhly, dále využívá laserovou průtokovou cytometrii a moderní software. Systém CELL-DYN Ruby používá Microsoft Windows jako svůj operační systém. Dále využívá USB k propojení k datovému modulu, které zároveň poskytuje rozhraní například pro tiskárnu. Nechybí zde ani standardní ruční čtečka čárových kódů pro rychlou identifikaci vzorků od pacientů (ABBOTT Diagnostics Division, 2009).

System je určen k analýze krve odebrané do antikoagulantu EDTA a také k měření následujících hematologických parametrů:

- **parametry bílých krvinek**

WBC: NEU, %N, LYM, %L, MONO, %M, EOS, %E, BASO, %B

- **parametry krevních destiček**

PLT, MPV

- **parametry červených krvinek**

RBC, HCT, MCV, RDW, %R, RETC,

- **parametry hemoglobinu**

HGB, MCH, MCHC (ABBOTT Diagnostics Division, 2009).

Postup zpracování vzorků

Přístroj CELL-DYN Ruby využívá dva režimy vkládání vzorku do analyzátoru, a to uzavřený a otevřený režim. Uzavřený režim je určen pro vakuové zkumavky, otevřený režim slouží pro nevakuové zkumavky. Ve zmíněném otevřeném režimu analyzátor nasává vzorek z otevřené zkumavky, kterou otevřela a dále podává obsluha. Po celou dobu jsem pracovala v režimu uzavřeném. Zpracování vzorků v uzavřeném režimu probíhá pomocí podavače vzorků, jenž je připojen k přední části analyzátoru. Používá se k promíchání a nasávání krve přímo ze zkumavky, a to propíchnutím jejího uzávěru. Podavač vzorků umožňuje vložení až 50 vzorků v uzavřených zkumavkách, tím dochází k nejmenšímu kontaktu s infekčním materiálem. Laser uvnitř analyzátoru přečte čárové kódy umístěné na jednotlivých zkumavkách, čárový kód obsahující číslo stojánku (viz. Příloha č. 2) a pozici zkumavky. V dalším kroku součásti podavače 10x promíchají krev ve zkumavce a dále přesouvají zkumavky přes oblast zpracování vzorků (ABBOTT Diagnostics Division, 2009).

Volba testu

V přístroji CELL-DYN jsou dostupné čtyři volby testu, a to CBC, CBC + NOC, CBC + RRBC a RETIC. Já jsem využívala test CBC, což znamená celkový počet krevních buněk (ABBOTT Diagnostics Division, 2009).

Součásti systému

Systém CELL-DYN se skládá z těchto tří hlavních modulů: analyzátor, datový modul a plochý monitor. Analyzátor i datový modul jsou společné oproti monitoru, který je jako samostatný modul. Analyzátor obsahuje hardware pro promíchání, nasávání, dále ředění a analýzu jednotlivých vzorků. Datový modul obsahuje součásti pro analýzu, uchovávání a následné vydávání výsledků vyšetření vzorků. Poslední plochý monitor obsahuje dotykovou obrazovku, která slouží k lepšímu uživatelskému rozhraní (ABBOTT Diagnostics Division, 2009).

Způsoby měření

Přístroj CELL-DYN využívá dva způsoby měření, které jsou na sobě nezávislé. První měření se nazývá Optické měření pro stanovení WBC, NOC a RBC/PLT, druhé Měření pomocí kanálu pro hemoglobin pro stanovení HGB. V rámci každého cyklu před měřením jednotlivých parametrů dochází k nasátí, zředění a promíchání vzorku. Do počítače datového modulu jsou přenesena všechna data, kde jsou následně analyzována. Výsledky všech parametrů jsou zobrazeny na obrazovce Run, neboli zpracování, dále jsou uloženy v souboru Data Log (datový soubor), (ABBOTT Diagnostics Division, 2009).

Průtoková cytometrie

Průtokovou cytometrii využívá CELL-DYN pro analýzu populací RBC/PLT, NOC a WBC. Je to proces, během kterého jsou jednotlivé buňky a jiné částice v proudu kapaliny protínány světelným paprskem. Senzor pak měří chemické a fyzikální vlastnosti buněk a částic pomocí rozptylu nebo ztráty světla. Průtoková cytometrie

poskytuje kvantitativní analýzu buněk a dále poskytuje rychlý screening velkého množství buněk (ABBOTT Diagnostics Division, 2009).

Histogramy

Histogramy jsou grafická znázornění jednotlivých naměřených částic.

2.2 Pracovní pomůcky

- ochranné rukavice
- K₃EDTA zkumavky
- stojánky
- míchačka
- analyzátor CELL-DYN Ruby
- podložní skla + nátěrová skla
- pipeta – kapátko
- mikroskop Olympus BX50
- barvení dle Romanowského

2.3 Průběh vlastního měření

Veškeré kroky, které jsem během mého měření provedla, byly v plném souladu dle standardních operačních postupů laboratoře Stafila, s. r. o. Praktickou část mé bakalářské práce jsem začala na příjmu materiálu. Pracovník svozu přivezl materiál v transportních boxech s teplotou 2 – 8 °C. Materiál jsem vyjmula z boxů a následně roztřídila. K odebranému materiálu jsem přiřadila žádanky dle těchto kritérií, a to jména, příjmení a rodného čísla. Roztříděný materiál byl zadán do počítačového programu Infolab vyškolenými pracovníky laboratoře. Po zadání žádanek do systému byl vytištěn příslušný čárový kód. Tento kód byl nalepen na patřičnou žádanku a zkumavku vyškoleným pracovníkem. Zadaná data se poté s požadovanými vyšetřeními předávají na jednotlivá oddělení systémem Infolab. Tam se materiál dále

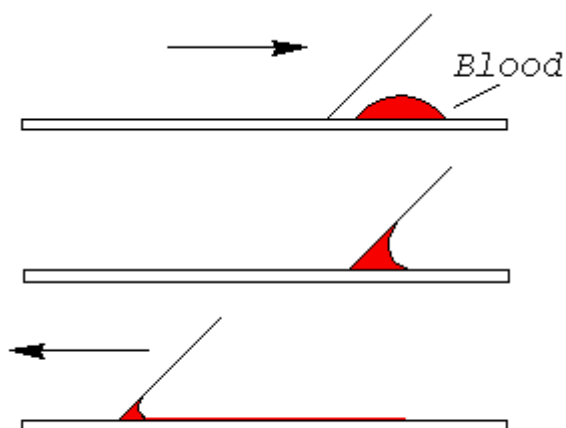
vyšetřuje již pod čárovým kódem. Nejen mou vlastní zkušeností jsem se přesvědčila, že práce na příjmu musí být velice pečlivá a zodpovědná. Vzniklá chyba při rozřazování a zadávání do systému by mohla mít fatální následky, především pro pacienta, proto musí být pracovníci velmi pozorní a důkladní. Díky tomuto přístupu, má laboratoř Stafila, s. r. o. nejmenší výskyt reklamací.

Zkumavky se zadanými požadavky a nalepenými čárovými kódy jsem ve stojánku odnesla na úsek hematologie. Své měření jsem provedla pod dozorem laborantky. Vyšetřované zkumavky K₃EDTA jsem vložila na míchačku zkumavek, kde se vyšetřovaný materiál promíchá. Po promíchání jsem zkumavky postavila do stojánku a vložila do analyzátoru, u kterého laborantka, každé ráno po zapnutí, provádí vnitřní kontrolu kvality pomocí kontrol, a to vždy před vlastním měření vzorků. Dané kontroly, HIGH, LOW a NORM s určitými hodnotami, laboratoři dodává firma Abbott s příslušným příbalovým letákem. Dále jsem stiskla tlačítko start. Došlo k měření krevního obrazu v uzavřeném režimu. Podavač analyzátoru 10x promíchal jednotlivou zkumavku. Pomocí jehly propíchl víčko a nasál stanovené množství vyšetřovaného materiálu. Poté se všechna naměřená data přenesla do počítače datového modulu, kde byly analyzovány. Pomocí histogramů se na monitoru počítače datového modulu zobrazila naměřená data (viz. Tabulka č. 1), která se zároveň přenesla do LIS (laboratorní informační systém), tam se přiřadila k příslušnému pacientovi. Tyto histogramy jsem si následně vytiskla.

Následně jsem provedla kontrolu naměřených hodnot, u kterých jsem zaměřila právě na hodnoty červené krevní řady. U 4 pacientů byly naměřené neobvyklé hodnoty červené krevní řady, především abnormálně vysoké hodnoty MCH a MCHC, dále snížená hodnota erytrocytů (viz. Tabulka č. 2, 3, 4 a 5). Právě tyto neobvyklé hodnoty mohou značit možnou přítomnost chladových protilátek, tudíž možný záchyt CA. A tak jsem následně provedla u těchto 4 pacientů nátěr na sklo.

Ten jsem provedla následujícím způsobem, a to takovým, že jsem v rukavicích uchopila a následně promíchala první zkumavku ze čtyř. Po promíchání jsem zkumavku otevřela a pipetou - kapátkem odebrala malé množství krve. Kapku krve jsem kápala na jeden konec podložního skla. Roztírací sklo jsem sunula od středu skla podložního ke

kapce krve, kdy při jejím kontaktu s roztíracím sklem dojde k rozprostření krve po celé šířce hrany skla. Dále jsem roztíracím sklem provedla rovnoměrný jednolitý nátěr (viz obr.). Úhel roztěru musí vždy být 45°. Takto zhotovený nátěr jsem nechala 10 minut zaschnout při laboratorní teplotě. Takto zaschlý nátěr jsem zafixovala Mayovým-Grünwaldovým roztokem, obsahující metanol. V dalším kroku jsem provedla barvení roztokem Giemsa-Romanowského. Nátěry jsou oplachovány mezi jednotlivými kroky barvení fosfátovým pufrem pH 6,8 a nakonec vodou.

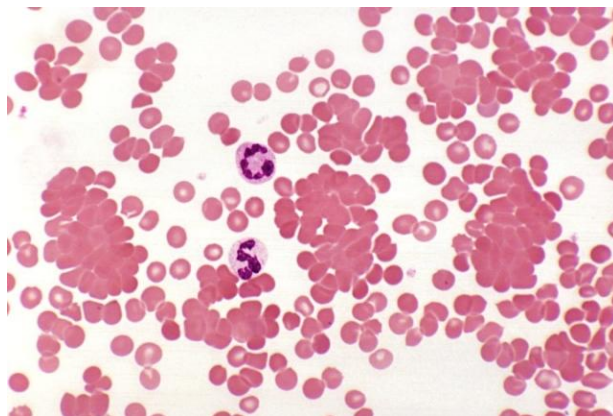


Obrázek č. 6: Znázornění nátěru, (převzato a upraveno z Great Scopes, 2016)

Základem barvení je metylenová modř. Dále to mohou být i její oxidační produkty, jako například eozin B, eozin Y a azur B. Kationtové nebo zásadité složky barev se v pufrovaném barvicím roztoku váží na aniontové složky. Ty pak dávají modrošedá zbarvení nukleových kyselin, granul bazofilů a neutrofilů a jiným. Naopak na kationtové složky se váží kyselé a aniontové složky barev (např. eozin Y), tím udávají hemoglobinu a eozinofilním granulám červenooranžová zbarvení. Celkové barvení tedy udává celkový vzhled nátěru (Penka, 2011).

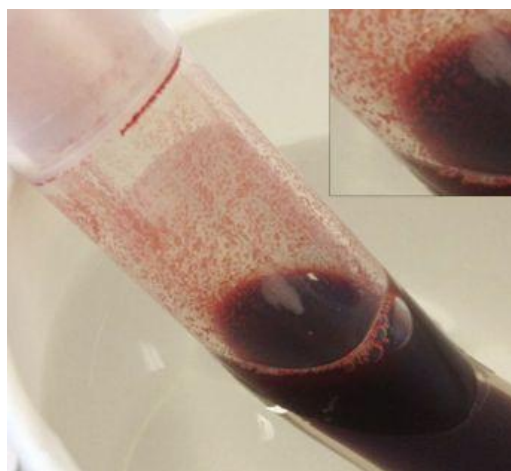
Standardní hodnocení nátěru periferní krve se týká relativního počtu dílčích podtříd leukocytů. Dále počtu schistocytů a trombocytů na 1000 erytrocytů a morfologického zhodnocení erytrocytů, leukocytů a trombocytů (Penka, 2011).

Vlastní vyšetření jsem započala přehledným zhodnocením nátěru a následným hodnocením buněk pod mikroskopem Olympus. Vzhledem k naměřeným hodnotám jsem se zaměřila na erythrocyty, kdy již při prvním náhledu v mikroskopu byla patrná výrazná aglutinace červených krvinek (viz Obrázek č. 4), která může značit právě možnou přítomnost chladových protilátek.



Obrázek č. 7: Znázornění aglutinace erythrocytů pomocí mikroskopu (převzato a upraveno z Pathology Student, 2009)

Aglutinace bylo možné si však všimnout již před zhotovením nátěru na sklo na stěně zkumavky (viz Obrázek č. 5).



Obrázek č. 8: Znázornění aglutinace erythrocytů, (převzato a upraveno z Blood Journal, 2013)

Celý postup mé práce jsem prováděla pod dohledem laborantky i u zbylých třech pacientů. V důsledku naměřených neobvyklých hodnot červené krevní řady a výrazné aglutinaci na skle se výsledky všech naměřených hodnot vyhodnotily pod pojmem: nelze stanovit. Pod tyto výsledky laborantka udala komentář, a to: KO nelze stanovit, pravděpodobnou příčinou je možná přítomnost nepravidelných chladových protilátek v plazmě pacienta, pokud chcete KO stanovit, musí být změřen ihned po odběru krve pacienta (viz. Tabulka č. 2, 3, 4 a 5). Takto vyhodnocené výsledky byly předány ke kontrole lékaři, který je odsouhlasil. Dále byly výsledky vytištěny a pomocí svozu odeslány k příslušným lékařům, kteří si vyšetření vyžádali. Většině lékařů byly výsledky odeslány také elektronicky.

U třech pacientů bylo stanovení krevního obrazu zopakováno ihned po odběru pacienta, kdy se pacienti na doporučení dostavili do odběrové místnosti laboratoře Stafila s. r. o. Po zpracování krevního obrazu byly naměřené hodnoty vydány lékaři. Čtvrtý pacient se zatím nedostavil.

V případě takto odhaleného možného výskytu nepravidelných chladových protilátek je potřeba dovyšetřit pacienta na imunologii nebo na transfuziologii. Zde se provádí přesné měření chladových protilátek pomocí titrace a ředění.

3 VÝSLEDKY

Tabulka č. 1: Naměřené hodnoty červené krevní řady v KO u 24 pacientů na možnou přítomnost chladových protilátek.

Číslo vzorku	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDW	Přítomnost chladových protilátek
	4.00 - 5.20 [10 ⁶ /l]	120 - 160 [g/l]	37 - 47 [%]	80 - 100 [fl]	26 - 34 [pg]	310 - 370 [g/l]	10.0 - 15.2 [%]	
1.	4.44	124	39,5	89.1	28.0	314	13.4	nepřítomny
2.	4.30	134	42,1	97.9	31.2	318	13.7	nepřítomny
3.	4.58	135	41,3	90.3	29.5	327	12.7	nepřítomny
4.	5.13	162	49,2	96.0	31.6	329	12.2	nepřítomny
5.	4.90	151	43,7	89.2	30.8	345	11.9	nepřítomny
6.	4.38	138	42,3	96.7	31.6	327	13.4	nepřítomny
7.	5.29	150	48,3	91.2	28.3	311	14.2	nepřítomny
8.	4.76	131	39,4	82.8	27.5	332	13.1	nepřítomny
9.	4.81	128	40,7	84.7	26.6	315	13.5	nepřítomny
10.	5.18	161	46,7	90.3	31.1	345	12.0	nepřítomny
11.	5.36	117	38,0	70.8	21.7	307	18.5	nepřítomny
12.	4.15	124	36,2	87.1	29.8	342	11.5	nepřítomny
13.	4.04	111	34,2	84.7	27.5	325	14.4	nepřítomny
14.	4.37	122	37,7	86.2	28.0	325	12.5	nepřítomny
15.	4.56	89.3	29,7	65.2	19.6	301	16.7	nepřítomny
16.	4.80	132	40,2	83.7	27.5	329	12.8	nepřítomny
17.	4.71	141	43,2	91.8	30.0	327	13.1	nepřítomny
18.	4.08	127	37,9	92.8	31.0	334	12.5	nepřítomny
19.	4.58	128	39,2	85.6	27.9	326	13.0	nepřítomny
20.	5.19	156	46,1	88.8	30.1	339	12.6	nepřítomny
21.	nelze stanovit							možná přítomnost
22.	nelze stanovit							možná přítomnost
23.	nelze stanovit							možná přítomnost
24.	nelze stanovit							možná přítomnost

Tabulka č. 2: Naměřené hodnoty v KO u pacienta s číslem vzorku 21. na možnou přítomnost chladových protilátek.

Číslo vzorku 21. – ŽENA 1952							
	<i>RBC</i>	<i>HGB</i>	<i>HCT</i>	<i>MCV</i>	<i>MCH</i>	<i>MCHC</i>	<i>RDW</i>
	4.00 – 5.20 [10 ^{e12/l}]	120 - 160 [g/l]	37 - 47 [%]	80 - 100 [fl]	26 – 34 [pg]	310 – 370 [g/l]	10.0 – 15.2 [%]
<i>1. měření</i>	2.30	122	20.80	90.3	52.9	586	14.5
<i>Komentář</i>	Možná přítomnost nepravidelných chladových protilátek (vydáno jako nelze stanovit)						
<i>2. měření</i>	4.36	132	37.97	87.1	30.3	348	11.9
<i>Komentář</i>	KO zhotoven ihned po odběru (výsledky vydány)						

Tabulka č. 3: Naměřené hodnoty v KO u pacienta s číslem vzorku 22. na možnou přítomnost chladových protilátek.

Číslo vzorku 22. – MUŽ 1932							
	<i>RBC</i>	<i>HGB</i>	<i>HCT</i>	<i>MCV</i>	<i>MCH</i>	<i>MCHC</i>	<i>RDW</i>
	4.00 – 5.20 [10 ^{e12/l}]	120 - 160 [g/l]	37 - 47 [%]	80 - 100 [fl]	26 – 34 [pg]	310 – 370 [g/l]	10.0 – 15.2 [%]
<i>1. měření</i>	2.14	101	22.9	107	47.1	440	13.4
<i>Komentář</i>	Možná přítomnost nepravidelných chladových protilátek (vydáno jako nelze stanovit)						
<i>2. měření</i>	2.93	115	31.22	106.7	39.2	368	13.7
<i>Komentář</i>	KO zhotoven ihned po odběru (výsledky vydány)						

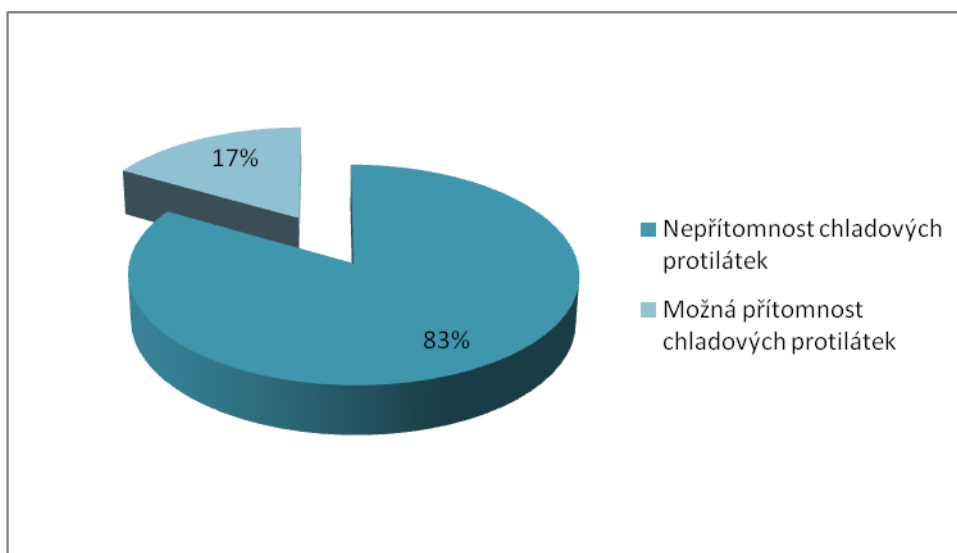
Tabulka č. 4: Naměřené hodnoty v KO u pacienta s číslem vzorku 23. na možnou přítomnost chladových protilátek.

Číslo vzorku 23. – MUŽ 1942							
	<i>RBC</i>	<i>HGB</i>	<i>HCT</i>	<i>MCV</i>	<i>MCH</i>	<i>MCHC</i>	<i>RDW</i>
	4.00 – 5.20 [10 ^{e12/l}]	120 - 160 [g/l]	37 - 47 [%]	80 - 100 [fl]	26 – 34 [pg]	310 - 370 [g/l]	10.0 – 15.2 [%]
<i>1. měření</i>	4.03	148	40	102	41.2	405	13.3
<i>Komentář</i>	Možná přítomnost nepravidelných chladových protilátek (vydáno jako nelze stanovit).						
<i>2. měření</i>	4.77	159	45.90	96.1	33.3	346	13.0
<i>Komentář</i>	KO zhotoven ihned po odběru (výsledky vydány).						

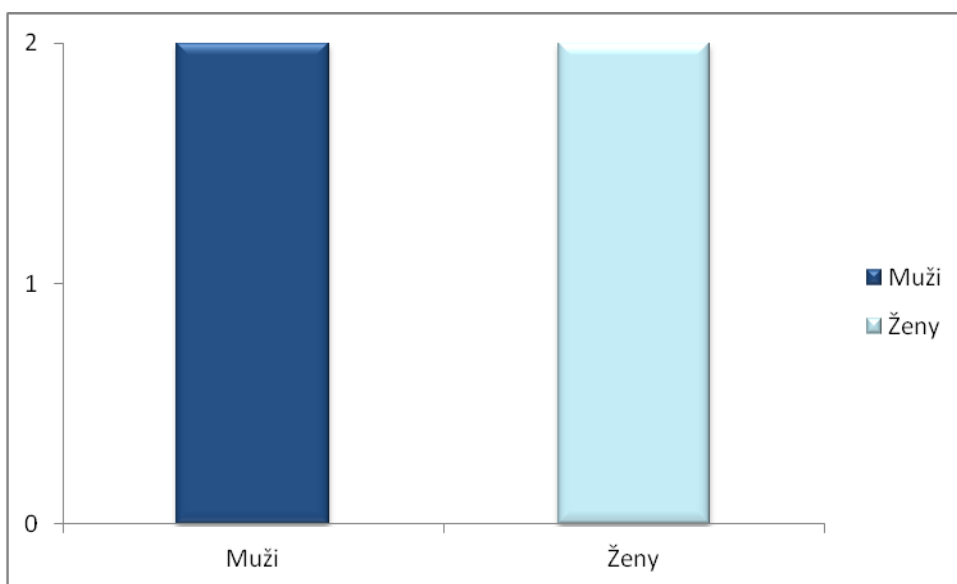
Tabulka č. 5: Naměřené hodnoty v KO u pacienta s číslem vzorku 24. na možnou přítomnost chladových protilátek.

Číslo vzorku 24. – ŽENA 1948							
	<i>RBC</i>	<i>HGB</i>	<i>HCT</i>	<i>MCV</i>	<i>MCH</i>	<i>MCHC</i>	<i>RDW</i>
	4.00 – 5.20 [10 ^{e12/l}]	120 - 160 [g/l]	37 - 47 [%]	80 - 100 [fl]	26 – 34 [pg]	310 - 370 [g/l]	10.0 – 15.2 [%]
<i>1. měření</i>	2.79	143	22.90	82.1	51.2	624	13.8
<i>Komentář</i>	Možná přítomnost nepravidelných chladových protilátek (vydáno jako nelze stanovit).						
<i>2. měření</i>	/	/	/	/	/	/	/
<i>Komentář</i>	Pacient se zatím nedostavil na odběr do laboratoře.						

Graf č. 1: Procentuální vyjádření stanovení KO pro zjištění možné přítomnosti chladových protilátek u 24 pacientů.



Graf č. 2: Zastoupení mužů a žen při možné přítomnosti chladových protilátek.



4 DISKUZE

Přítomnost chladových protilátek v krvi se vyznačuje tím, že při vystavení se chladu dochází ke shlukování erytrocytů. To se může projevit zbarvením koncových částí těla, ale také to může být příčina autoimunitní hemolytické anémie, která může být doprovázena jiným závažným onemocněním. Díky těmto ne příliš výrazným příznakům pacient dlouhou dobu neví, že je nemocný. Na možnou přítomnost těchto protilátek u pacientů se většinou přijde náhodně při rutinním stanovení krevního obrazu, který byl lékařem vyžádán z jiného důvodu. Dle Řeháčka *et al.*, 2013 se nemoc vyskytuje ve dvou formách, a to v primární a v sekundární formě. Primární, neboli idiopatická forma se vyskytuje u lidí ve středním a pokročilém věku a může překlenout ve formu chronickou. Sekundární, symptomatická, forma však může postihnout člověka v jakémkoliv věku a může mít akutní i chronický průběh.

Mé měření spočívalo v analýze 24 vzorků krve pacientů, u kterých jsem stanovila krevní obraz na analyzátoru firmy Abbott. Do tabulky č. 1 jsem zanesla naměřené výsledky krevního obrazu u hodnot červené řady, konkrétně to jsou hodnoty RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC a RDW. Zaměřila jsem se však na hodnoty červené krevní řady, které mohou značit možnou přítomnost chladových protilátek, a to snížená hodnota RBC a HCT, a zvýšená hodnota MCH a MCHC. U dvaceti pacientů nebyla prokázána možná přítomnost chladových protilátek. U zbylých 4 pacientů byly výsledky již zmíněných hodnot naměřeny velice nestandardně, mimo laboratorní referenční meze, které jsou uvedené ve všech tabulkách. Hodnoty dle Penky, 2011, které jsou uvedeny v bodě 1.7.1, se od již zmíněných laboratorních mezí liší jen minimálně. Takto neobvykle naměřené hodnoty mohou značit možnou přítomnost chladových protilátek. Tyto hodnoty se ve výsledcích vydávají pod pojmem nelze stanovit, dále se připisuje komentář o možné přítomnosti chladových protilátek. Pokud lékař chce stanovit krevní obraz, pacient se musí dostavit přímo do odběrové místnosti laboratoře, kde se krevní obraz stanoví ihned po odběru. Tři ze čtyř pacientů se dostavili na odběr do laboratoře, následně byl krevní obraz ihned stanoven. Díky tomuto opatření byly hodnoty červené řady již naměřeny a vydány lékaři, který nechá dovyšetřit

pacienta na imunologii nebo transfuziologii, kde se provádí přesné měření chladových protilátek pomocí titrace a ředění. V případě potvrzení přítomnosti chladových protilátek následuje příslušná léčba pacienta.

V této souvislosti bych ráda uvedla kazuistiku, kterou mi poskytla MUDr. Marie Ládová ze své hematologické ordinace. Jedná se o pacientku ve věku 64 let, která v zimním měsíci prodělala zápal plic s vysokými teplotami, při hospitalizaci v nemocnici byla přeléčena antibiotiky. Po čase si však pacientka stěžuje na vyrážku na obličeji a rukou v chladném počasí. Tento samý stav následoval i při cestě k ošetřujícímu lékaři. Při čekání v čekárně však vyrážka vymizela, dále v ordinaci byla pacientka bez potíží a objektivního nálezu. Pacientce byla následně odebrána krev na vyšetření. Do laboratoře byl vzorek dovezen obvyklým svozem v transportních boxech s dodržáním preanalytické fáze. Po zpracování krevního obrazu byla prokázána nízká hodnota erytrocytů a hemoglobinu, avšak objem červených krvinek byl v normě. Z tohoto důvodu byla pacientka poslána na Interní ambulanci, kde byl změřen kontrolní krevní obraz ihned po náběru krve s normálními hodnotami. Pacientka si nadále stěžovala na vyrážku s modravým zbarvením, která se zlepšovala v teplejších prostorech. V tento okamžik bylo vysloveno podezření na chladové protilátky. Další vyšetření bylo provedeno ihned po odběru – měření po odběru v normě, po stání v chladničce postupný pokles erytrocytů, hemoglobinu a hematokritu při zachování objemu červené krvinky. Následné vyšetření na transfuzním oddělení v Č. Budějovicích prokázalo známky autoimunitní hemolýzy z chladových protilátek. Pozitivní přímý antiglobulinový test ukázal na aktivovaný komplement. V séru se vyskytly silné chladové protilátky účinné při 4 °C i 20 °C. V nepřímém antiglobulinovém testu reagovaly přítomné autoprottilátky i při 37 °C, specifita protilátek byla anti-I. Pacientka byla následně zaléčena vysokými dávkami kortikoidů. Po měsíčním odstupu došlo k výraznému zlepšení nálezu autoimunitní hemolýzy. Přímý antiglobulinový test jen slabě pozitivní s titrem o 4 řády nižší. Následující kontrola byla provedena po 6 měsících, tentokrát s negativním antiglobulinovým testem a s titrem pod hranicí významnosti. Během roku byly pacientce postupně vysazeny kortikoidy, potíže s vyrážkou vymizely. Od té doby je pacientka klinicky bez obtíží.

Nejen z obsahu kazuistiky vyplývá, že je zde velice důležitá preanalytická fáze, která zapříčiní ovlivnění hodnot krevního obrazu. Pacientovi je odebrán vzorek svým praktickým lékařem, který v daný okamžik neví o možném výskytu chladových protilátek. Odebraný vzorek je tedy pracovníkem svozu dopraven do laboratoře klasickým způsobem. Vzhledem k době transportu a nízké teplotě v transportních boxech dochází k aglutinaci erytrocytů (2 – 8 °C). Proto je nutné stanovit krevní obraz ihned po odběru pacienta.

V grafu č. 1 jsem uvedla procentuální vyjádření stanovení krevního obrazu pro zjištění možné přítomnosti chladových protilátek. Z 24 pacientů byla u 83 % zjištěna nepřítomnost chladových protilátek, u zbylých 17 % byl pravděpodobný záchyt možné přítomnosti chladových protilátek. V grafu č. 2 je znázorněno zastoupení mužů a žen při možné přítomnosti chladových protilátek. Zjištěné zastoupení bylo v poměru 2:2.

Dle mého názoru, je velice důležité, aby lidé brali zřetel na možnou přítomnost chladových protilátek při již zmíněných možných příznacích. A to z důvodu, že přítomnost chladových protilátek může odhalit možný výskyt jiných závažnějších onemocnění.

5 ZÁVĚR

Tématem této práce byl možný záchyt přítomnosti chladových protilátek v hematologické laboratoři. Chladové protilátky jsou protilátky, kterým se nevěnuje příliš pozornosti, přitom souvisí se spoustou jiných závažných onemocnění. Z tohoto důvodu by se záchyt chladových protilátek neměl podceňovat. I přes tuto závažnost možné přítomnosti není veřejnost podle mého názoru dostatečně informovaná. V současné době se však mnoho lékařů a specialistů touto problematikou zabývá. Mnohdy, a to vím i z mé zkušenosti, dochází k upozornění na možný záchyt díky znalosti, pečlivosti a pozornosti laborantky při stanovování krevního obrazu.

Můj výzkum spočíval v měření krevního obrazu na možnou přítomnost chladových protilátek u náhodně vybraných 24 pacientů. Veškerá měření jsem prováděla na hematologickém plně automatizovaném analyzátoru firmy Abbott. Poté jsem vytvořila tabulky s naměřenými hodnotami červené krevní řady. Mé výsledné hodnoty se u čtyř pacientů s možným záchytem pravděpodobné přítomnosti chladových protilátek, ztotožňují s tvrzením Dvořákové, 2009. Dle Dvořákové, 2009 může na možnou přítomnost chladových protilátek při hodnocení KO upozornit abnormálně vysoká hodnota MCV. Avšak u tohoto jednoho parametru se mé hodnoty liší, a to u všech čtyřech pacientů. V každém případě se potvrdila hypotéza o nesrovnalostech hodnot červené krevní řady, které mohou souviset s možnou přítomností chladových protilátek v krvi.

Velice důležitá je dle mého názoru informovanost a určitá vzdělanost populace ohledně možné přítomnosti těchto protilátek. V případě znalosti této problematiky by lidé kladli větší důraz na možné příznaky spojené s touto přítomností. A to hlavně z důvodu, že za těmito příznaky se mohou skrývat i další onemocnění. Díky včasnému záchytu a řešení dané skutečnosti se dále může zlepšit kvalita života pacienta.

6 SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

Knižní zdroje

ABBOTT Diagnostics Division. *Uživatelská příručka systému CELL-DYN Ruby®*. 84-6724/R2. 2009.

ADAM, Zdeněk a Jiří VORLÍČEK. *Hematologie: pro praktické lékaře*. 1. vyd. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-453-9.

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Anna ŠEDIVÁ. *Imunologie: minimum pro praxi*. Vyd. 3. Praha: Triton, 2001. Levou zadní. ISBN 80-7254-205-2.

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, Lubert. *Biochemistry*.

ČERMÁKOVÁ, Zuzana, Martin KOŘÍSTKA a Alena MALUŠKOVÁ. *Imunohematologie*. Vyd. 1. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2008, 69 s. ISBN 978-80-7368-600-0.

DOBROTOVÁ, Miroslava a Peter KUBISZ. *Hematológia a transfuziológia: učebnica*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1779-4.

DONNER, Ludvík, 1985, *Klinická hematologie*. 1. vyd. Praha : Avicenum.

DYLEVSKÝ, Ivan. *Somatologie*. Vyd. 2. (přeprac. a dopl.). Olomouc: Epava, 2000. ISBN 80-86297-05-5.

ENGELFRIET, C. *Imunohematologie*. Přeložil Sylvia Vugts. Amsterdam: Sanquin, 2003. ISBN 9052670293.

FÁBRYOVÁ, V., a kol. *Imunohematológia a transfúzna medicína pre prax*. 1. vydání. Bratislava: Grada, 2012. 224 s. ISBN 978-80-8090-002-1.

FERENČÍK, Miroslav. *Imunitní systém: informace pro každého*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2005, 236 s., [4] s. barev. obr. příl. ISBN 80-247-1196-6.

FERENČÍK, Miroslav, Jozef ROVENSKÝ a Vladimír MAŤHA. *Ilustrovaný imunologický slovník*. 1. české vyd. Praha: Galén, c2004. ISBN 80-7262-243-9.

HAMERNING, Denise, M. *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis*. Publisher: F.A. Davis Company, 2009. ISBN-13: 978-0-8036-1732-2.

HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009, 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.

JÍLKOVÁ, Helena. *Transfuzní lékařství*. Vyd. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2009, 98 s. ISBN 978-80-7395-151-1.

KLENER, Pavel a Terezie FUČÍKOVÁ. *Vnitřní lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, c2002. Scripta. ISBN 80-7262-138-6.

MOUREK, Jindřich. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1190-7.

NAVRÁTIL, Leoš. *Vnitřní lékařství: pro nelékařské zdravotnické obory*. 1. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2319-8.

NOVOTNÝ, Ivan a Michal HRUŠKA. *Biologie člověka*. 3., rozš. a upr. vyd. Praha: Fortuna, 2002. ISBN 80-7168-819-3.

PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 2006. ISBN 80-86682-02-1.

PENKA, Miroslav. *Hematologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-247-0023-9.

PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, 421 s., 30, 8, 23 s. obr. příl. ISBN 978-80-247-3459-0.

PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 2. vyd. Praha: Grada, 2012, 192 s., xvi s. obr. příl. ISBN 978-80-247-3460-6.

POSPÍŠILOVÁ, Šárka, Dana DVOŘÁKOVÁ a Jiří MAYER. *Molekulární hematologie*. 1. vyd. Praha: Galén, c2013, xix, 316 s. ISBN 978-80-7262-942-8.

ROZSYPALOVÁ, Marie, Alena ŠAFRÁNKOVÁ a Eva HALADOVÁ. *Ošetřovatelství II: pro 2. ročník středních zdravotnických škol*. Vyd. 1. Praha: Informatorium, 2002. ISBN 80-86073-97-1.

ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST. *Transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 2013, 237 s., xxiv s. obr. příl. ISBN 978-80-247-4534-3.

SAKALOVÁ, Adriena. *Klinická hematológia*. Martin: Osveta, 2011. ISBN 978-80-8063-324-0.

Internetové zdroje

Cold Agglutinins Test. *The free dictionary* [online]. 2014. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Cold+Agglutinins+Test>.

Cold Agglutinin Titer, Serum. *Mayo Medical Laboratories* [online]. 2014. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/8992>.

ČERMÁK, J. Léčba autoimunitní hemolytické anémie. *Zdraví E15* [online]. 10/2012. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/lecba-autoimunitni-hemolyticke-anemie-467127>.

DVOŘÁKOVÁ, B. Abstrakta. *XXX. Olomoucké hematologické dny* [online]. 2009. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.olhemdny.cz/abstrakta/bysection.php?year%5Brocnik%5D=2009&abstracts%5Bsekce%5D=518>.

Chladové aglutininy. Vyšetření. *Lab Tests Online* [online]. 10/2014. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: http://www.labtestsonline.cz/tests/chladov_aglutininy.html?tab=3.

Chladové aglutininy. Vyšetřovaný parametr. *Lab Tests Online* [online]. 10/2014. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: http://www.labtestsonline.cz/tests/chladov_aglutininy.html?tab=2.

KAVANAGH, S. Cold Agglutinins. *Patient* [online]. 2014. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://patient.info/doctor/cold-agglutinins>.

KOTAČKOVÁ, L. Krevní obraz. *Top lékař* [online]. 2012. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.toplekar.cz/laboratorni-hodnoty/krevni-obraz.html>.

THOMSON, Gregory E. Cold Agglutinins. *WebMD* [online]. 2014. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.webmd.com/a-to-z-guides/cold-agglutinins?page=3>.

Obrázky

Obrázek č. 1: ALBERTS, Bruce. *Essential cell biology*. 2nd ed. New York, NY: Garland Science Pub., c2004. ISBN 081533480X.

Obrázek č. 2: BERG, Jeremy M., John L. TYMOCZKO a Lubert STRYER. *Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman and Company, c2012. ISBN 978-1-4292-7635-1.

Obrázek č. 3: Red blood cells. *The Franklin institute*. [online]. 2016. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <https://www.fi.edu/heart/red-blood-cells>.

Obrázek č. 4: White blood cells. *The Franklin institute*. [online]. 2016. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <https://www.fi.edu/heart/white-blood-cells>.

Obrázek č. 5: Thrombocyte. *Thrombocyte*. [online]. 2016. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.thrombocyte.com>.

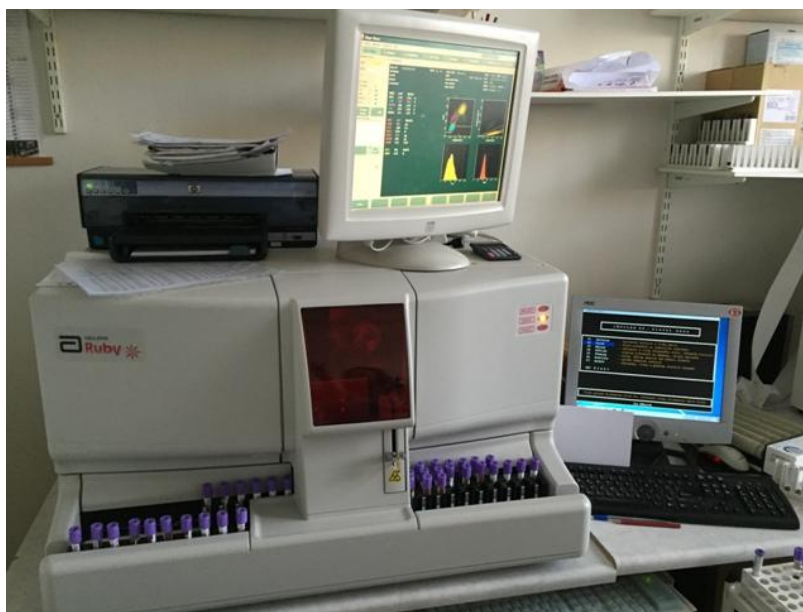
Obrázek č. 6: Activity: Preparing a Blood Smear. *Great scopes*. [online]. 2016. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.greatscopes.com/act001.htm>.

Obrázek č. 7: Cold autoimmune hemolytic anemia. *Pathology students*. [online]. 2016. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.pathologystudent.com/?p=1045>.

Obrázek č. 8: Blood clotting at room temperature in cold agglutinin disease. *Blood journal*. [online]. 2016. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/121/25/4975?sso-checked=true>.

7 PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Multiparametrický plně automatizovaný hematologický analyzátor firmy Abbott, CELL-DYN Ruby.



Zdroj: vlastní foto

Příloha č. 2: Stojánek se zkumavkami K₃EDTA.



Zdroj: vlastní foto