



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Předtransfuzní laboratorní vyšetření u pacientů s AIHA a mnohočetným myelomem

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

Autor: Karolína Ingrišová, DiS.

Vedoucí práce: MUDr. Jana Ticháčková

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Předtransfuzní laboratorní vyšetření u pacientů s AIHA a mnohočetným myelomem*“ 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 2.5.2023

.....

Karolína Ingrišová

Poděkování

Děkuji především vedoucí bakalářské práce MUDr. Janě Ticháčkové, za cenné rady, připomínky a metodické vedení práce. Dále chci poděkovat všem mým blízkým, kteří mi byli po celou dobu oporou.

Předtransfuzní laboratorní vyšetření u pacientů s AIHA a mnohočetným myelomem

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá laboratorními předtransfuzními vyšetřeními, která se provádějí v laboratoři speciální imunohematologie u pacientů s diagnózou AIHA a mnohočetným myelomem. V těchto případech se musí kompatibilita erytrocytárního transfuzního přípravku zajistit pomocí speciálních vyšetření. U pacientů s AIHA je nutné odstranit autoprotilátky pomocí metody vysycení plazmy pacienta.

U pacientů s MM se falešná pozitivita antiglobulinových testů způsobená léky (př. Daratumumab) odstraňuje ošetřením erytrocytů (diagnostické, dárcovské) pomocí DTT.

V teoretické části této bakalářské práce jsou vysvětlené základní imunohematologické pojmy, dále jsou detailně objasněna jednotlivá předtransfuzní vyšetření, která je potřeba provést u každého pacienta s těmito problematickými diagnózami.

V praktické části jsou popsány všechny laboratorní postupy jednotlivých předtransfuzních vyšetření včetně speciálních vyšetření pro pacienty s AIHA a MM. Dále je v praktické části zhodnocení vyšetřených pacientů na Transfuzním oddělení ve Fakultní nemocnici Plzeň s AIHA a MM za období od roku 2021 do roku 2022. Na konci praktické části jsou všechna získaná data vyhodnocena pomocí tabulek a grafů.

V závěru práce je shrnutí významu provedení speciálních vyšetření u pacientů s diagnózou AIHA a MM včetně zodpovězení předem stanovených výzkumných otázek.

Klíčová slova

Autoimunitní hemolytická anémie; mnohočetný myelom; antigeny; protilátky; vysycení plazmy; ošetření erytrocytů pomocí DTT

Pre-transfusion laboratory examination of patients with AIHA and multiple myeloma

Abstract

This bachelor thesis follow up laboratory pre-transfusion tests in the special immunohematology lab for patients with AIHA diagnosis and multiple myeloms. For said patients, compatibility of the erythrocyte tranfusion must be maintained using special procedures. For AIHA patients, that means removal of patient's auto-antibodies by saturating the patient's plasma sample.

As for patients with multiple myeloma, treatment of erythrocytes (either diagnostic or donor) with DTT is needed to remove false positivity caused by other treatments (such as administration of Daratumumab).

Theoretical part consists of explanation of the basic immunohematological terms followed by thorough description of tests needed for patients with mentioned problematic diagnosis.

Practical parts describes all laboratory procedures of each individual pre-transfusion tests including special ones for patients with AIHA and MM. This part also contains evaulation and analysis of all patients with AIHA and MM examined at the transfusion department of the University Hospital in Pilsen during the years 2021 and 2022. At the end of this part, all aquired data are evaluated using charts and graphs.

End of this thesis contains summary and importance of tests performed for patients with the diagnosis of AIHA and MM, including answers for previously set research questions

Keywords

Autoimmune hemolytic anemia; multiple myeloma; antigens; antibodies; plasma saturation; treatment of erythrocytes with DTT

Obsah

1	Teoretická část.....	9
1.1	Historie imunohematologie	9
1.2	Základní imunohematologické pojmy.....	10
1.2.1	Imunohematologie	10
1.2.2	Antigen	10
1.2.3	Protilátky	10
1.2.4	Komplement	12
1.2.5	Reakce antigen-protilátka	13
1.3	Základní předtransfuzní vyšetření.....	14
1.3.1	Určování krevní skupiny AB0	14
1.3.2	Vyšetření Rh systému.....	15
1.3.3	Screening antierytrocytárních protilátek	16
1.3.4	Test kompatibility	18
1.4	Další vyšetření používané v imunohematologické laboratoři	20
1.4.1	Identifikace specifických protilátek	20
1.4.2	Vyšetření autoproti látek	20
1.4.3	Přímý antiglobulinový test (Coombsův test)	21
1.4.4	Vyšetření chladových aglutininů	21
1.4.5	Vyšetření ostatních skupinových systémů erytrocytů.....	22
1.5	Speciální vyšetření u pacientů s diagnózou AIHA	27
1.5.1	Vysycení autoproti látek ze séra pacienta	27
1.6	Speciální vyšetření u pacientů s diagnózou mnohočetný myelom	29
1.6.1	Ošetření erytrocytů pomocí DTT	29
2	Experimentální část.....	31
2.1	Cíle práce a hypotézy	31
2.2	Metodika.....	32
2.2.1	Vyšetření krevní skupiny AB0 a RhD antigenu	32
2.2.2	Vyšetření screeningu antierytrocytárních protilátek a identifikace protilátek.....	34
2.2.3	Test kompatibility	35
2.2.4	Vyšetření autoproti látek	36
2.2.5	Přímý antiglobulinový test (Coombsův test)	36

2.2.6	Vyšetření chladových aglutininů	39
2.2.7	Stanovení Rh fenotypu a antigenu Kell pacienta	40
2.2.8	Určování ostatních erytrocytárních antigenů	40
2.2.9	Vysycení plazmy pomocí PEG	41
2.2.10	Ošetření erytrocytů pomocí DTT	43
2.3	Vydávání výsledků	44
2.4	Kontrola kvality	44
3	Statistická data – sběr a zpracování	45
3.1	Vyšetření pacienti s diagnózou AIHA u nichž bylo provedeno vysycení plazmy	45
3.2	Vyšetření pacienti s diagnózou MM u nichž bylo provedeno ošetření erytrocytů pomocí DTT	61
4	Diskuze	65
5	Závěr	68
6	Seznam použité literatury	69
7	Seznam obrázků	72
8	Seznam tabulek	73
9	Seznam použitých zkratk	74

Úvod

Autoimunitní hemolytická anémie (AIHA) je patologický stav s výskytem autoprotilátek proti antigenům červených krvinek, které způsobují zkrácené přežívání krvinek. Autoprotilátky v plazmě pacienta mohou způsobit komplikace při předtransfuzním vyšetření, proto je nutné jejich odstranění metodou vysycení plazmy pomocí PEG a dárcovských či vlastních erytrocytů. Tím získáme plazmu bez autoprotilátek k předtransfuznímu vyšetření a k odhalení případných skrytých aloprotilátek.

Pacienti s MM jsou léčeni monoklonálními protilátkami anti-CD 38 (Daratumumab), které se váží na antigen CD 38 exprimovaný především na myelomových buňkách.

Volně cirkulující monoklonální protilátky anti-CD 38 v plazmě pacienta se váží na antigen CD38, který je slabě přítomen i na povrchu erytrocytů a mají za následek vznik falešně pozitivních reakcí v NAT testu (nepřímý antiglobulinový test) se všemi diagnostickými a dárcovskými erytrocyty. Působením DTT (dithiotreitol) na krvinky dojde k rozrušení terciální struktury bílkovin ireverzibilním uvolněním disulfidických můstků a falešná panreaktivita tím vymizí.

Cílem této práce je popsat teoreticky i prakticky všechna předtransfuzní laboratorní vyšetření, která je nutné u pacientů s AIHA a MM provést. Součástí práce jsou i dvě výzkumné otázky, které se týkají pacientů, u nichž bylo provedeno vysycení plazmy. Chtěla jsem poukázat na možnost a četnost výskytu skrytých aloprotilátek, které lze u těchto pacientů odhalit pouze po vysycení autoprotilátek z plazmy, popř. u pacientů s MM po ošetření erytrocytů pomocí DTT. Tyto skryté aloprotilátky by při neodhalení a podávání inkompatibilních erytrocytárních transfuzních přípravků mohly způsobit další imunizaci, popř. akutní či pozdní hemolytické potransfuzní reakce. U druhé výzkumné otázky jsem chtěla poukázat hlavně na časovou náročnost daného vyšetření, u kterého zásadně záleží na tom, kolik cyklů je potřeba ke kompletnímu vysycení autoprotilátek z plazmy pacienta provést.

1 Teoretická část

1.1 Historie imunohematologie

Imunohematologie je obor, který je velice mladý. Její základy byly položeny na začátku 20. století. První zmínky o krevních skupinách pochází z roku 1901, jako první je popsal pan Landsteiner. Učinil tak popis tří krevních skupin, které označil A, B a C (ze skupiny C se stala dnešní skupina 0). Krevní skupina AB, která je v populaci nejméně častá, nebyla prozatím objevena, protože pan Landsteiner vyšetřoval pouze vzorky své krve a svých několika spolupracovníků. Krevní skupiny byly popsány na počátku imunohematologických dějin, kdy byl popsán jev, že sérum některých jedinců shlukuje (aglutinuje) červené krvinky jiných jedinců. Na základě toho, jak navzájem reagovaly jejich krvinky a séra, byly popsány krevní skupiny. (Písačka et al., 2012). Mezi další významné objevy se řadí objev krevního skupinového systému Rh, který byl objeven panem K. Landsteinerem a panem A. S. Wienerem roku 1939. (Fábryová, 2012). Tento významný skupinový systém byl pojmenovaný podle opice *Macacus Rhesus*, protože její krvinky byly používány při pokusech. Těmito opičími krvinkami imunizoval sérum králíka, v němž poté byla nalezena protilátka, která následně reagovala s opičím antigenem, ale i s většinou lidských erytrocytů. Po objevu tohoto systému došlo k vysvětlení dřívějších nežádoucích reakcí po transfuzi a většiny hemolytických onemocnění novorozenců. Další objevy přišly po roce 1946, kdy došlo k objevení dalších antigenních systémů erytrocytů, např. Kell, Kidd, Duffy, Lutheran (Penka, 2012).

1.2 Základní imunohematologické pojmy

1.2.1 Imunohematologie

Imunohematologie představuje základní kámen transfuzní medicíny a všech ostatních oborů, které využívají transfuzní substituční léčbu. Jedná se o vědní obor, který se zabývá vlastnostmi krve a krevních elementů z hlediska imunitních reakcí probíhajících v organismu. (Fábryová, 2012)

1.2.2 Antigen

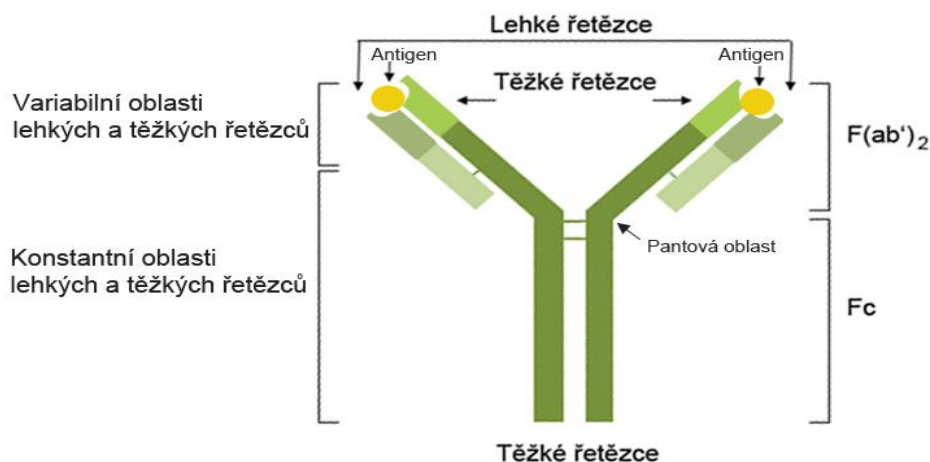
Jedná se o strukturu krevní membrány, která má povahu glykolipidů, lipoproteinů či glykoproteinů. Antigen je molekula, kterou imunitní systémem rozpozná a tvoří se tak specifické protilátky nebo-li specifická odpověď imunitního systému. Na antigenu je malá část nazývaná epitop, ten imunitní systém rozpozná a dochází tak k vazbě specifické protilátky na antigen. Kompletní antigen je nazýván imunogen. Tento kompletní antigen má nejen imunogenní část, ale také proteinový nosič a umí navodit imunitní odpověď. Velikostně menší molekula, než je imunogen je haptén. Jedná se o antigení molekulu a pokud se naváže na imunogenní nosič může dojít k tvorbě protilátek. (Penka, 2012; Chottová-Dvořáková, 2018)

U člověka je každý krevní skupinový znak tvořen genem, který se skládá ze dvou úseků DNA a ta je uložena v lokusech chromozomového páru. Dědičnost antigenů je podle pravidel genetiky (tzv. Mendelových znaků). Každý antigen je určený jedním párem genů (alelický pár). Každý člověk má vždy jeden gen od matky a druhý od otce. (Fábryová, 2012)

1.2.3 Protilátky

Imunoglobuliny neboli protilátky, jsou glykoproteinového původu. Mají podobu písmene Y a skládají se ze dvou těžkých (H) a dvou lehkých (L) řetězců, které jsou vzájemně spojeny disulfidickými můstky (viz Obrázek 1). Vznikají jako odpověď na imunogen a mají schopnost reagovat se specifickými antigeny. K antigenům se váží tzv. variabilní oblastí (Fab), ta je umístěna na konci těžkých a lehkých řetězců, nachází se zde paratopy, jež afínují k epitopům na antigenu. Na imunoglobulinu nacházíme ještě pantovou oblast, která umožňuje měnit úhel mezi těžkými řetězci, což přispívá ke specifické vazbě s antigenem. Poslední část imunoglobulinu se nazývá konstantní oblast (Fc), která plní efektorovou funkci imunoglobulinu. (Jílek, 2014)

Lehké řetězce se označují jako kappa nebo lambda.



Obrázek 1: Molekula imunoglobulinu

Zdroj: <https://labguide.cz/reagencie/protilatky/>

Podle aminokyselin v těžkých řetězcích se imunoglobuliny rozdělují do pěti imunoglobulinových tříd:

- IgG – jde o protilátku vyskytující se v séru a v intersticiu, v krvi tvoří převážnou většinu imunoglobulinů (70-75 %). Jedná se o monomer (má dva těžké a dva lehké řetězce) a díky své malé velikosti je tento imunoglobulin schopný procházet placentou z matky do fetu. Uplatňují se při opsonizaci, neutralizaci a sekundární odpovědi. Má čtyři podtřídy-IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4, z nichž největší význam mají IgG1 a IgG3, které jsou schopné vázat komplement.
- IgM – vyskytují se v séru nebo jsou součástí membrány B-lymfocytů , uplatňují se při opsonizaci, neutralizaci a primární odpovědi. Tento imunoglobulin je složený z pěti základních imunoglobulinů, které jsou spojeny krátkým polypeptidovým J řetězcem, a proto je tento imunoglobulin nazýván pentametem. IgM je schopen vázat komplement, což může vést k následné hemolýze erytrocytů, ale na rozdíl od IgG neprochází placentou, protože je to velká molekula.
- IgA – nalézáme je na sliznicích a v sekretech, hlavní funkcí je opsonizace, ochrana sliznic a kůže (15-20 %). IgA zajišťují především slizniční imunitu, nemají schopnost vázat komplement. V plazmě se vyskytují jako monomery a v epiteliálních sekretech jako dimery.
- IgD – výskyt v séru, v B buňkách jako monomery (méně než 1 %). Mají regulační funkci a jejich koncentrace v séru je velmi nízká.

- IgE – jsou přítomné v séru a žírných buňkách jako monomery v nízké koncentraci. Jejich koncentrace v séru se zvyšuje při alergických a parazitárních onemocněních.

Mezi nejdůležitější patří IgM a IgG, které aktivují komplement a afínují k Fc receptorům nacházejících se na fagocytech, antigen prezentujících buňkách (APC) a NK buňkách. (Penka, 2012; Chiu et al., 2019)

1.2.4 Komplement

Komplement je soubor 20 sérových proteinů, které jsou produkovány například hepatocyty nebo makrofágy. V séru jsou přítomny v neaktivní formě. Některé složky komplementu jsou spojovány s imunoglobuliny nebo s buněčnou membránou. Mezi funkce komplementu jsou řazeny především: opsonizace, chemotaxe a protizánětlivé funkce (anafylatoxiny) a osmotická lýza.

Rozeznáváme tři cesty aktivace komplementu: klasickou cestu, alternativní cestu a lektinovou cestu, na které navazuje cesta lytická.

1. Klasická cesta - tato cesta nastává při vazbě protilátky k povrchovému antigenu. Proces začíná aktivací C1 složky komplementu, která se váže k Fc oblasti IgG nebo IgM molekuly imunoglobulinu. Poté se aktivují další sérové proteiny (C4, C2 a C3).
2. Alternativní cesta - tato cesta začíná aktivací C3 složky. C3 je dimerní molekula podléhající samovolnému rozpadu na C3a a C3b. Do aktivace této cesty se nezapojují protilátky, ale přes to náleží k první linii obrany organismu proti infekcím.
3. Lektinová cesta - je podobná cestě klasické, ale místo protilátek je iniciována lektiny, které se vážou na bakteriální povrchy obsahující polysacharidy a vznikají tak další proteázy. Vzniklé proteázy spolu s lektinem dává vzniku biologicky aktivnímu komplexu, který dále štěpí jednotlivé složky komplementu. (Penka, 2012; Hořejší, 2013)
4. Lytická cesta aktivace komplementu - dochází ke vzniku membránového komplexu. Probíhá od C5 konvertázy přes připojení C6, 7, 8 a vazbu C9 vede k lýze buňky, nebo-li fyzikálnímu poškození buňky. (Bartůňková, 2011; Sompayrac, 2012)

1.2.5 *Reakce antigen-protilátka*

K této chemické reakci dochází navázáním glykoproteinové molekuly přítomné na Fab zakončení protilátky s epitopy, které se nacházejí na povrchu membrány erytrocytu.

Faktory ovlivňující vazbu antigen-protilátka:

- a) Teplota - IgM protilátky se označují jako chladové protilátky tzn. reagují při nízké teplotě. Mezi tepelné protilátky patří IgG protilátky, které reagují za vyšší teploty.
- b) pH - pro každou protilátku je optimální pH prostředí jiné, ale pro většinu reakcí mezi antigenem a protilátkou je optimální pH kolem hodnoty 7. Tuto hodnotu pH lze udržet provedením testu v prostředí pufovaného fyziologického roztoku.
- c) iontová síla prostředí - obvykle se používá izotonický fyziologický roztok. Pokud je potřeba dosáhnout rychlejší vazby antigenů a protilátek, použije se roztok o nižším obsahu Na^{2+} a Cl^- iontů (LISS).
- d) koncentrace – jedná se o poměr množství antigenu a protilátky.
- e) schopnost vázat komplement

Pokud dojde k reakci antigenu (který je součástí povrchu erytrocytu) se specifickou protilátkou, tato reakce se označuje aglutinace. Výsledkem této reakce je shlukování erytrocytů. Aglutinace je závislá na typu protilátky, množství antigenu, síle antigenu a na vzdálenosti mezi krvinkami.

Mezi další reakce antigen-protilátka se řadí lýza nebo-li rozklad buněk, jenž vzniká při porušení integrity buněčné membrány v důsledku působení protilátek a aktivujícím se komplementem.

Dále je popisována reakce, která je vyvolána protilátkou působící proti bílkovinám nebo jiným antigenům a vznikají tak bílé zakalené vločky. Tato reakce se nazývá precipitace (vysrážení) a využívá se například u elektroforézy. (Indrák, 2014; Masopust, 2022)

1.3 Základní předtransfuzní vyšetření

Předtransfuzní vyšetření se provádí u všech pacientů, kteří mají klinickým pracovištěm indikované podání transfuzního přípravku. Při přípravě vhodného transfuzního přípravku se musí dbát na to, aby bylo laboratorně potvrzené, že je krev příjemce kompatibilní s krví dárce. (Penka, 2012)

1.3.1 Určování krevní skupiny AB0

Krevní skupiny jsou určité vlastnosti organismu. AB0 systém je nejstarší a nejvýznamnější antigenní systém erytrocytů, při podání inkompatibilní transfuze v AB0 systému dochází k závažné akutní hemolytické potransfuzní reakci. AB0 antigeny se řadí mezi oligosacharidy, které se skládají z řetězců jednoduchých cukrů. Ty se vyskytují v membránách erytrocytů jako součást glykoproteinů a glykolipidů a dále jsou obsaženy v sekretech v podobě rozpustné formy. AB0 systém je určený pomocí tří základních alel AB0 genu. Mezi kodominantní alely patří A a B, alela 0 je vůči nim recesivní. Tyto alely jsou uloženy na 9.chromozomu. (Kubizs, 2006; Řeháček 2013).

Projevem dědičnosti A a B genu je exprese A a B antigenů na povrchu erytrocytů. U antigenů A, B a H se nejedná o přímé produkty genu. Při přítomnosti tohoto genu dochází k syntéze enzymu glykosyltransferázy, ta katalyzuje přenos a připojení molekuly monosacharidu k prekurzorové substanci H. Ta je odpovědná za vznik konkrétní krevní skupiny. U transferázy, která je řízena A genem, se navazuje na H antigen N-acetylgalaktosamin. Transferáza řízená genem B připojuje na H antigen D-galaktózu. Krevní skupina 0 je určena H-antigenem, pro který je specifický monosacharid fukóza. U AB0 systému se vyskytují čtyři fenotypy (A, B, AB, 0) a šest genotypů (AA, A0, BB, B0, AB, 00). U zdravého člověka jsou v séru pravidelně přítomny protilátky anti-A (u krevní skupiny B) nebo anti-B (u krevní skupiny A) event. obojí u krevní skupiny 0 (viz Obrázek 2). Tyto protilátky se nazývají aglutininy a jsou v organismu vytvářeny přirozeně bez předchozí imunizace. Přirozené aglutininy jsou obvykle třídy IgM, ale v případech po imunizaci (např. po nestejnokupinové transplantaci kostní dřeně či orgánů a v těhotenství) mohou být třídy IgG nebo IgA. U novorozenců se tyto protilátky nevyskytují, začínají se tvořit až od 3. do 6. měsíce po narození. (Dean, 2005; Penka, 2012, Daniels, 2013)

	Skupina A	Skupina B	Skupina AB	Skupina 0
Erytrocyty				
Protilátky	 anti-B	 anti-A	Žádné	  anti-A anti-B

Obrázek 2: Schéma krevních skupin

Zdroj: <https://www.cckp9.cz/krevni-skupiny>

1.3.2 Vyšetření Rh systému

Jedná se o druhý nejvýznamnější antigenní systém vyskytující se na erytrocytech. Za nejvýznamnější antigen Rh systému je považován antigen D, dále potom antigeny c, C, e, E. (Daniels, 2014)

- **Antigen D**

Antigen D má 85 % kavkazské populace. Je-li antigen D na erytrocytech člověka přítomen, pak se označuje jako RhD pozitivní. Naopak u jedinců, u kterých antigen D není přítomen, se označují jako RhD negativní. RhD protein má na svém povrchu více jak 30 epitopů antigenu D, které můžeme prokázat pomocí monoklonálních protilátek. Pokud jeden nebo více epitopů chybí, dochází ke vzniku variantní formy D antigenu (D^{variant}), je-li u antigenu D snížená exprese bez fenotypových odlišností, označujeme ho jako slabý D antigen (D^{weak}). V případě nedodržení kompatibility v tomto systému dochází až u 80 % případů k tvorbě imunní protilátky anti-D. Tvorba protilátky anti-D je možná také v těhotenství u RhD negativní matky, ta si tvoří imunní protilátky proti RhD pozitivním erytrocytům plodu a hrozí tak riziko vzniku hemolytického onemocnění novorozence. (Sakalová, 1995; Masopust et al., 2019)

- **Antigeny C, c, E, e**

Alelické páry těchto antigenů jsou kódovány RHCE genem. Jedná se o méně imunogenní antigeny, než je antigen D a protilátky proti C, c, E, e po podání transfuze, u které nebyla zachována negativita v těchto antigenech, se vytvoří pouze v 4,5 % případů.

- **Antigen C^w**

Lidé s antigenem C^w pozitivním jsou vždy i C pozitivní, označuje se jako slabý antigen. V kavkazské populaci je tento antigen zastoupen u 1-2 %, v naší populaci je jeho zastoupení o něco vyšší (5-6 %). (Fábryová, 2012; Penka 2012)

Většina vzniklých protilátek proti antigenům Rh systému jsou imunní protilátky, které vznikly po transfuzích nebo v těhotenství. Pouze velmi vzácně dochází k tvorbě přirozených protilátek (např. protilátka anti-E vznikající po některých infekcích). Protilátka anti-D se často objevuje v kombinaci s dalšími protilátkami Rh systému. Nejčastěji to bývají inkompletní protilátky typu IgG a nemají schopnost aktivovat komplement, tyto protilátky prostupují placentou a způsobují hemolytické potransfuzní reakce i HON. (Kubizs, 2006; Panczak et al., 2013)

1.3.3 Screening antierytrocytárních protilátek

Screening nepravidelných antierytrocytových protilátek je jedno ze základních předtransfuzních vyšetření, ale provádí se i u těhotných nebo u dárců krve. Pomocí screeningových erytrocytů (viz Obrázek 3) se detekuje přítomnost protilátky v plazmě pacienta. Díky tomuto vyšetření se omezují počty potransfuzních reakcí či zkrácené přežívání erytrocytů způsobené protilátkami proti erytrocytům a snižuje se tím i riziko HON.

Při průkazu nepravidelných antierytrocytárních protilátek jsou používány firemně vyrobené diagnostické erytrocyty krevní skupiny 0. Skládají se ze tří nebo čtyř typů erytrocytů (dle výrobce) a mají různé zastoupení klinicky významných antigenů. Antigenní zastoupení dané lahvičky (šarže) erytrocytů je vždy uvedeno v letáku, který je součástí balení diagnostických erytrocytů. (Masopust et al., 2022)

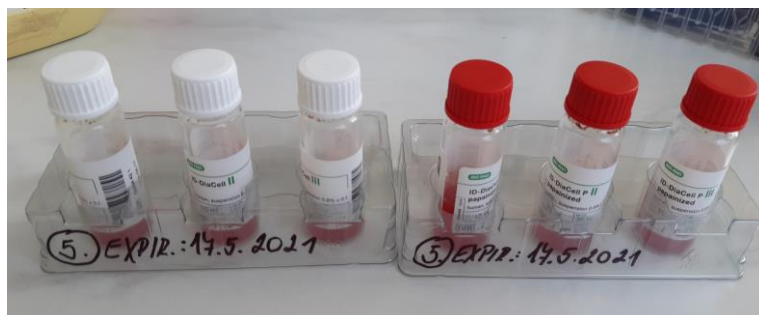
- **Nepřímý antiglobulinový test (NAT-LISS)**

NAT test je možné vyšetřovat metodou sloupcové aglutinace v gelu, na pevné fázi nebo dalšími metodami s podobnou senzitivitou a specifitou. Tímto testem se detekují klinicky významné protilátky. (Penka, 2012; Masopust, 2022)

- **Enzymový test**

Nejedná se o rutinní metodu pro screening protilátek, využívá se pouze jako doplňková metoda, která je v některých případech citlivější než NAT test (např. u Rh protilátek). Tento test se využívá u pacientů s pozitivními reakcemi v NAT testu, u potransfuzních reakcí, u těhotných a nebo u pacientů s těžším klinickým stavem

(např. pacienti s hematologickými diagnózami). U enzymových testů jsou obvykle využívány jednofázové enzymové testy, kdy je do reakce přidáván bromelin a nebo dvoufázové testy u nichž jsou diagnostické erytrocyty primárně opracované papainem. (Penka, 2012)



Obrázek 3: Diagnostické erytrocyty ID-DiaCell a ID-DiaCell P od firmy Bio-Rad

Zdroj: vlastní foto

Metody sloupcové aglutinace

Vyšetření se provádí v plastových kartách, kde je vylisováno 6-9 mikrozkušavek obsahujících gelovou matrix, skrze kterou během centrifugace prochází vyšetřovaný materiál. Pokud erytrocyty prochází přes gelový sloupec až na dno mikrozkušavky, nedošlo k žádné aglutinaci erytrocytů, a proto se nezachytily v gelové matrix. V případě, kdy dojde ke shlukování dvou a více krvinek, zůstávají nahoře gelového sloupce nebo jsou v gelu rozptýleny. Tato metoda se může provádět jak manuálně, tak v automatu (viz Obrázek 4).



Obrázek 4: Imunohematologický analyzátor IH-500 od firmy Bio-Rad

Zdroj: vlastní foto

Metody pevné fáze na mikrotitračních destičkách (capture-princip)

Tyto testy využívají principu adherujících erytrocytů používající antigeny na pevném nosiči a prokazují protilátku ve vzorku dárce nebo pacienta. Provádějí se na mikrotitračních destičkách, kde diagnostické erytrocyty jsou předem fixovány na dno jamek, následuje inkubace s vyšetřovaným sérem a po promytí se přidají tzv. indikátorové erytrocyty, které jsou povlečeny anti-IgG. V případě negativní reakce se na diagnostické erytrocyty nenavážou žádné protilátky a indikátorové erytrocyty se nachází ve středu dna jamky. U pozitivní reakce se IgG protilátky z testovaného séra navážou na diagnostické erytrocyty a indikátorové erytrocyty se v tenké vrstvě navážou na tyto IgG protilátky po celém dnu jamky. Tato metoda se provádí pouze v automatu, popř. poloautomatu. (Sandler et al., 2000)

Existují i další metody pro vyšetřování v imunohematologii, ať už se vyšetřuje krevní skupina, screening protilátek nebo např. stanovujeme erytrocytární antigeny. Dříve se používala metoda zkumavková, která už se dnes využívá velmi zřídka nebo jen u některých vyšetření. Dále existuje ještě například metoda aglutinace na mikrotitračních deskách.

1.3.4 Test compatibility

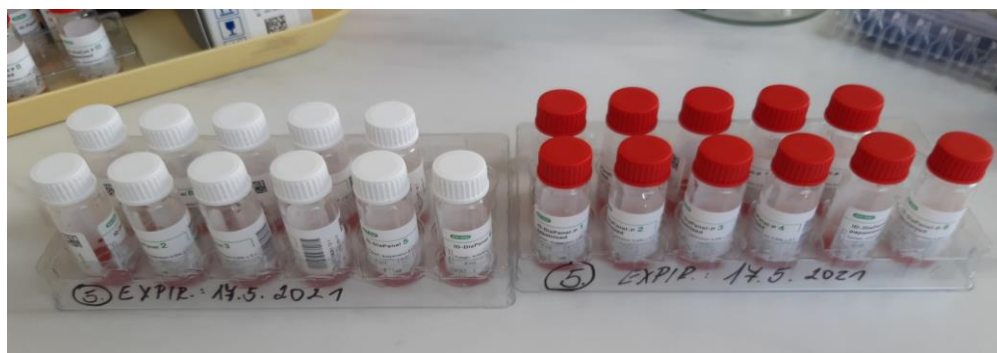
Řadí se mezi základní předtransfuzní vyšetření. Pomocí tohoto testu se zjišťuje slučitelnost dárcovských erytrocytů a plazmy pacienta, tím dojde k vyloučení přítomnosti nepravidelných přirozených a získaných protilátek proti krvinkám dárce v séru pacienta. (Basavarajegowda, 2022) Test compatibility se vyšetřuje nejčastěji metodou sloupcové aglutinace nebo metodou pevné fáze. Další možností však dnes už méně častou je zkumavková metoda. Klasické provedení je metodou LISS-NAT při 37 °C, jako doplňující test může být použit enzymový test compatibility. Po inkubaci plazmy pacienta a dárcovských erytrocytů v termostatu při 37 °C a následné centrifugaci se testy compatibility vyhodnotí. V případě pozitivity při křížové zkoušce dojde k navázání antigenů v transfuzním přípravku na protilátky v séru pacienta a vytváří se tak aglutinát, který neprojde skrz gelový sloupec. Ten obsahuje gelové částice, mezi kterými jsou mezery takové velikosti, aby mezi nimi prošly pouze jednotlivé krvinky. Tento výsledek je vydáván jako inkompatibilní. Při negativním výsledku nedojde k vytvoření aglutinace a všechny krvinky projdou až na samé dno mikrozkušky. Po vhodném výběru kompatibilních dárcovských erytrocytů potvrzených negativní zkouškou compatibility je její platnost maximálně 72 hodin od

času náběru vzorku pacienta, který je uveden na žádance. U neobvyklých situací se doba platnosti kompatibility zkracuje (je-li připravována RhD pozitivní krev RhD negativnímu příjemci, při absolutním nedostatku vhodných transfuzních přípravků) nebo se prodlužuje (zkouška kompatibility provedena z vysycené plazmy). (Kubisz, 2006; Murphy et al., 2022).

1.4 Další vyšetření používané v imunohematologické laboratoři

1.4.1 Identifikace specifických protilátek

Vyšetřuje se u pacientů, kteří mají pozitivní screening protilátek a je tak potřeba určit specifitu protilátky. Tento test se provádí za pomoci identifikačních diagnostických erytrocytů (viz Obrázek 5), jedná se o minimálně deset (dle firmy, může být i více) typů erytrocytů s různým antigenním zastoupením. Při průkazu specifické protilátky se určuje na erytrocytech pacienta daný antigen odpovídající stanovené protilátce. Dále se posuzuje, zda se jedná o aloprotilátku (např. protilátka se vytvořila po předchozí antigenně neshodné transfuzi či v těhotenství) nebo autoprotilátku v případě pozitivity autologní kontroly, která je součástí vyšetření identifikačního panelu. Jedná-li se o aloprotilátku, vyšetřovaný pacient by neměl na svých erytrocytech nést antigen shodný se stanovenou protilátkou. Po stanovení protilátky je důležité zohlednit klinický význam dané protilátky, který je důležitý při podání neshodně antigenních erytrocytů a následně vzniklé potransfuzní hemolýzy. Za klinicky významné protilátky jsou považovány protilátky AB0 a dále potom protilátky reagující v NAT testu při 37°C. Při průkazu protilátky je nutné pacientovi již dále podávat pouze erytrocytární transfuzní přípravky, které daný antigen nenesou a důležité je také, aby byla zkouška kompatibility v NAT testu negativní. (Penka 2012; Masopust et al., 2019)



Obrázek 5: Diagnostické panelové erytrocyty ID-DiaPanel a ID-DiaPanel P od firmy Bio-Rad

Zdroj: vlastní foto

1.4.2 Vyšetření autoprotilátek

Jedná se o autologní kontrolu, kdy zjišťujeme, zda je protilátka v plazmě pacienta namířena proti jeho vlastním antigenům, proto musí být daný antigen na jeho erytrocytech přítomen. Autologní kontrola se neřadí mezi povinné předtransfuzní vyšetření. Autoprotilátky se vyšetřují jak v NAT testu, tak i v enzymovém papainovém

testu. Autoprotilátky mohou být také reagující při 4°C. Často mají specifitu protilátky anti-I.

Pacienti s diagnózou AIHA mají vždy pozitivní autoprotilátky, které se vážou na erytrocyty a způsobují tak pozitivitu i při vyšetření screeningu protilátek, identifikaci protilátek, testu kompatibility, ale i v přímém antiglobulinovém testu. Odstranění autoprotilátek se provádí vysycením plazmy pacienta. (SOP FN Plzeň)

1.4.3 *Přímý antiglobulinový test (Coombsův test)*

PAT je antiglobulinový test určený k detekci protilátek, které jsou navázané na erytrocytech pacienta. V případě, kdy dojde k senzibilizaci erytrocytů, hrozí riziko urychleného odstraňování fagocytózou a dochází k tzv. extravaskulární hemolýze ve slezině (popř. játrech). Metodami na prokázání senzibilizace erytrocytů detekujeme imunní antierytrocytární protilátky nebo C3 složku komplementu na povrchu krvinek, které jsou aglutinovány polyspecifickým antiglobulinovým sérem (AGH). Tento test je možné provést zkumavkovou metodou nebo sloupcovou aglutinací. V případě positivity Coombsova testu se pokračuje v upřesnění senzibilizace erytrocytů kvalitativně (třídy IgG, IgM, IgA, popř. aktivace složky komplementu C3d, C3c). Pokud dojde k senzibilizaci erytrocytů protilátkami třídy IgG stanovuje se kvantitativně titr IgG protilátek a zjišťuje se tak možné riziko vzniku hemolýzy. V případě vysokého titru IgG protilátek se dále ještě upřesňují podtřídy IgG (IgG1, IgG3). Při negativním výsledku není vyloučena možnost procesu hemolýzy, protože nemusí být prokázána vazba imunoglobulinu na erytrocyty nebo daná protilátka může mít nízkou afinitu a je tak pod prahem citlivosti dané laboratorní metody. (Penka, 2012; Řeháček, 2013).

1.4.4 *Vyšetření chladových aglutininů*

Tato metoda je využívána u formy autoimunitní hemolytické anémie, která je způsobena autoprotilátkami reagujícími v chladu. Jedná se o autoprotilátky, které se vážou na membránu erytrocytů vedoucí k předčasné destrukci erytrocytů. Pro správný výsledek vyšetření je nutné dopravit vzorek krve za tepla, vzorek za tepla centrifugovat a ihned oddělit plazmu od erytrocytů. Chladové protilátky bývají obvykle třídy IgM a vážou se na erytrocyty při nízkých teplotách v periferních částech krevního oběhu. Některé chladové protilátky jsou schopny aktivovat komplement a tím způsobit hemolýzu. U průkazu chladových aglutininů se testování provádí v solném prostředí při 4°C. Chladové protilátky bývají často specifity anti-I, ty jsou prokazovány pomocí

pupečnickových erytrocytů krevní skupiny 0. V případě pozitivních reakcí se všemi diagnostickými erytrocyty včetně autoprotilátek a negativní reakce s pupečnickovými erytrocyty se výsledek vydává jako protilátka anti-I reagující při 4°C. V případě jakékoliv pozitivní reakce při 4 °C se musí podávat transfuzní přípravky ohřáté na teplotu těla pacienta, aby nedocházelo k předčasné hemolýze transfundovaných erytrocytů. (Masopust, 2022)

1.4.5 Vyšetření ostatních skupinových systémů erytrocytů

K vyšetření erytrocytárních antigenů se používají tzv. serologické testy využívající metodu sloupcové aglutinace na gelových kartách nebo metodu zkumavkovou. Serologické testy fungují na principu shlukování erytrocytů působením protilátek obsažených ve známém diagnostickém antiséru proti antigenům na vyšetřovaných erytrocytech a dochází ke vzniku aglutinace. Detekce erytrocytárních antigenů na erytrocytech se provádí pomocí známých diagnostických antisér, které jsou převážně třídy IgM, při jejich nedostupnosti mohou být třídy IgG.

Na povrchu erytrocytu se za normálních okolností nachází slabý negativní náboj, ionty dlučného roztoku vytvářejí okolo erytrocytu další elektrostatické vrstvy, které jsou navzájem elektrostaticky odpuzovány. Tuto vzdálenost mezi jednotlivými krvinkami dokáže překlenout pouze protilátka třídy IgM, v tomto případě se jedná o přímou aglutinaci. Protilátky třídy IgG tuto vzdálenost samostatně nepřeklenou a potřebují výpomoc např. AGH, tuto aglutinaci tak nazýváme nepřímou.

Přímá aglutinace se využívá u detekce AB0 skupiny, RhD a dalších antigenů. Naopak nepřímá aglutinace se využívá pro určení některých ostatních antigenů nebo třeba i při screeningu a identifikaci klinicky významných protilátek. (Penka, 2012; Řeháček, 2013; Masopust, 2022)

- **Skupinový systém Kell**

V tomto skupinovém systému se vyskytuje 36 antigenů, z nichž jsou nejdůležitější antigeny K (Kel) a k (Cellano). Geny pro tento antigenní systém jsou umístěny na sedmém chromozomu. Antigen K se v kavkazské populaci vyskytuje v 9 % a antigen k u 99,9 % obyvatelstva. Dále se v tomto antigenním systému vyskytují antigeny Kp^a, Kp^b, Js^a, Js^b. Antigeny K a k vznikají už v časně fázi těhotenství (cca 10. týdnem), plně vyvinuty jsou na erytrocytech po narození. Jedná se o klinicky významný systém, který se vyskytuje v glykoproteinové podobě na membráně erytrocytů. Vniklé protilátky po předchozí imunizaci K pozitivními erytrocyty mohou vyvolat hemolytickou

potransfuzní reakci nebo HON a tyto protilátky jsou třídy IgG. Z důvodu vysoké schopnosti tvorby protilátek je doporučováno u dívek a žen ve fertilním věku a u pacientů s jakoukoliv zjištěnou protilátkou dodržovat kompatibilitu antigenu K. U pacientů, u nichž je předpoklad opakovaných transfuzí je před první aplikací transfuzního přípravku vhodné vyšetřit Ag K. V případě vzniklé protilátky anti-k je velmi složité najít kompatibilního dárce, který je KK. Musí se tak hledat v registru dárců se vzácnými krevními skupinami. (Penka, 2012; Řeháček, 2013; Masopust, 2022)

- **Skupinový systém Duffy**

Tento systém byl objeven u hemofilika jménem Duffy, u něhož byla detekována protilátka proti antigenu Fy. Geny pro tento systém jsou umístěny na prvním chromozomu. Nejdůležitějšími antigeny jsou Fy^a a Fy^b. Četnost výskytu těchto antigenů se liší podle různých populací. Protilátky proti těmto antigenům nejsou moc časté a téměř vždy vznikají po imunizaci těhotenstvím nebo transfuzemi. Protilátky v tomto systému mohou způsobovat HON nebo potransfuzní reakce při podání neshodné krve v Duffy systému. Charakter protilátek bývá třídy IgG, které jsou schopné reagovat v NAT testu, často se vyskytují v kombinaci s jinými protilátkami a mohou aktivovat komplement. (Penka, 2012; Řeháček, 2013)

- **Skupinový systém Kidd**

Zde rozeznáváme dva antigeny Jk^a, Jk^b, které jsou v populaci zastoupeni v podobné četnosti. Tyto antigeny se mohou vyskytovat jako fenotypy Jk^{a+b-}, Jk^{a+b+}, Jk^{a-b+} a ve výjimečných případech i Jk^{a-b-}, což je projev vzácného homozygotního genu. Osoby s tímhle nulovým fenotypem mohou vytvářet protilátky anti-Jk³. Protilátky namířené proti tomuto systému jsou velmi nebezpečné a mohou být detekovány jak v NAT testu, tak i enzymovém papainovém testu. Tyto protilátky jsou třídy IgG nebo i IgM a mají schopnost aktivovat komplement. Protilátky mohou být špatně detekovatelné, protože po imunizaci poměrně rychle jejich síla zeslabuje nebo reagují jen homozygotní krvinky. Ale po inkompatibilní transfuzi v tomto systému mohou dosahovat vysokých hladin, které mohou způsobovat pozdní hemolytickou potransfuzní reakci. (Penka, 2012; Řeháček, 2013; Masopust, 2022)

- **Skupinový systém Lewis**

Tento skupinový systém se svou povahou odlišuje od ostatních skupinových systémů. Antigeny mají glykoproteinovou a glykolipidní povahu a přirozeně se nevyskytují v membráně erytrocytů, ale jsou na membránu adsorbováni z plazmy, to způsobuje neměnnost antigenů po transplantaci hemopoetických buněk nebo

transfuzi na rozdíl od jiných systémů. V Lewis systému se vyskytují dva antigeny Le^a a Le^b , jejichž Le geny jsou lokalizovány na 19. chromozomu. V populaci se vyskytuje 22 % lidí Le^a a 72 % lidí Le^b pozitivních. Antigeny Lewis ovlivňují ještě další dva geny (ABH a Se) a to podle toho, zda lidé patří k sekretorům nebo nonsekretorům. Pro vznik antigenů jsou důležité geny H, Se a Le. Pokud jde o člověka nevylučovatele, pak se do jeho krevní plazmy a na jeho erytrocyty dostanou jen antigeny Le^a , mají pak fenotyp Le^{a+b-} . Když však jde o člověka vylučovatele, pak se společným působením genů Le Se vytvoří antigen Le^b , tento člověk je pak Le^{a-b+} . U osob, které nejsou sekretorem ABH (homozygot sese), nedochází k přeměně antigenu Le^a na antigen Le^b , je výsledný fenotyp Le^{a+b-} . Sekretorům i nonsekretorům s fenotypem Le^{a-b-} chybí gen Le. Vzácně se vyskytující je potom fenotyp Le^{a+b+} , který se vyskytuje u slabých sekretorů při slabé expresi H. Antigeny Le^a , Le^b pravidelně vyvolávají imunizaci po transfuzích, méně často v graviditách. Protilátky bývají třídy IgM, méně často pak třídy IgG a lépe reagují při pokojové teplotě v solném prostředí. Protilátku anti- Le^a je možné prokázat i NAT testem, nebývá vzácná a může být i přirozeného původu. Jedná se o potenciálně nebezpečnou protilátku, kterou tvoří lidé s fenotypem Le^{a-b-} a mohou tak vznikat ojedinělé potransfuzní reakce, ale nezpůsobují HON. Protilátky anti- Le^b jsou méně nebezpečné a vytváří se u lidí jak s fenotypem Le^{a-b-} , tak Le^{a+b-} . (Penka, 2012; Řeháček, 2013)

- **Skupinový systém Lutheran**

V tomto skupinovém systému známe již 27 antigenů, z nichž jsou neznámější antigeny Lu^a a Lu^b . V kavkazské populaci se antigen Lu^a vyskytuje pouze v 5-8 % a antigen Lu^b v 99,9 %. Nejvíce frekventovaný je tak fenotyp Lu^{a-b+} . V případě němé alely Lu, která je extrémně vzácná a téměř se nevyskytuje, je potom vytvářen fenotyp Lu^{a-b-} . Protilátky vznikající v tomto systému nejsou klinicky významné, jen velmi vzácně mohou způsobit hemolytické potransfuzní reakce, ale nejsou spojovány s případy HON. Protilátky jsou většinou imunního původu a třídy IgG, reagující silněji při pokojové teplotě než při 37°C. Protilátky anti- Lu^a a anti- Lu^b vyskytující se přirozeně jsou třídy IgM. Oba typy jsou poměrně vzácné. (Penka, 2012; Řeháček, 2013; Masopust, 2022)

- **Skupinový systém MNSs**

Objeven byl zhruba 20 let po objevení systému AB0. Objeví ho Landsteiner a Levine při dalším bádání o skupinovém systému AB0. Patří sem antigeny M, N, S, s. Frekvence výskytu antigenu M je 78 %, antigenu N 72 %, antigen S 52–55 % a antigen

s 89–90 %. Tento jednoduchý systém komplexů genů se vyskytuje na 4. chromozomu. Antigeny tohoto systému jsou detekovány u plodu poměrně brzy, po narození jsou už dobře vyvinuty. Často bývá nalézána protilátka anti-M, která většinou bývá chladové povahy a je třídy IgM. V případě, kdy reaguje i při 37 °C se řadí mezi klinicky významnější. Protilátka anti-N bývá třídy IgM, často chladové povahy. Naopak protilátky specifity S a s jsou třídy IgG, které většinou reagují při 37 °C v NAT testu. Protilátky anti-S a anti-s jsou klinicky významné, mohou způsobit akutní i pozdní hemolytickou potransfuzní reakci nebo HON. (Penka, 2012; Masopust, 2022)

- **Skupinový systém P**

Jedná se o antigen, který je strukturálně podobný antigenům AB0, Ii a Lewis. Mezi antigeny tohoto systému se řadí antigen P1, P a P^k. Tento antigen P je přítomný na erytrocytech téměř všech jedinců, ti kteří ho nemají, nesou na svých erytrocytech znak p. Osoby, které jsou P1 pozitivní, mají na erytrocytech antigen P a P1. Těchto osob je přibližně 80 %. Lidé s fenotypem P2 exprimují pouze antigen P (mohou tvořit aloprotilátku anti-P1). Gen P1 se nachází na chromozomu 22 a gen P2 na chromozomu 6. Pro transfuziologii mají význam pouze protilátky anti-P1, které mají schopnost hemolyzovat krvinky podobně jako IgG autoprotilátky (Donathův-Landsteinerův bifázický hemolyzin). U pacientů s autoimunitní hemolytickou anémií (paroxysmální chladová hemoglobinurie) může způsobit těžkou hemolýzu. Protilátka anti-P1 bývá třídy IgM a reaguje obvykle při nízkých teplotách, může být i třídy IgG. Pokud silně reaguje v NAT testu při 37 °C, váže tak komplement a může způsobit problém při vyšetření krevní skupiny. Protilátka anti-P1 bývá bez klinického významu. (Penka, 2012; Masopust, 2022)

- **Skupinový systém Ii**

Některé antigeny jsou přítomny na krvinkách prakticky všech lidí. Hlavním představitelem je antigen I, tento antigen se vyvíjí na erytrocytech pomalu. Na erytrocytech pupečnickové krve se ještě nevyskytuje, tam je antigen i. Kolem 18. měsíce věku se mění na antigen I. Zcela výjimečně se najdou lidé I neg. Pokud je gen I přítomen, dochází k přeměně i-aktivních jednoduchých sacharidových řetězců na I-aktivní rozvětvené řetězce (antigen I). V lékařství mají význam protilátky anti-I, ty se vyskytují jako autoprotilátka a většinou jsou důsledkem překonané infekce hlavně virové. Mají chladovou povahu a jsou třídy IgM. Obvykle váží komplement a vyskytují se v nízkých titrech. Dělalí zejména laboratorní problémy, kdy autoprotilátka anti-I může interferovat při vyšetření AB0, screeningu protilátek nebo testu kompatibility.

Problémem také může být, pokud se jejich tvorba zvyšuje (infekční mononukleóza, zápal plic) a kde mohou způsobit hemolytickou anémii. Jsou také důvodem obtíží při chladové hemoglobinurii. (Penka, 2012; Řeháček, 2013; Masopust, 2022)

Na erythrocytech se nacházejí i velmi vzácné antigeny jako jsou Diego, Colton, Knops, Indian, Cartwright, Xg, Cromer. (Řeháček, 2013)

1.5 Speciální vyšetření u pacientů s diagnózou AIHA

AIHA je soubor patologických stavů, při kterém dochází k výskytu autoprotilátek proti antigenům červených krvinek, pomocí nichž dochází k zrychlenému zániku erytrocytů. (Penka, 2011; Řeháček, 2013)

AIHU rozlišujeme na:

- a) AIHA s tepelnými protilátkami (WAIHA) - jedná se o autoimunitní onemocnění u kterého dochází ke zkrácení přežívání erytrocytů v důsledku přítomnosti protilátek reagujících při 37°C. V naprosté většině se jedná o protilátky třídy IgG, které mohou, ale nemusí vázat komplement a erytrocyty jsou tak destruovány ve slezině. Občas se objevují protilátky třídy IgM a vyjimečně i IgA v kombinaci s IgG.
- b) Choroba chladových aglutininů (CAS) - je to druh autoimunitní hemolytické anémie s přítomností protilátek reagujících při teplotách nižších než 32°C. Chladové protilátky bývají typu IgM a mají schopnost aktivovat komplement.
- c) Paroxysmální chladová hemoglobinurie (PCH) - jde o vzácné autoimunitní onemocnění, které je charakterizované vznikem hemoglobinurie po expozici chladu. Zde je hemolýza a hemoglobinurie způsobená tzv. Donathovou-Landsteinerovou protilátkou. Jedná se o polyklonální chladovou komplement-fixující protilátku třídy IgG, která má specifitu anti-P a je silným bifázickým hemolyzinem.
- d) Léky indukované hemolytické stavy (DIHA) - jsou to imunitní mechanismy vedoucí k léky indukované hemolýze. V současné době jsou hlavními vyvolávači hemolýzy cefalosporinová antibiotika. (Penka, 2009; Michalak et al., 2020)

1.5.1 Vysycení autoprotilátek ze séra pacienta

Autoprotilátky vyskytující se v plazmě pacienta mohou být komplikací při předtransfuzním vyšetření. K odstranění autoprotilátek z plazmy pacienta a odhalení případných aloprotilátek se využívá metoda vysycení plazmy(séra) pomocí polyethylenglykolu (PEG). K vysycení se využívají vlastní erytrocyty (autologní adsorpce) nebo dárcovské erytrocyty (alogenní adsorpce) a to v případě, kdy byl pacient v posledních třech měsících transfundován nebo je příliš anemický pro odběr většího počtu vzorků. Vysycená plazma se získává inkubací plazmy se sedimentem vlastních

(ev. dárcovských) erytrocytů opakující se v několika cyklech až do negativního screeningu protilátek (popř. identifikace aloprotilátky). Krvinky je nutné před samotným vysycením nejdříve ošetřit 1 % roztokem ficinu, protože ficin zvyšuje vazebnou kapacitu erytrocytů. Při prvním cyklu vysycování se do reakce přidává PEG, který odstraňuje vodu z okolí erytrocytu a tím dochází k zesílení vazby protilátky na antigen a zvyšuje se také koncentrace protilátky v plazmě. K vysycení se využívají dárcovské erytrocyty co nejvíce shodné v ABO, Rh systému, dále se musí shodovat dárcovské erytrocyty s erytrocyty pacienta v erytocytních antigenech především: C^w, Kell, Kidd^(a,b). Pro lepší výsledky je možné zohlednit i ostatní erytocytní antigeny. Pokud by byly dárcovské erytrocyty v některém důležitém systému neshodné s erytrocyty pacienta, mohlo by dojít k vysycení klinicky významné aloprotilátky.

(SOP TO FN Plzeň)

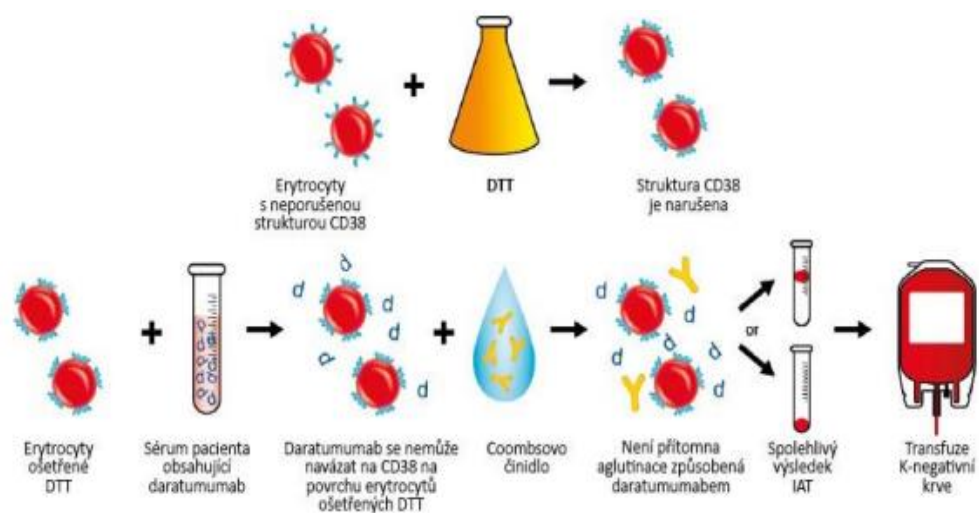
1.6 Speciální vyšetření u pacientů s diagnózou mnohočetný myelom

Jedná se o agresivní maligní hematologické onemocnění, které vychází z lymfocytární tkáně. V kostní dřeni dochází k infiltraci patologickými plazmatickými buňkami až dojde k postupnému útlaku fyziologické krvetvorby. V krvi i moči jsou také přítomny monoklonální imunoglobuliny, typická jsou osteolytická ložiska. Maligní mutace se vytváří na úrovni lymfocytu, který se nekontrolovatelně množí a vyzrává do patologických plazmatických buněk produkující monoklonální protein (M-protein). U buněk mnohočetného myelomu je také početný výskyt cytogenetických aberací. Detekce cytogenetických aberací se provádí spíše metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Z důvodu malého počtu proliferovaných buněk je metoda FISH upřednostňovaná před cytogenetickým vyšetřením. Mezi soubor příznaků tohoto nádorového onemocnění patří hyperkalcemie, renální insuficience, anémie (slabost, únava) a kostní příznaky (osteolýza, patologické zlomeniny). Z laboratorních výsledků bývá zvýšená celková bílkovina a v ELFO nález monoklonálního protien. Dále u těchto pacientů bývá hyperkalcemie, zvýšený LD, beta2 mikroglobulin a známky renální insuficience u pokročilých stádií. V moči se prokazuje Bence-Jonesova bílkovina a v kostní dřeni se nachází zmnožené plazmocyty. Myelom se zatím řadí mezi nevyléčitelné onemocnění. Léčba probíhá kombinací chemoterapie, kortikoidů a nových léků. Možností prodloužení života pacientů o 5-10 let je také autologní transplantace kostní dřeně. (Adam, 2008; Navrátil, 2008)

1.6.1 Ošetření erytrocytů pomocí DTT

Tato metoda se využívá u pacientů s mnohočetným myelomem. Tito pacienti jsou léčeni pomocí léku daratumumab (darzelex...). Daratumumab je monoklonální protilátka třídy IgG1 ta se váže na antigen CD 38, který je přítomný na různých tělních buňkách, na krevních buňkách včetně erytrocytů a také je exprimovaný na myelomových buňkách. Po podání tohoto léku dochází k falešným pozitivitám v antiglobulinových testech (screening antierytrocytárních protilátek, identifikace protilátek a zkouška kompatibility) tyto pozitivitu vznikají pouze v NAT testu, event. i u PAT. Protilátky anti-CD 38, které jsou přítomné v plazmě pacienta léčeného daratumumabem reagují se všemi diagnostickými i dárcovskými erytrocyty, které exprimují antigen CD 38. Tyto falešně pozitivní reaktivity mizí po působení dithiotreitolu. DTT způsobí rozrušení terciální struktury bílkovin ireverzibilním uvolněním disulfidických můstků (viz obrázek 6). Nevýhoda této metody je destrukce

některých erythrocytárních antigenů (Kell, Lutheran, Carwright, Knops, Domrock, Indian) a tak nelze detekovat protilátky proti nim. (sukl.cz/leciva/em-daratumumab-online)



Obrázek 6: Schéma ošetření erythrocytů pomocí DTT

Zdroj: sukl.cz/leciva/em-daratumumab-online

2 Experimentální část

2.1 Cíle práce a hypotézy

Pro moji bakalářskou práci bylo určeno několik cílů.

Cíl 1: Seznámení se s problematikou předtransfuzního imunohematologického vyšetření u pacientů s AIHA a MM.

Cíl 2: Provést všechna potřebná předtransfuzní laboratorní vyšetření před expedicí erytrocytárního transfuzního přípravku pro pacienty s AIHA a MM.

Cíl 3: Statistické vyhodnocení jednotlivých vzorků u pacientů s AIHA a MM. Předpokládá se vyšetření a statistické vyhodnocení cca třiceti vzorků.

Práce se věnuje následujícím výzkumným otázkám:

- a) U kolika procent vyšetřovaných pacientů s AIHA byla po vysycení plazmy zjištěna aloprotilátka?
- b) Vysycené sérum získáme po inkubaci séra se sedimentem vlastních (ev. dárcovských) erytrocytů. Kolik cyklů je potřeba k vysycení plazmy (dosažení negativního screeningu protilátek nebo případné indentifikaci aloprotilátky)?

2.2 Metodika

Metody vysycení (neboli adsorbční test) plazmy pacienta pomocí PEG a ošetření erytrocytů pomocí DTT se ve FN Plzeň provádí na Transfuzním oddělení Bory v imunohematologické laboratoři, ve které pracuji. Na Transfuzním oddělení ve FN Plzeň bylo za období od 1.1.2021- 31.12.2022 zpracováno a vysyceno 39 vzorků od pacientů s diagnózou AIHA a ošetřeny erytrocyty (diagnostické, popř. dárcovské) u 10 pacientů s mnohočetným myelomem, kteří byli léčeni Daratumumabem (Darzalexem). V této laboratoři se provádí všechna předtransfuzní vyšetření, která k těmto dvěma speciálním metodám patří. Výjimkou je vyšetření krevní skupiny a zkoušky kompatibility, které se vyšetřují na krevních skladech FN Plzeň Bory nebo Lochotín. V mé práci se budu zabývat všemi předtransfuzními vyšetřeními, která jsou nutná u patientských vzorků provést, než jsou erytrocytární transfuzní přípravky propuštěny a připraveny k expedici na dané oddělení pro podání konkrétnímu pacientovi. Dále budou zpracována data pacientů, u nichž bylo provedeno vysycení plazmy nebo ošetření erytrocytů pomocí DTT.

2.2.1 *Vyšetření krevní skupiny AB0 a RhD antigenu*

Na transfuzním oddělení ve FN Plzeň se určuje krevní skupina v AB0 systému a RhD antigen orientačně metodou na sklíčku a u nových pacientů je sklíčková metoda doplněna metodou sloupcové aglutinace na gelových kartách od firmy Bio-Rad. Vyšetření krevní skupiny na sklíčku se provádí pomocí monoklonálních diagnostických sér anti-A, anti-B a anti-A, B od firmy Sanquin. RhD antigen je vyšetřován pomocí diagnostického séra anti-D od firmy CE-IMMUNDIAGNOSTIKA. Na předem připravené a označené podložní sklo kápneme jednu kapku diagnostického séra anti-A, anti-B, anti-A, B a anti-D, poté přidáme ke každé kapce diagnostického séra jednu kapku plné krve pomocí Pasteurovy pipety. Vezmeme si čisté podložní sklíčko a rohem smícháme diagnostické sérum s krví pacienta do tvaru oválku. Na každý druh antiséra použijeme čistý roh sklíčka, aby nedošlo ke kontaminaci jiným antisérem. Takto promíchaná antiséra s krví pacienta necháme inkubovat 2 minuty při pokojové teplotě a poté jemným kývavým pohybem sklíčka odečítáme, zda došlo k tvorbě shluků (aglutinaci). Pokud jsou shluky přítomny, hodnotíme reakci jako pozitivní a znamená to přítomnost daného antigenu na erytrocytech pacienta. Pokud nedošlo k tvorbě žádných shluků, hodnotíme jako negativní výsledek. Pomocí této metody se vyšetřuje krevní skupina AB0 a RhD antigen pouze orientačně, a proto se u nových pacientů s dosud

ještě nevyšetřenou krevní skupinou musí tato metoda doplnit dalším testem (např. sloupcová aglutinace na gelových kartách nebo metoda zkumavková).

Jako další metoda pro stanovení krevní skupiny AB0 systému a RhD antigenu je sloupcová aglutinace na gelových kartách DiaClon AB0/D + Reverse Grouping od firmy Bio-Rad. Tato metoda je přesnější a spolehlivější, proto se provádí u nových pacientů, u nichž nebyla krevní skupina dosud kompletně stanovena. Tato karta, na které se krevní skupina s RhD antigenem stanovují, má 6 mikrozkušavek, jejichž dolní část je naplněna gelem a horní část slouží pro inkubaci. V prvních třech mikrozkušavkách, ve kterých se stanovují antigeny na erythrocytech, je obsažena kromě gelu i reagentie, která obsahuje specifické monoklonální protilátky (anti-A, anti-B a anti-D). Další čtvrtá jamka slouží jako kontrolní (Ctl) a poslední dvě jamky jsou určeny pro stanovení aglutininů v plazmě pacienta. Vyšetření provádíme tak, že zkumavku s plnou krví dáme centrifugovat na 8 minut při 3000 ot/min. Označíme si tři zkumavky, do jedné Pasteurovou pipetou odsajeme plazmu, do druhé nabereme malé množství erythrocytů. Erythrocyty promyjeme v promývací centrifuze a připravíme si 5 % suspenzi erythrocytů (25 µl sedimentu erythrocytů v 0,5 ml Diluentu 2) v LISS roztoku (roztok o nízké iontové síle). Takto připravenou 5 % suspenzi kapeme do prvních čtyř mikrozkušavek po 10µl určených pro vyšetření aglutinogenů. Pro detekci aglutininů se používají poslední dvě jamky v destičce, které jsou označeny A₁ (pipetujeme 25µl diagnostických erythrocytů A₁ a 25µl plazmy pacienta) a B (pipetujeme 25µl diagnostických erythrocytů B a 25µl plazmy pacienta). Centrifugujeme karty v ID centrifuze od firmy Bio-Rad 10 minut při 910 rpm a poté makroskopicky odečítáme. Pokud dojde k aglutinaci, protilátka se navázala na antigen, který je přítomný na povrchu erythrocytu. Podle velikosti vzniklých aglutinátů prochází erythrocyty prostorem v gelu. Jedná-li se o silnou reakci, vytváří erythrocyty proužek pouze na horní části gelu a dále se již v gelu tzv. nesypou, tuto reakci hodnotíme na čtyři kříže. Mírně se sypající erythrocyty z horní části gelu směrem ke spodní části se hodnotí na tři kříže, sypající se erythrocyty ve střední a spodní části gelu hodnotíme na dva kříže. Na jeden kříž hodnotíme slabé reakce, kdy se krvinky sypou jen lehce ve spodní části gelu. A jako poslední pozitivní reakci popisujeme slabě pozitivní, kde se nachází ojedinělé aglutinace erythrocytů v dolní části gelu. Za negativní výsledek považujeme ten, kdy nedošlo k žádné aglutinaci a všechny erythrocyty prošly během centrifugace gelem a jsou sedimentovány na spodní části mikrozkušavky

(žádné erytrocyty se zde v gelu nesypou). Kontrolní mikrozkušavka (Ctl) musí vyjít vždy negativní.

2.2.2 Vyšetření screeningu antierytrocytárních protilátek a identifikace protilátek

Tato metoda se na Transfuzním oddělení ve FN Plzeň vyšetřuje na gelových kartách sloupcovou aglutinací od firmy Bio-Rad. Standardně se u pacientů, u kterých se bude podávat transfuze, vyšetřuje screening antierytrocytárních protilátek v NAT (nepřímý antiglobulinový test). K tomuto vyšetření potřebujeme firemně vyrobené ID karty, které obsahují 6 mikrozkušavek. Každá mikrozkušavka je tvořena inkubační komůrkou, jež se nachází v horní části mikrozkušavky a dále potom ve spodní části mikrozkušavky se nachází gelový sloupec. Tento sloupec obsahuje polymerizované mikročástice dextranu v pufrovaném médiu a slouží jako filtr. U metody nepřímého antiglobulinového testu je v kartách přidáno ještě AGH sérum. Samotné vyšetření se provádí tak, že do předem označených tří jamek na gelové kartě napipetujeme 50 μ l diagnostických erytrocytů označených I., II., III. (ID-DiaCell) pro NAT test a k nim přidáme 25 μ l plazmy pacienta. Kartu dáme inkubovat do ID-inkubátoru na 15 minut při 37°C. Po uplynutí inkubační doby dáme kartičku do centrifugy ID-centrifugy na 10 minut při 910 rpm centrifugovat. Poté makroskopicky odečítám, pokud došlo během centrifugace k zachycení aglutinátů červených krvinek na povrchu nebo uvnitř gelového sloupce, jedná se o pozitivní reakci. Pokud všechny neaglutinované krvinky prošly až na dno mikrozkušavky, jedná se o reakci negativní. Vyjde-li screening v NAT testu pozitivní, musí se doplnit o vyšetření specifity protilátek pomocí panelu erytrocytů. Toto vyšetření se provádí stejným způsobem jako screening, s tím rozdílem, že do mikrozkušavek se pipetují panelové diagnostické erytrocyty (ID-DiaPanel), u systému Bio-Rad je jich celkem 11. Po vyhodnocení všech screeningových a panelových erytrocytů, které reagovaly s plazmou pacienta, můžeme dle identifikační tabulky antigenů (antigenní zastoupení ve všech daných lahvičkách diagnostických erytrocytů) určit specifitu protilátky (viz Obrázek 7). Jsou-li v plazmě pacienta obsažené protilátky, které jsou odhalené v NAT testu, doplníme ještě vyšetření v enzymovém papainovém testu. Ten se provádí stejným způsobem jako NAT test, jen s odlišností v tom, že používáme neutrální karty, kde je místo AGH obsažený pouze neutrální gel a přidáváme diagnostické erytrocyty, které jsou již natrávené enzymem, konkrétně zde papainem (ID-DiaCell P, ID-DiaPanel P). Hodnocení provádíme stejně jako u NAT testu.

polepené nebo popsané zkumavky číslem konzervy, dárcovské erytrocyty vypustíme. Zkumavku s dárcovskou krví dáme promýt do promývací centrifugy a poté si do Diluentu 2 uděláme náplav dárcovských erytrocytů. Připravíme si také předem zcentrifugovaný patientský vzorek, u kterého oddělíme plazmu od krvinek. Do gelové karty pro NAT napipetujeme 50 µl náplavu dárcovských erytrocytů a k nim přidáme 25 µl patientské plazmy. Pro vyšetření enzymovým papainovým testem provádíme test kompatibility stejným způsobem jako u NAT testu kompatibility, pouze s tím rozdílem, že pipetujeme do neutrálních ID-karet a nakonec přidáváme ještě 25 µl papainu k dárcovským krvinkám a patientské plazmě. Po napipetování dáme na 15 minut inkubovat při 37 °C a po inkubaci centrifugujeme 10 minut při 910 rpm. Poté makroskopicky odečítáme. Pokud došlo během centrifugace k zachycení aglutinátů červených krvinek na povrchu nebo uvnitř gelového sloupce, jedná se o pozitivní reakci (inkompatibilní zkoušku kompatibility). Pokud všechny neaglutinované krvinky prošly až na dno mikrozkušavky, jedná se o reakci negativní a tuto zkoušku kompatibility vydáváme jako kompatibilní. Platnost testu kompatibility je 72 hodin od odběru vzorku, po uplynutí této doby je nutné provést test kompatibility z nového vzorku. V případě, kdy pracujeme s vysycenou plazmou, se prodlužuje platnost testu kompatibility na 7 dní od data odběru. Pokud kvůli absolutnímu nedostatku RhD negativních erytrocytárních přípravků na krevních skladech vydáváme RhD negativnímu pacientovi RhD pozitivní přípravky, je platnost testu kompatibility zkrácena jen na 24 hodin.

2.2.4 *Vyšetření autoprotilátek*

Vyšetření autoprotilátek se provádí v NAT testu, enzymovém papainovém testu, ale také při 4°C. Vyšetřují se na gelových kartách od firmy Bio-Rad sloupcovou aglutinací. Do ID-karty napipetujeme 50 µl předem připraveného náplavu erytrocytů pacienta a k nim přidáme 25 µl plazmy pacienta (u enzymatického testu ještě přidáváme 25 µl papainu). Inkubujeme 15 minut při 37 °C (event. 4° C) a poté centrifugujeme a odečítáme aglutinaci.

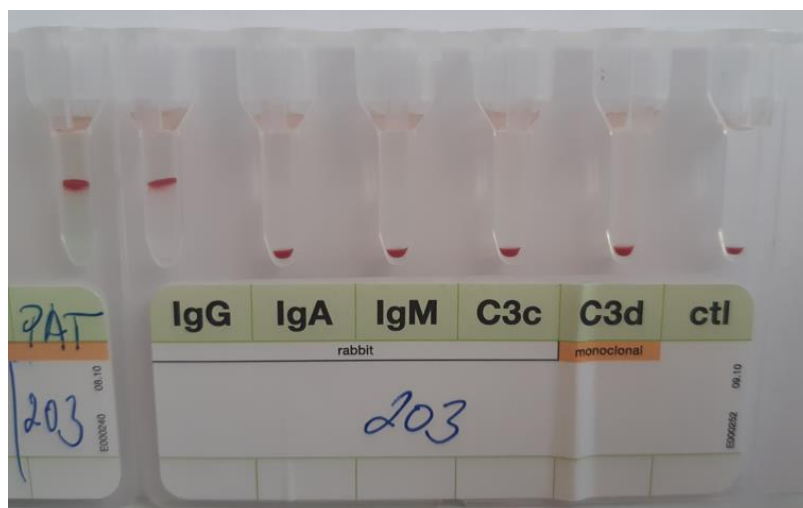
2.2.5 *Přímý antiglobulinový test (Coombsův test)*

K vyšetření přímého antiglobulinového testu jsou zapotřebí krvinky pacienta. Po centrifugaci patientského vzorku, si řádně popíšeme tři aglutinační zkumavky číslem vyšetření. Do první zkumavky odsajeme plazmu, do druhé zkumavky odsajeme část erytrocytů a do třetí zkumavky si připravíme 0,5 ml Diluentu 2, do kterého budeme

promyté erytrocyty ředit. Druhou zkumavku s erytrocyty pacienta si 3x promyjeme ve fyziologickém roztoku. Z promytých erytrocytů si připravíme suspenzi erytrocytů, takže k předem připraveným 0,5 ml Diluentu 2 přidáme 5 µl promytých krvinek pacienta (suchá kapka). Potom opatrně promícháme, připravíme si a řádně popíšeme gelovou kartu LISS/Coombs AGH a do jedné mikrozkušavky napipetujeme 50 µl předem připravené suspenze erytrocytů. ID-kartu centrifugujeme 10 minut v ID-centrifuze a poté odečítáme. Pokud aglutinované erytrocyty vytváří na povrchu gelu červenou linku nebo jsou v gelu rozptýleny, jedná se o pozitivní výsledek a prokazujeme tím vazbu protilátky nebo složek komplementu na erytrocyty pacienta (viz Obrázek 8). V případě negativního výsledku jsou všechny erytrocyty usazeny na dně mikrozkušavky a žádné protilátky se na pacientovy erytrocyty nevážou.

- **Upřesnění typu senzibilizace erytrocytů**

V případě positivity přímého antiglobulinového testu doplníme vyšetření na upřesnění typu senzibilizace erytrocytů na ID-kartách DC-Screening I od firmy Bio-Rad. Připravíme si ID-kartu DC-Screening I a řádně popíšeme číslem vyšetření. Do všech šesti mikrozkušavek na ID-kartě napipetujeme 50 µl promytých erytrocytů pacienta. ID-kartu centrifugujeme 10 minut a poté odečítáme výsledky stejně jako u PAT. Podle pozitivních výsledků vyhodnotíme, o jakou třídu protilátky se jedná a popř. jakou složkou komplementu jsou erytrocyty senzibilizovány (viz Obrázek 8).

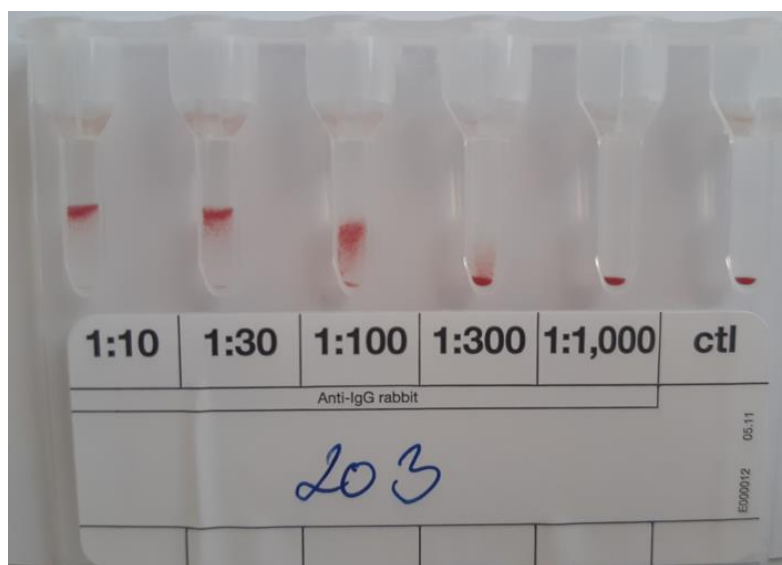


Obrázek 8: ID-karta LISS/Coombs AGH s pozitivním PAT a ID-kartu DC-Screening I s pozitivní třídou protilátek IgG (ID-karty od firmy Bio-Rad)

Zdroj: vlastní foto

- **Stanovení titru protilátky třídy IgG**

Pokud dojde u pacienta k senzibilizaci erytrocytů protilátkami třídy IgG, stanovujeme dále titr protilátky IgG. Vyšetření provádíme stejným způsobem jako určení typu senzibilizace erytrocytů, ale používáme ID-karty DAT IgG-Dilution od firmy Bio-Rad, kde je již protilátka IgG vytitrována do jednotlivých mikrozkušavek. V případě positivity titru 1:300 a vyšším musíme ještě stanovit podtřídu IgG a její titr (viz Obrázek 9).

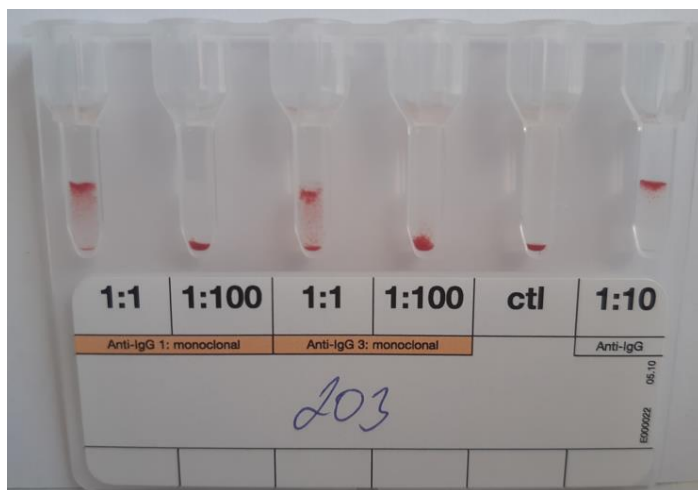


Obrázek 9: ID-karta DAT IgG-Dilution od firmy Bio-Rad s titrem IgG 1:300+

Zdroj: vlastní foto

- **Určení podtřídy IgG1/IgG3 a jejich titr**

Vyšetřujeme při zjištění závažného titru IgG protilátky na erytrocytech pacienta. Vyšetření je prováděno stejným způsobem jako upřesnění senzibilizace erytrocytů a vyšetření titru IgG, s tím rozdílem, že se používají ID-karty DAT IgG1/IgG3 od firmy Bio-Rad. Po odečtení výsledků posuzujeme možné riziko vzniku hemolýzy erytrocytů u pacienta (viz Obrázek 10). Vysoké riziko hemolýzy hrozí v případě, kdy titr protilátek podtřídy IgG1 nebo IgG3 dosahuje hodnoty 1:100, popřípadě je takto vysoký titr u obou podtříd současně. U hodnot titrů 1:1 je riziko hemolýzy mírné, vždy je však nutno výsledky imunohematologického vyšetření porovnat s ostatními laboratorními výsledky pacienta (krevní obraz, parametry hemolýzy).



Obrázek 10: ID-karty DAT IgG1/IgG3 od firmy Bio-Rad s titrem IgG1 1:100 +- a IgG3 1:100 +

Zdroj: vlastní foto

2.2.6 *Vyšetření chladových aglutininů*

Při požadavku na vyšetření chladových aglutininů je potřeba dodržet odběr i transport vzorku při 37 °C. Bude-li transport vzorku na delší vzdálenost, je nutné zajistit co nejdříve separaci vzorku plazmy (séra) od krvinek. Separace se provádí centrifugací vzorku po dobu 8 minut při 3000 ot/min.

Vzorek pacienta co nejdříve po odběru centrifugujeme 8 minut při 3000 ot/min. Připravíme si a řádně popíšeme tři aglutinační zkumavky číslem vyšetření. Do první zkumavky odsajeme plazmu (sérum) pacienta, do druhé zkumavky odsajeme část erytrocytů pacienta a do třetí zkumavky si připravíme 0,5 ml Diluentu 2. Druhou zkumavku s erytrocyty pacienta 3x promyjeme ve fyziologickém roztoku v promývací centrifuze. Poté si připravíme předem vychlazenou ID-kartu „NaCl, enzyme test and cold agglutinins“, kterou si řádně popíšeme číslem vyšetření a každou jamku číslem diagnostických screeningových erytrocytů, popř. čísly panelových erytrocytů, poslední mikrozkušavku vždy popisujeme jako vlastní autokontrola.

Do každé mikrozkušavky pipetujeme 50 µl příslušných diagnostických erytrocytů (ID-DiaCell, ID-DiaPanel) a do poslední mikrozkušavky vlastní promyté erytrocyty naředěné v Diluentu 2. Do každé mikrozkušavky přidáme 25 µl vyšetřované patientské plazmy a ID-kartu inkubujeme 30 minut při 4 °C. Po inkubaci centrifugujeme 10 minut v ID-centrifuze, poté odečítáme negativní nebo pozitivní výsledek.

Při pozitivních reakcích se všemi diagnostickými screeningovými i panelovými erytrocyty musíme potvrdit nebo vyloučit protilátku anti-I. Test se provádí

s 3x promytými pupečnickovými erytrocyty krevní skupiny 0 (I negativní) naředěnými v Diluentu 2 (pupečnickové erytrocyty od 2-3 novorozenců). 50 µl pupečnickových erytrocytů napipetujeme do předem označené a vychlazené ID-karty „NaCl, enzyme test and cold agglutinins“ a k nim přidáme 25 µl plazmy pacienta. Dále ID-kartu inkubujeme 30 minut při 4 °C a poté kartu centrifugujeme 10 minut v ID-centrifuze. V případě, že po odečtení nedojde k aglutinaci patientské plazmy s novorozeneckými erytrocyty, jedná se o chladovou protilátku anti-I (nemoc CAD).

2.2.7 Stanovení Rh fenotypu a antigenu Kell pacienta

Rh fenotyp a Ag Kell je na Transfuzním oddělení FN Plzeň stanovován na ID-kartách DiaClon Rh-Subgroups od firmy Biorad. Vyšetřuje se u žen v těhotenství, u dívek a žen ve fertilním věku (tj. do 50 let), u hematologicky nemocných pacientů s předpokládanou potřebou opakovaných transfuzí a dále u pacientů se známou nepravidelnou protilátkou. Stanovení Rh fenotypu a Ag Kell je možné pouze u pacientů, kteří nebyli v posledních 3-4 měsících transfundováni. Vyšetření se provádí s 5 % suspenzí patientských erytrocytů naředěných v ID-Diluentu 2, tak že do čisté a řádně popsané zkumavky se napipetuje 0,5 ml ID-Diluentu 2 a přidá se 50 µl plné krve nebo 25 µl koncentrátu erytrocytů. Jemně se zkumavka protřepe a do řádně označené ID-karty se do všech mikrozkušavek pipetuje 10 nebo 12,5 µl suspenze erytrocytů. ID-karta se centrifuguje v ID-centrifuze 10 minut. Poté se odečítá výsledek u každého antigenu. Vytváří-li aglutinované erytrocyty na povrchu gelu červenou linku nebo jsou v gelu rozptýleny, jedná se o pozitivní výsledek. V případě negativního výsledku jsou všechny erytrocyty usazeny na dně mikrozkušavky.

2.2.8 Určování ostatních erytrocytárních antigenů

K určování erytrocytárních antigenů jsou využívána známá diagnostická antiséra, někdy antiséra nahrazují ID-karty (dle dostupnosti). Každý stanovovaný antigen má předepsanou dobu inkubace a prostředí, ve kterém ho stanovujeme (vše je uvedeno v příbalovém letáku, který je dostupný u antiséra od výrobce).

Pokud antigeny stanovujeme aglutinačně zkumavkovým testem, připravíme si 3-5 % suspenzi testovaných erytrocytů ve fyziologickém roztoku. Dále si připravíme prázdnou aglutinační zkumavku, kterou popíšeme číslem vyšetření a daným antigenem, který chceme stanovit. Do zkumavky dáme jednu kapku konkrétního diagnostického antiséra a přidáme jednu kapku předem připravené suspenze testovaných erytrocytů.

Zkumavku poté inkubujeme při laboratorní teplotě po dobu, která je určena v příbalovém letáku k danému antiséru. Po inkubaci zkumavku centrifugujeme 30 sekund při 779 g. Poté sediment jemně protřepeme a makroskopicky odečítáme aglutinaci. V případě negativního výsledku aglutinace nevzniká. Případnou aglutinaci hodnotíme dle síly na jeden až čtyři kříže. Pokud je výsledek negativní, znamená to, že vyšetřovaný člověk daný antigen na svých erytrocytech nemá. V případě pozitivního výsledku daný antigen na svých erytrocytech vyšetřovaný člověk má přítomen.

Některé antigeny musíme kvůli absenci diagnostika pro přímou aglutinaci stanovit pomocí nepřímého antiglobulinového testu. Postup tohoto stanovení je odlišný od přímé aglutinace v tom, že inkubace probíhá 30 minut při 37 °C v inkubátoru. Po inkubaci se zkumavka 3x promyje fyziologickým roztokem v promývací centrifuze a poté přikápneme jednu kapku AGH a dobře promícháme. Poté zkumavku centrifugujeme 30 sekund při 779 g a makroskopicky odečítáme. V případě negativní reakce raději zkontrolujeme pod mikroskopem a negativní reakci potvrdíme přidáním jedné kapky Coombs kontrolních erytrocytů, znovu zkumavku centrifugujeme a hodnotíme. Při správně provedeném testu už by měl být výsledek pozitivní, pomocí CCC krvinek kontrolujeme funkčnost AGH séra. Hodnocení v případě pozitivní reakce (vznik aglutinace) hodnotíme stejným způsobem jako u aglutinační metody. Antigeny, které stanovujeme přes NAT test, můžeme vyšetřovat pouze u pacientů s negativním PAT, u PAT pozitivních osob by mohlo dojít k falešně pozitivním výsledkům.

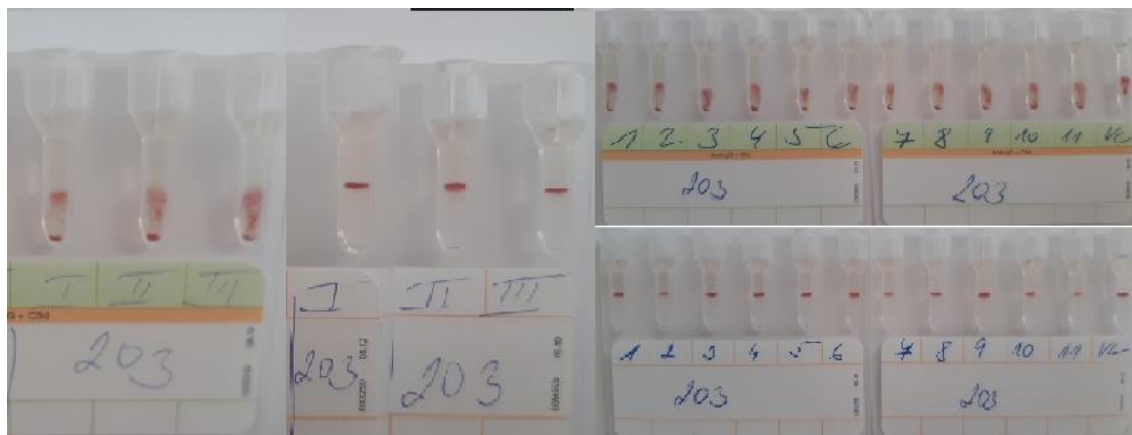
U metod stanovení erytrocytárních antigenů na gelových kartách jsou postupy individuální u každého antigenu. Někdy už jsou daná antiséra v gelových kartách předkapána z firemní výroby, pak už přidáváme pouze suspenzi erytrocytů. Jindy musíme do gelové karty napipetovat suspenzi vyšetřovaných erytrocytů i příslušné antisérum. Inkubace jsou individuální dle příbalového letáku, po inkubaci gelové karty centrifugujeme v ID-centrifuze a hodnotíme přítomnost nebo nepřítomnost daného antigenu na vyšetřovaných erytrocytech.

U každého antigenu, který vyšetřujeme, musíme vždy stanovit pozitivní a negativní kontrolu s příslušnými firemními diagnostickými erytrocyty, u kterých máme garanci obsahu jednotlivých antigenů.

2.2.9 Vysycení plazmy pomocí PEG

Toto laboratorní vyšetření se provádí především u pacienta, který má diagnózu AIHA. Vlivem přítomnosti autoprotilátek je u těchto osob screening protilátek, panel

erytrocytů (viz Obrázek 11), vlastní erytrocyty i PAT pozitivní. Taktéž nelze nalézt vhodný kompatibilní transfuzní přípravek standardním předtransfuzním vyšetřením. Proto provádíme odstranění autoprotilátek z plazmy pacienta a zjišťujeme, zda není v plazmě pacienta přítomna ještě i nějaká skrytá aloprotilátka.

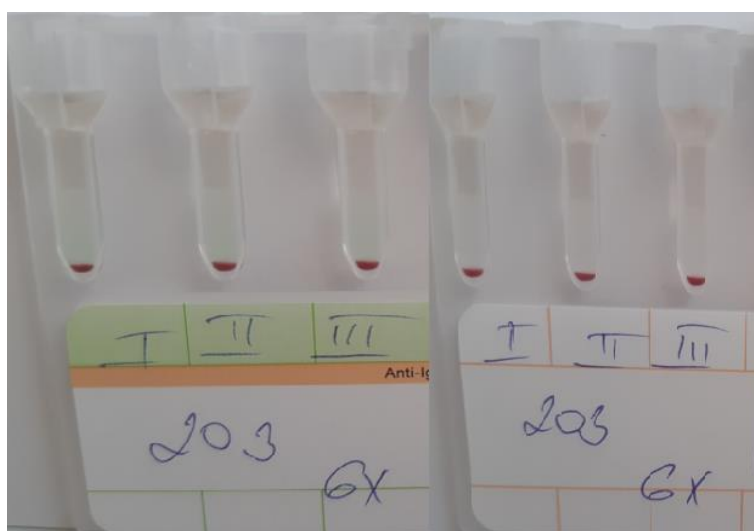


Obrázek 11: Pozitivní reakce se všemi diagnostickými erytrocyty u pacienta s AIHA (screening + panel v NAT i papainovém testu)

Zdroj: vlastní foto

Vysycení plazmy pacienta lze provést pomocí vlastních erytrocytů, ale pouze v případě, že pacient nebyl v posledních 3 měsících transfundován a není anemický pro odběr vzorku (požadované množství vzorku je 3 x 6ml nesrážlivé krve odebrané do EDTA). V případě, že nemůžeme vysycovat vlastními erytrocyty, volíme erytrocyty dárcovské. Dárcovské erytrocyty vybíráme vždy krevní skupiny 0, které jsou co nejvíce shodné v erytrocytárních antigenech s antigeny pacienta. Musíme zachovat negativitu minimálně v antigenním systému Rh, C^w, Kell a Kidd, popř. i dalších antigenních systémech. Tyto vybrané dárcovské erytrocyty nebo vlastní erytrocyty pacienta po centrifugaci vzorku a oddělení plazmy třikrát promyjeme ve fyziologickém roztoku. Z mrazáku si vyndáme předem připravenou substanci 1 % ficinu a připravíme si ficinované erytrocyty (provádí se těsně před vlastním vyšetřením). K 0,5 ml 1 % rozmrazeného roztoku ficinu, který smícháme se 4 ml fyziologického roztoku, přidáme 0,5 ml erytrocytů (vlastních nebo dárcovských) třikrát promytých ve fyziologickém roztoku. Vše promícháme a necháme inkubovat v termostatu 15 minut při 37°C. Po inkubaci zkumavku s ficinovanými erytrocyty centrifugujeme 2 minuty při 2000 ot/min. Po centrifugaci erytrocyty ještě jednou promyjeme ve fyziologickém roztoku a odstraníme supernatant. Dále už provádíme samotné vysycení plazmy tak, že k 1 dílu patientského séra přidáme 0,5 dílu suchých ficinovaných erytrocytů a 1 díl PEG. Vše promícháme a inkubujeme 15 minut při 37°C. Po inkubaci

centrifugujeme 2 minuty při 3400 ot/min. Sérum oddělíme do čisté zkumavky a přidáme další díl ficinovaných erytrocytů k séru s PEG, znovu inkubujeme, centrifugujeme. Tento postup s přidáváním ficinovaných erytrocytů provádíme do vysycení plazmy. Většinou stačí šest cyklů. Pokud jsou ale ficinované erytrocyty po centrifugaci pevně přilepené na dno zkumavky, znamená to, že jsou autoprotilátky stále přítomné v plazmě a je nutno pokračovat ve vysycování. Vždy po šestém cyklu vyzkoušíme, zda už je plazma vysycená a provedeme screening v NAT testu a enzymovém papainovém testu. Pokud výsledek screeningu vyjde negativní, plazma pacienta se vysytila, autoprotilátky byly z plazmy odstraněny a nejsou přítomny žádné skryté aloprotilátky (viz Obrázek 12).



Obrázek 12: Výsledek screeningu erytrocytů v NAT i papainovém testu negativní po vysycení plazmy pacienta

Zdroj: vlastní foto

2.2.10 Ošetření erytrocytů pomocí DTT

Tato laboratorní metoda je ve FN Plzeň v laboratoři speciální imunohematologie vyšetřována teprve třetím rokem, prvního pacienta jsme touto metodou vyšetřili na podzim roku 2020. Pomocí DTT se ošetřují diagnostické erytrocyty (screeningové, popř. panelové) i dárcovské erytrocyty. Důležitý je výběr erytrocytárního transfuzního přípravku pro zkoušku kompatibility. Vybíráme konzervu shodnou v ABO systému, Rh(D)antigenu, Rh fenotypu a zohledňujeme také erytrocytární antigeny C^w, Jk^a, Jk^b. Erytrocytární transfuzní přípravek musí být vždy Kell negativní, protože DTT denaturuje Ag K a nelze pak detekovat protilátky proti nim. Diagnostické i dárcovské erytrocyty promyjeme 4x ve fyziologickém roztoku. Po posledním promytí smícháme

400 µl 0,2 M roztoku DTT se 100 µl sedimentu promytých erytrocytů. Inkubujeme v termostatu při 37 °C cca 30-45 minut za stálého míchání po 5 minutách. Poté erytrocyty promyjeme 4x ve fyziologickém roztoku, a pokud se objeví výrazná hemolýza, je nutné postup zopakovat s čerstvými erytrocyty a menším objemem DTT. Po řádném ošetření erytrocytů pomocí DTT si připravíme 2-5 % suspenzi erytrocytů v LISS roztoku a pipetujeme do identifikační LISS karty 50 µl suspenze krvinek a přidáváme 25 µl plazmy/séra pacienta. Identifikační kartu inkubujeme v termostatu 15 minut při 37 °C a poté centrifugujeme 10 minut při 900 otáčkách. Je-li výsledek screeningu, popř. zkoušky kompatibility v NAT negativní, jednalo se o falešnou pozitivitu způsobenou vlivem vazby monoklonální protilátky na erytrocyty. V rámci kontroly jakosti provádíme také negativní kontrolu. K jedné kapce Kell pozitivních kontrolních erytrocytů přidáme do zkumavky jednu kapku antiséra anti-Kell, výsledek by měl být negativní, protože DTT denaturuje Ag K. Dále stanovujeme pozitivní kontrolu, kdy k jedné kapce E pozitivním kontrolním erytrocytům přidáme do zkumavky jednu kapku antiséra anti-E, zde by měl být výsledek pozitivní.

2.3 Vydávání výsledků

Všechny výsledky jsou zaznamenávány do pracovního listu a do počítačových programů LIS Orpheus a Amadeus, výsledky jsou dále pověřeným lékařem zkontrolovány, vytisknuty a odeslány na příslušná oddělení, která vyšetření indikovalo.

2.4 Kontrola kvality

Všechna používaná diagnostika pro vyšetření antierytrocytárních protilátek (screeningové, panelové erytrocyty), diagnostika na vyšetření krevních skupin, ID-karty na všechna prováděná vyšetření včetně vizuální kontroly všech používaných roztoků jsou zařazeny do systému vnitřní kontroly kvality. Všechna využívaná diagnostika a reagentie v imunohematologické laboratoři jsou na TO FN Plzeň kontrolovány i v rámci externí kontrolou kvality SEKK, která probíhá dvakrát za rok.

3 Statistická data – sběr a zpracování

Pro tuto bakalářskou práci byla použita data a výsledky vyšetření, která byla provedena v laboratoři speciální imunohematologie na Transfuzním oddělení ve Fakultní nemocnici v Plzni. Výsledky byly získávány v časovém rozmezí od 1.1.2021 do 31.12.2022. Získaná data zobrazují problematiku speciálních předtransfuzních vyšetření u pacientů s diagnózou AIHA nebo MM, u nichž nelze standardními postupy připravit kompatibilní transfuzní přípravek.

Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Plzeň provádí tato specializovaná vyšetření především pro klinická oddělení ve FN Plzeň. Méně často jsou vyšetření prováděna pro externí žadatele, protože zde nejsou zatím dostupná (např. Rokycanskou nemocnici, Klatovskou nemocnici, Stodskou nemocnici nebo Domažlickou nemocnici).

Data byla sbírána po dobu dvou let a za toto období bylo získáno celkem 39 vzorků od pacientů s diagnózou AIHA, u kterých bylo provedeno vysycení plazmy a 10 vzorků pacientů s diagnózou MM, u kterých bylo provedeno ošetření erytrocytů pomocí DTT. Ve svém statistickém zhodnocení uvádím pouze pacienty vyšetřené těmito speciálními metodami v laboratoři speciální imunohematologie. Tyto metody byly u některých pacientů provedeny i opakovaně, ale do vyhodnocení výsledků byla vždy použita pouze data z prvního vstupního vyšetření tohoto problematického pacienta, protože jen u nového pacienta (při prvním záchytu AIHA, MM po léčbě) jsou provedena všechna kompletní předtransfuzní a speciální imunohematologická vyšetření. Při opakovaném požadavku na transfuze se už některá vyšetření znovu neprovádí nebo se opakují až s odstupem času. Získaná data byla zpracována do tabulek a grafu v MS Excel.

3.1 Vyšetření pacienti s diagnózou AIHA u nichž bylo provedeno vysycení plazmy

V roce 2021 bylo na TO FN Plzeň provedeno vysycení plazmy u 19 pacientů, z toho se jednalo o jedenáct žen a osm mužů. Průměrný věk pacientů byl 58 let v rozmezí věku od 19 let do 92 let. Mezi těmito pacienty bylo i 5 těhotných žen, u kterých během těhotenského screeningu protilátek a následného imunohematologického vyšetření byla diagnostikována susp. AIHA. Soubor tvořili pacienti krevních skupin nejčastěji 0+ a A+, méně byla zastoupena krevní skupina 0-, AB- a B- (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Vyšetření pacienti s AIHA za rok 2021 (základní informace)

Pacient č.	Pohlaví	Diagnóza	Věk	Krevní skupina	Fenotyp	Ostatní erytrocytární antigeny
1.	M	D599	67	A+	CCee, K-	Cw-, Jk(a+b-)
2.	Ž	D591	89	0-	ccee, K-	Cw-, Jk(a+b+), P+, Le(a+b-), M+, N+, S+
3.	Ž	D70	19	A+	Ccee, K-	Cw-, Jk(a+b-)
4.	Ž	D649	92	0+	CCee, K-	Cw-, M+, N+, P+, Le(a-b+), Jk(a+b+), Lu(a-b+), Fy(a+b-), S+, s+
5.	M	I210	83	A+	CcEe, K-	Cw-, Jk(a+b-)
6.	Ž	O360	29	0+	CCee, K-	M+, N+, P-, Le(a-b+), Jk(a-b+), S-, Cw-
7.	Ž	O908	35	AB-	ccee, K-	Cw-, Jk(a+b+), F(a-b+)
8.	M	C911	84	0+	CcEe, K-	Cw-, P+, Jk(a-b+), Le(a+b+), M+, N+, S-
9.	M	D510	74	0+	CCee, K-	M+, N+, P+, Le(a-b+), Jk(a+b+), S-, Cw-
10.	Ž	O800	35	A+	ccEe, K-	Cw-, M+, N+, P+, Le(a-b-), Jk(a+b+, S-
11.	M	C911	62	0+	Ccee, K-	Cw-, Jk(a+b+)
12.	Ž	D649	77	0+	Ccee, K-	Cw-, Jk(a+b+)
13.	M	D693	32	B-	ccee, K-	Cw-, P-, Jk(a-b+), Le(a-b+), M+, N+, S-
14.	Ž	Z349	32	A+	CCee, K+	Cw-, Le(a+b-), Jk(a+b+)
15.	Ž	K920	72	0+	CcEe, K-	Cw-, M+, N+, P+, Le(a-b+), Jk(a+b+), S+
16.	M	C61	73	B-	ccee, K-	Cw-, P-, Jk(a+b+), Le(a-b+), M+, N-, S+
17.	Ž	O800	29	A+	Ccee, K-	Cw-, Jk(a+b+)
18.	M	U071	86	0+	CcEe, K-	Cw-, P+, Jk(a+b+), Le(a+b+), M-, N+, S+
19.	Ž	D590	30	A+	CCee, K-	Cw-, Jk(a+b+)

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Při standardním předtransfuzním vyšetření se u všech pacientů prokázaly pozitivní reakce se všemi diagnostickými i dárcovskými erytrocyty v NAT testu i enzymatickém papainovém testu. Pozitivity u všech pacientů byly prokázány také u autoprotilátek v NAT i enzymovém papainovém testu, tato přítomnost autoprotilátek poukazuje na diagnózu AIHA. Chladové protilátky byly u většiny negativní, pouze v jednom případě byla stanovena specifita chladové protilátky anti-C^w a u 5 pacientů nebyly chladové protilátky vyšetřeny (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: Výsledky pacientů s AIHA za rok 2021 (tepelné a chladové protilátky)

Pacient č.	Scr NAT	Scr PT	Panel NAT	Panel PT	Autoprotilátky v NAT	Autoprotilátky v PT	Chladové protilátky
1.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
2.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
3.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
4.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
5.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
6.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	nevyšetřeny
7.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	nevyšetřeny
8.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
9.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
10.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	nevyšetřeny
11.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
12.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	anti-Cw
13.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
14.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	nevyšetřeno
15.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
16.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
17.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
18.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	nevyšetřeno
19.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Přímý antiglobulinový test byl u všech pacientů pozitivní, ve většině případů byl silně pozitivní, pouze u tří pacientů se jednalo o slabou sílu reakce. Při stanovení typu senzibilizace erytrocytů byly prokázány nejvíce protilátky třídy IgG (v titrech více či méně závažných a jejich podtřídy IgG1 a IgG3 v různě závažných titrech), méně byly přítomny senzibilizující protilátky třídy IgM a častým nálezem je i přítomnost složek komplementu C3d (viz Tabulka 3).

Tabulka 3: Výsledky pacientů s AIHA za rok 2021 (PAT a senzibilizace erytrocytů)

Pacient č.	PAT	Upřesnění senzibilizace erytrocytů	Titr IgG	Titr IgG1	Titr IgG3
1.	poz +++++	IgG +++++	1:1000 +	1:100 +++	negativní
2.	poz +++++	IgG +++++	1:1000 +	1:100 ++	negativní
3.	poz +++++	IgG +++++, IgA +++	1:300 +	1:1 +++	negativní
4.	poz +++++	IgG +++	1:30 ++	-----	-----
5.	poz +++	IgG +++	1:30+	-----	-----
6.	poz +++	IgG +++	1:10 ++	-----	-----
7.	poz +++	IgG +++, C3d +/-	1:10 +	-----	-----
8.	poz +++++	IgG +++++, IgM +/-, C3d +	1:1000 +- +-	1:100 +	1:100 +++
9.	poz +++++	IgG +++++, C3d +/-	1:1000 +- +-	1:100 +	negativní
10.	poz +++++	IgG +++++, C3d +	1:30 ++	-----	-----
11.	poz +++++	IgG +++++, IgM ++, C3d ++	1:300 +- +-	1:1 ++	negativní
12.	poz +++++	IgG +++++, C3d ++	1:300 +- +-	1:1 +++	1:100 +- +-
13.	poz +++++	IgG +++++, C3d ++	1:300 +- +-	1:1 +++	1:100 +- +-
14.	poz +/-	-----	-----	-----	-----
15.	poz +++++	IgG +++++, IgA +/-	1:300 +	1:100 +/-	1:10 +++++
16.	poz +/-	-----	-----	-----	-----
17.	poz +++++	IgG +++++	1:300 +	1:1 +++	negativní
18.	poz +++++	-----	-----	-----	-----
19.	poz +	IgG +/-	-----	-----	-----

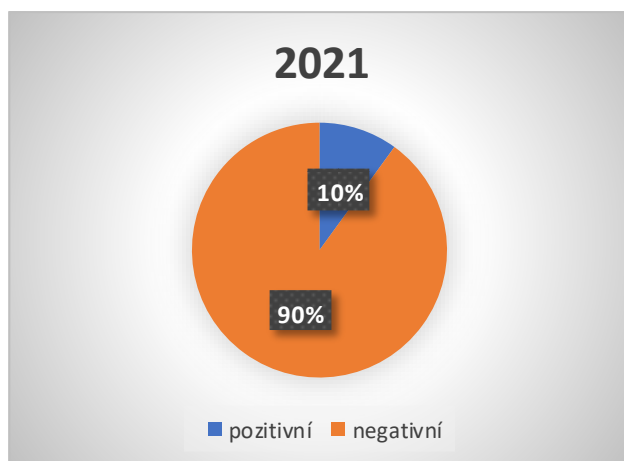
Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Po vysycení plazmy pomocí PEG a dárcovských (popř. vlastních) erytrocytů (viz. postup v kapitole 2.2.9) měla většina pacientů screening protilátek a zkoušky kompatibility v NAT i enzymovém papainovém testu negativní. Pouze u jednoho pacienta zůstává screening pozitivní a byly u něj po vysycení plazmy určeny skryté aloprotilátky anti-c a anti-E, které musely být dále zohledňovány u zkoušek kompatibility (viz Tabulka 4 a Obrázek 13).

Tabulka 4: Výsledky screeningu a identifikace protilátek po vysycení u pacientů s AIHA za rok 2021

Pacient č.	Výsledek vysycení
1.	neg
2.	neg
3.	neg
4.	aloprotilátky anti-c, anti-E
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
18.	neg
19.	neg

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování



Obrázek 13: Grafické znázornění výsledků screeningu po vysycení pacientů v roce 2021

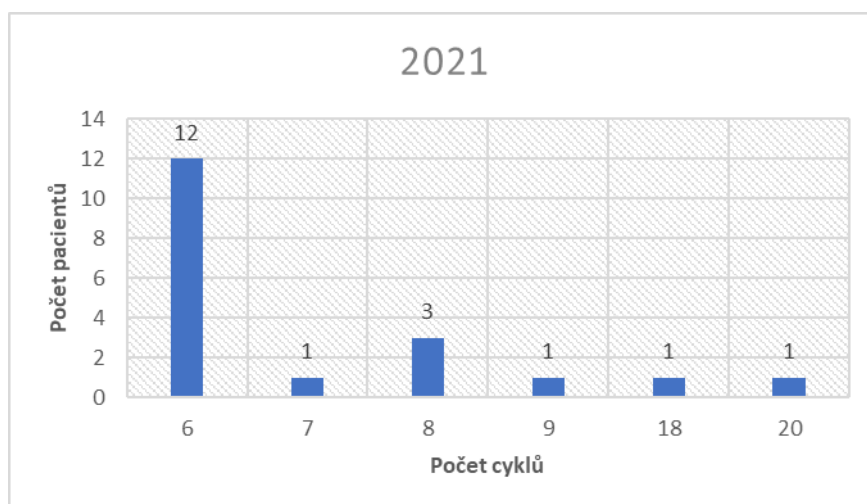
Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Ve 12 případech stačilo na úplné vysycení autoprotilátek z plazmy standardních 6 cyklů vysycení, u ostatních pacientů bylo zapotřebí cyklů více. Nejvyšší počet cyklů byl 20 (viz Tabulka 5 a Obrázek 14).

Tabulka 5: Počet cyklů nutných k vysycení u pacientů s AIHA za rok 2021

Pacient č.	Počet cyklů vysycení
1.	9x
2.	6x
3.	6x
4.	8x
5.	6x
6.	6x
7.	8x
8.	7x
9.	6x
10.	18x
11.	6x
12.	20x
13.	6x
14.	6x
15.	6x
16.	6x
17.	6x
18.	8x
19.	6x

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování



Obrázek 14: Grafické znázornění počtu cyklů u pacientů v roce 2021

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Pro všechny pacienty s AIHA byly vybrány erytrocytární transfúzní přípravky nejen dle jejich krevní skupiny v AB0 systému a Rh fenotypu, ale také byla zachována negativita v erytrocytárních antigenech K, C^w, Jk^a, Jk^b. Při prokázání aloprotilátky musely být zohledněny i jiné antigeny, aby mohly být přípravky pacientům podány jako kompatibilní. Po vysycení plazmy byly ve všech vzorcích odstraněny autoprotilátky (screening protilátek byl negativní) a popř. byly odhaleny skryté aloprotilátky.

V roce 2022 bylo na TO FN Plzeň provedeno vysycení plazmy u 20 pacientů, z toho se jednalo o jedenáct žen a devět mužů. Průměrný věk pacientů byl 65 let v rozmezí věku od 33 let do 94 let. Soubor tvořili pacienti krevních skupin nejčastěji 0+, A- a A+, méně byla zastoupena krevní skupina AB+ a B+ (viz Tabulka 6).

Tabulka 6: Vyšetření pacienti s AIHA za rok 2022 (základní informace)

Pacient č.	Pohlaví	Diagnóza	Věk	Krevní skupina	Fenotyp	Ostatní erytrocytární antigeny
1.	Ž	C838	72	A-	ccee, K-	P+, Cw-, M+, Le(a-b-), Jk(a+b+), Fy(a+b+), S+
2.	M	D599	94	0+	Ccee, K+	k+, M-, N+, Jk(a+b+), Fy(a+b+)
3.	M	I7020	59	0+	CcEe, K-	Cw-, M+, N+, P+, Le(a-b-), Jk(a+b+), S+
4.	M	S3240	36	B+	Ccee, K-	Cw-, M+, N+, P+, Le(a-b-), Jk(a+b+), S+
5.	Ž	D500	73	AB+	Ccee, K-	Jk(a+b+)
6.	Ž	D500	88	B+	Ccee, K-	Jk(a-b+)
7.	Ž	K920	33	A-	ccee, K-	Cw-, M-, N+, P+, Le(a-b+), Jk(a+b+), S-
8.	M	C341	79	A-	ccee, K-	Cw-, M+, N+, Le(a-b+), Jk(a+b-), S+
9.	Ž	S0600	68	0+	Ccee, K-	Cw-, M+, N+, P+, Le(a-b+), Jk(a+b-), S-
10.	M	D500	75	A-	ccee, K-	Cw-, Jk(a-b+)
11.	Ž	M160	71	A+	Ccee, K-	Cw-, Jk(a+b-)
12.	M	R53	80	A+	Ccee, K-	Cw-, Jk(a+b-)
13.	M	D649	44	A+	Ccee, K-	Cw-, Jk(a-b+)
14.	Ž	S0600	46	0+	Ccee, K-	Cw-, Jk(a-b+), S-, s+
15.	Ž	D649	76	B+	ccEe, K-	Jk(a-b+)
16.	Ž	C911	71	A-	ccee, K-	Jk(a+b-)
17.	Ž	D500	76	0+	CcEe, K-	Cw-, Jk(a+b+)
18.	Ž	D500	38	AB+	Ccee, K-	Jk(a+b+)
19.	M	M4686	49	0+	Ccee, K-	Cw+, Jk(a+b+), Fy(a+b+)
20.	M	D473	70	A+	ccee, K-	Cw-, Jk(a+b+), Fy(a+b+)

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Při standardním předtransfuzním vyšetření se u všech pacientů prokázaly pozitivní reakce se všemi diagnostickými i dárcovskými erytrocyty v NAT testu i enzymatickém papainovém testu. Pozitivity u všech pacientů byly prokázány také u autoprotilátek v NAT i enzymovém papainovém testu, tato přítomnost autoprotilátek poukazuje na diagnózu AIHA. Chladové protilátky byly u většiny pacientů negativní, ve třech

případech byly chladové protilátky pozitivní bez určení specifity a u dvou pacientů byla stanovena specifita protilátky anti-M spíše homozygotně a anti-S (viz Tabulka 7).

Tabulka 7: Vyšetření pacienti s AIHA za rok 2022 (tepelné a chladové protilátky)

Pacient č.	Scr v NAT	Scr v PT	Panel NAT	Panel PT	Autoprotilátky v NAT	Autoprotilátky v PT	Chladové protilátky
1.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	specif. protil. neprok.
2.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	anti-M spíše homozygotně
3.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
4.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
5.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
6.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
7.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
8.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
9.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
10.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
11.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
12.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
13.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
14.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	anti-S
15.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	specif. protil. neprok.
16.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	negativní
17.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	negativní
18.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	specif. protil. neprok.
19.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	negativní
20.	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg

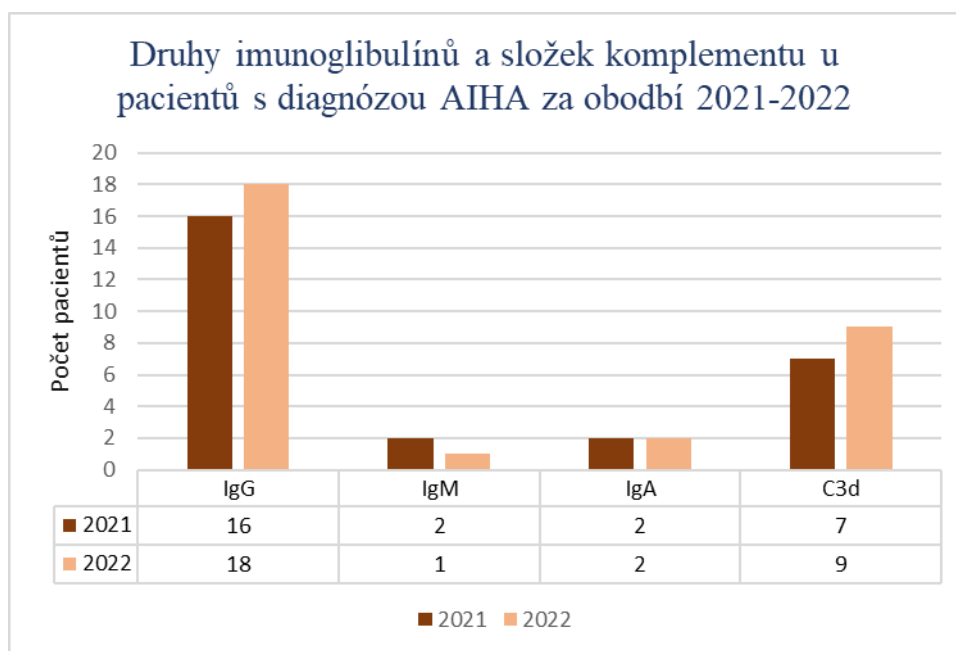
Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Přímý antiglobulinový test byl téměř u všech pacientů pozitivní, pouze v jednom případě byl PAT negativní. U pacientů s pozitivním PAT se při stanovení typu senzibilizace erytrocytů prokázaly nejvíce protilátky třídy IgG (v titrech více či méně závažných a jejich podtřídy IgG1 a IgG3 v různě závažných titrech), méně byly přítomny senzibilizující protilátky třídy IgM a častým nálezem je i přítomnost složek komplementu C3d (viz Tabulka 8).

Tabulka 8: Vyšetření pacienti s AIHA za rok 2022 (PAT a senzibilizace erytrocytů)

Pacient č.	PAT	Upřesnění senzibilizace erytrocytů	Titř IgG	Titř IgG1	Titř IgG3
1.	poz +++++	IgG +++, C3d ++	1:100 +	-----	-----
2.	poz +++++	nelze spolehlivě hodnotit (ctl pozitivní)	-----	-----	-----
3.	poz +++++	IgG +++++	1:100 +	-----	-----
4.	poz ++	IgG ++	1:10 +-	-----	-----
5.	poz +++++	IgG +++++, C3d +++++	1:1000 +- +-	1:1 +++++	1:100 +++++
6.	poz +++	IgG +++, C3d +++++	1:300+	1:100 +++	negativní
7.	poz +++++	IgG +++++	1:1000 +	1:100 +-	negativní
8.	poz +++++	IgG +++++, IgM +++, IgA +++, C3d +++	1:300 +	1:100 +++	1:100 ++
9.	poz +++++	IgG +++++	1:100 +	-----	-----
10.	poz +++++	IgG +++++, C3d +++	1:300 ++	1:100 +	1:1 +
11.	neg	-----	-----	-----	-----
12.	poz +++++	IgG +++++	1:300 ++	1:1 +++	negativní
13.	poz +++++	IgG +++++, IgA ++, C3d ++	1:100 +	1:100 ++	1:100 ++
14.	poz +++	IgG +++++, C3d ++	1:30 +-	-----	-----
15.	poz +++++	IgG +++++	1:100 ++	-----	-----
16.	poz +++++	IgG +++++, C3d +++	1:300 ++	1:10 +++++	negativní
17.	poz +++++	IgG +++++	1:300+-	1:1 +++++	1:10 +++++
18.	poz ++	IgG ++, C3d ++	-----	-----	-----
19.	poz ++	IgG ++	1:10 +	-----	-----
20.	poz +++++	IgG +++++	1:100 ++	-----	-----

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování



Obrázek 15: Pacienti s jednotlivými třídami protilátek a složkami komplementu v letech 2021 až 2022

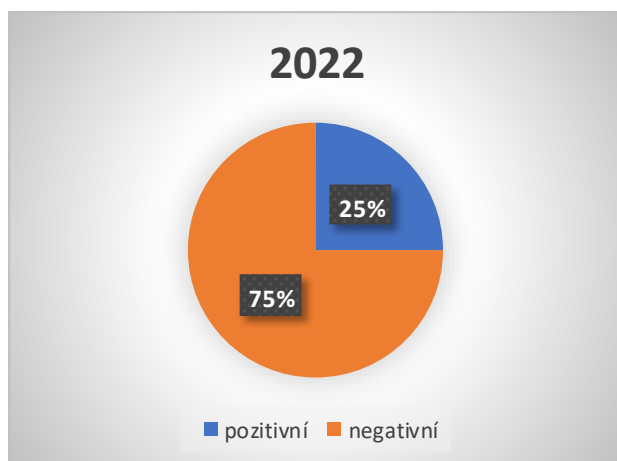
Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Po vysycení plazmy pomocí PEG a dárcovských (popř. vlastních) erytrocytů (viz. postup v kapitole 2.2.9) měla většina pacientů screening protilátek a zkoušky kompatibility v NAT i enzymovém papainovém testu negativní. U jednoho pacienta se po vysycení plazmy prokázaly aloprotilátky anti-C, anti-D, anti-Fy^a. Další pacient měl po vysycení aloprotilátku anti-M spíše homozygotně. V jednom případě nebyla specifita protilátky prokázána. Jednou zůstaly i po vysycení plazmy nespecifické reakce v enzymovém papainovém testu a u jednoho pacienta jsme po vysycení prokázali autoprottilátky anti-D, anti-C, anti-Jk^a (viz Tabulka 9 a Obrázek 16). Všechny stanovené protilátky po vysycení, plazmy byly dále zohledňovány u zkoušek kompatibility.

Tabulka 9: Výsledky screeningu a identifikace protilátek po vysycení u pacientů s AIHA za rok 2022

Pacient č.	Výsledek vysycení
1.	aloptotilátky anti-C, anti-D, anti-Fy(a)
2.	aloprtilátka anti-M spíše homozygotně
3.	neg
4.	neg
5.	neg
6.	neg
7.	neg
8.	neg
9.	neg
10.	neg
11.	specif. protil. neprok.
12.	neg
13.	nespecifita v PT
14.	negativní
15.	negativní
16.	negativní
17.	negativní
18.	negativní
19.	negativní
20.	autoprotilátky anti-D, anti- C, anti-Jk(a)

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování



Obrázek 16: Grafické znázornění výsledků screeningu po vysycení vysycených pacientů v roce 2022

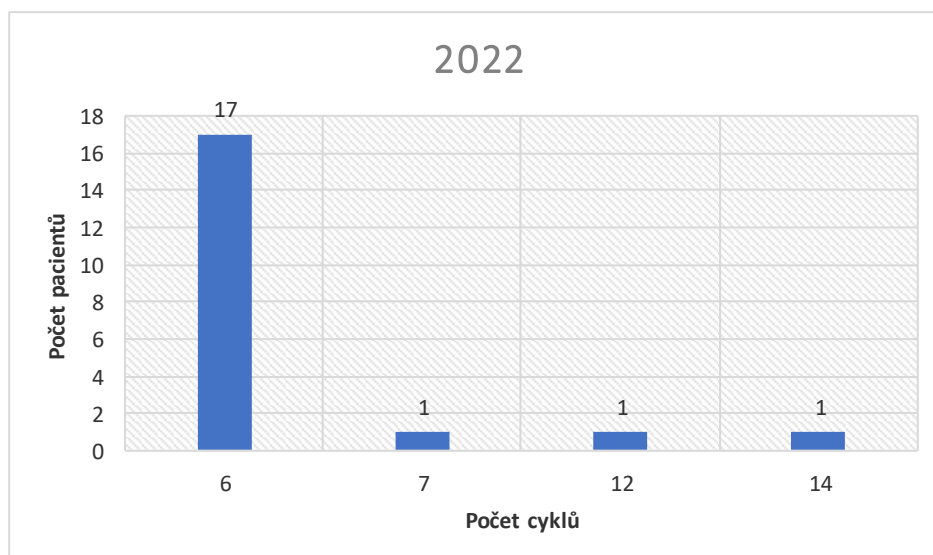
Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

V 17 případech stačilo na vysycení autoprotilátek z plazmy standardních 6 cyklů vysycení, u 3 pacientů bylo potřebných cyklů více. Nejvyšší počet cyklů bylo 14 (viz Tabulka 10 a Obrázek 17).

Tabulka 10: Počet cyklů nutných k vysycení u pacientů s AIHA za rok 2022

Pacient č.	Počet kol vysycení
1.	14x
2.	6x
3.	6x
4.	6x
5.	6x
6.	6x
7.	6x
8.	6x
9.	6x
10.	12x
11.	6x
12.	6x
13.	6x
14.	6x
15.	6x
16.	7x
17.	6x
18.	6x
19.	6x
20.	6x

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování



Obrázek 17: Grafické znázornění počtu cyklů u vysycených pacientů v roce 2022

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Pro tyto pacienty byly vybrány erytrocytární transfuzní přípravky nejen dle jejich krevní skupiny v AB0 systému a Rh fenotypu, ale také byla zachována negativita v erytrocytárních antigenech K, C^w, Jk^a, Jk^b. Při prokázání aloprotilátky musely být zohledněny i jiné antigeny, aby mohly být přípravky pacientům podány jako kompatibilní. Po vysycení plazmy byly ve všech vzorcích odstraněny autoprotiilátky (screening protilátek byl negativní) a popř. odhaleny skryté aloprotilátky, u jednoho pacienta jsme prokázali i specifické autoprotiilátky.

3.2 Vyšetření pacienti s diagnózou MM u nichž bylo provedeno ošetření erytrocytů pomocí DTT

Za rok 2021 bylo na TO FN Plzeň provedeno ošetření erytrocytů pomocí DTT u pěti pacientů, z toho se jednalo o jednu ženu a čtyři muže. Průměrný věk pacientů byl 63 let v rozmezí věku od 47 let do 76let. Pacienti byly pouze dvou krevních skupin, a to krevní skupiny A- a 0+ (viz Tabulka 11).

Tabulka 11: Vyšetření pacienti s MM za rok 2021 (základní informace)

Pacient č.	Pohlaví	Diagnóza	Věk	Krevní skupina	Fenotyp	Ostatní erytrocytární Ag
1.	Ž	C900	66	A-	Ccee, K-	Cw-, M+, N-, P+, Le(a-b+), Jk(a+b+), S+
2.	M	C099	76	0+	Ccee, K-	Cw-, M+, N+, P+, Le(a-b-, Lu(a-b+), Jk(a-b+), Fy(a-b+), S+, s+
3.	M	C900	47	0+	Ccee, K-	cw-, Jk(a-b+), Fy(a+b+)
4.	M	C900	63	A-	ccee, K+	k+, Cw-, M+, N-, P+, Le(a-b-), Jk(a+b+), S+, s+
5.	M	C900	63	A-	ccee, K-	Cw-, Jka(a-b+)

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Při standardním předtransfuzním vyšetření se u všech pacientů prokázaly pozitivní reakce se všemi diagnostickými i dárcovskými erytrocyty v NAT testu a potvrdila se tím vazba monoklonální protilátky anti-CD 38 na erytrocyty při léčbě MM pomocí léku Daratumumabu (Darzalexu). U čtyř vyšetřených pacientů byly pozitivní reakce i v enzymovém papainovém testu, ale pouze u jednoho z nich byla stanovena specifita (suspektní protilátka anti-C^w). Jeden z vyšetřených pacientů měl enzymatický papainový test zcela negativní. Přímý antiglobulinový test byl ve třech případech negativní a dvakrát byla pozorována pozitivita. Autoprotilátky v NAT testu byly u tří pacientů negativní a u dvou slabě pozitivní, v enzymatickém papainovém testu nevykazoval ani jeden pacient pozitivní autoprotilátky (viz Tabulka 12).

Tabulka 12: Vyšetření pacienti s MM za rok 2021 (tepelné a chladové protilátky, PAT)

Pacient č.	Scr NAT	Scr PT	Panel NAT	Panel PT	PAT	Autoprotilátky v NAT	Autoprotilátky v PT
1.	poz	poz	poz	susp. anti-Cw	neg	neg	neg
2.	poz	poz	poz	poz	neg	neg	neg
3.	poz	neg	poz	neg	poz ++	slabě poz	neg
4.	poz	poz	poz	poz	neg	neg	neg
5.	poz	poz	poz	poz	poz ++	poz ++	neg

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Po ošetření erytrocytů pomocí DTT (viz. postup v kapitole 2.2.10) měli všichni pacienti negativní screening protilátek v NAT testu i zkoušky kompatibility. U jednoho pacienta zkouška kompatibility nebyla provedena, protože oddělení nevyžadovalo pro pacienta transfuzi. Erytrocytární transfuzní přípravky byly pro dané pacienty vybrány dle jejich krevní skupiny v AB0 systému, Rh fenotypu a byla také zachována negativita v erytrocytárních antigenech K, C^w, Jk(a), Jk(b), tyto přípravky pak mohly být pacientům podány jako kompatibilní. Falešně pozitivní reakce v předtransfuzním vyšetření byly způsobeny léčebnými přípravky Daratumumabem (Darzelexem) a následně se působením DTT odstranily. Žádné skryté protilátky v NAT testu nebyly prokázány (viz Tabulka 13).

Tabulka 13: Výsledky po ošetření erytrocytů pomocí DTT u pacientů s MM za rok 2021

Pacient č.	Ošetření screeningových erytrocytů v NAT	Ošetření krevní konzervy v NAT
1.	negativní	2x zkouška kompatibility negativní
2.	negativní	3x zkouška kompatibility negativní
3.	negativní	2x zkouška kompatibility negativní
4.	negativní	bez zkoušky kompatibility
5.	negativní	2x zkouška kompatibility negativní

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Za rok 2022 bylo na TO FN Plzeň provedeno ošetření erytrocytů pomocí DTT u pěti pacientů, z toho se jednalo o dvě ženy a tři muže. Průměrný věk pacientů byl 65 let v rozmezí věku od 52 let do 73 let. Nejčastěji se objevili pacienti krevní skupiny A+, a to třikrát, jednou krevní skupina 0+ a jednou B+ (viz Tabulka 14).

Tabulka 14: Vyšetření pacienti s MM za rok 2022 (základní informace)

Pacient č.	Pohlaví	Diagnóza	Věk	Krevní skupina	Fenotyp	Ostatní erytrocytární Ag
6.	Ž	C900	73	A+	CCEe, K-	Cw-, Jk(a+b-)
7.	Ž	C900	58	0+	Ccee, K-	neotypováno
8.	M	C900	52	A+	CcEe, K+	k+, Cw-, M+, N+, P-, Le(a-b+), Jk(a+b+), Lu(a-b+), Fy(a+b+), S+, s+
9.	M	C900	72	A+	Ccee, K+	k+, Jk(a+b-), Fy(a-b+)
10.	M	C900	72	B+	Ccee, K-	neotypováno

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Při standardním předtransfuzním vyšetření se u všech pacientů prokázaly pozitivní reakce se všemi diagnostickými i dárcovskými erytrocyty v NAT testu a potvrdila se tím vazba monoklonální protilátky anti-CD 38 na erytrocyty při léčbě MM pomocí léku Daratumumabu (popř. Darzalexu). U dvou vyšetřených pacientů byly pozitivní reakce i v enzymovém papainovém testu, ale bez určení specifity. Zbylí tři pacienti měli enzymatický papainový test zcela negativní. Přímý antiglobulinový test byl ve všech případech negativní. U jednoho pacienta byla zjištěna pozitivita autoprotilátek v NAT testu, v enzymatickém papainovém testu byly autoprotilátky ve všech vzorcích negativní (viz Tabulka 15).

Tabulka 15: Vyšetření pacienti s MM za rok 2022 (tepelné a chladové protilátky, PAT)

Pacient č.	Scr v NAT	Scr v PT	Panel NAT	Panel PT	PAT	Autoprotilátky NAT	Autoprotilátky PT
6.	poz	neg	poz	neg	neg	neg	neg
7.	poz	neg	poz	neg	neg	neg	neg
8.	poz	neg	poz	neg	neg	neg	neg
9.	poz	poz	poz	poz	neg	poz ++	neg
10.	poz	poz	poz	poz	neg	neg	neg

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

Po ošetření erytrocytů pomocí DTT (viz. postup v kapitole 2.2.10) měli všichni pacienti negativní screening protilátek v NAT testu i zkoušky kompatibility. Erytrocytární transfuzní přípravky byly pro dané pacienty vybrány dle jejich krevní skupiny v AB0 systému, Rh fenotypu a byla také zachována negativita v erytrocytárních antigenech K, C^w, Jk^a, Jk^b, tyto přípravky pak mohly být pacientům podány jako kompatibilní. Falešně pozitivní reakce v předtransfuzním vyšetření byly způsobeny léčebnými přípravky Daratumumabem (Darzelexem) a následně se působením DTT odstranily. Žádné skryté protilátky v NAT testu nebyly prokázány (viz Tabulka 16).

Tabulka 16: Výsledky po ošetření erytrocytů pomocí DTT u pacientů s MM za rok 2022

Pacient č.	Ošetření scr v NAT	Ošetření krevní konzervy
6.	negativní	2x zkoušky kompatibility negativní
7.	negativní	2x zkoušky kompatibility negativní
8.	negativní	4x zkoušky kompatibility negativní
9.	negativní	6x zkoušky kompatibility negativní
10.	negativní	2x zkoušky kompatibility negativní

Zdroj: Data z laboratorního informačního systému, TO FN Plzeň, vlastní zpracování

4 Diskuze

Na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Plzeň byly v roce 2021 a 2022 vyšetřeny dva téměř stejně velké soubory pacientů (19 a 20 pacientů) s prvním záchytem AIHA, u kterých bylo nutné provést vysycení plazmy. Pacienti s MM po léčbě monoklonálními protilátkami tvořili v roce 2021 a 2022 rovněž dva stejně velké soubory o pěti pacientech. Všichni tito pacienti byly vyšetřeni za účelem podání transfuze, která byla indikována z jednotlivých klinických oddělení. Vzhledem k tomu, že lékaři z klinického oddělení uvádějí na žádanku o transfuzní přípravky informaci o léčbě monoklonálními protilátkami anti-CD38, lze u těchto pacientů očekávat falešně pozitivní reakce v antiglobulinových testech se všemi diagnostickými i dárcovskými erytrocyty. Naopak u pacientů s prvozáchytem AIHA se jedná často o neočekávané reakce v průběhu standardního předtransfuzního vyšetření a kompatibilní erytrocytární přípravky lze vybrat až po časově náročném imunohematologickém vyšetření. V urgentních případech je nutné vybrat co nejméně rizikový transfuzní přípravek i při laboratorní inkompatibilitě, to znamená dle krevní skupiny v AB0 systému, Rh fenotypu a s ohledem na erytrocytární antigeny Kell, C^w, Kidd.

Pomocí této bakalářské práce jsem chtěla upozornit na nutné rozdílné přístupy v provádění předtransfuzních laboratorních vyšetření u těchto dvou klinických jednotek, kdy pacienti s AIHA či MM vykazují nežádané reaktivity v NAT testech a je potřeba provést speciální vyšetření pro odstranění těchto pozitivit. Je však zapotřebí zmínit, že pozitivní reakce u pacientů s AIHA způsobují autoprotilátky (protilátky namířené proti vlastním erytrocytárním antigenům). Naopak u pacientů s MM se jedná o falešně pozitivní reakce způsobené protilátkami anti-CD 38, které jsou přítomny v plazmě pacienta po léčbě monoklonálními protilátkami a váží se na všechny erytrocyty, které antigeny CD 38 exprimují.

U pacientů s AIHA byly po vysycení plazmy pomocí PEG a dárcovských nebo vlastních erytrocytů odstraněny autoprotilátky a popř. odhaleny skryté aloprotilátky. Tyto výsledky odpovídají na první výzkumnou otázku, která byla směřována na procento pacientů, u kterých se po vysycení plazmy zjistí skrytá aloprotilátka. V roce 2021 se u vyšetřených pacientů na TO FN Plzeň odhalily aloprotilátky po vysycení plazmy pouze u 10 % pacientů. Ze souboru vyšetřených pacientů se jednalo pouze o jeden vzorek, u kterého byly identifikovány aloprotilátky anti-c a anti-E. V roce 2022 bylo procento pozitivních výsledků po vysycení plazmy na TO FN Plzeň o něco málo

vyšší, představovalo 25 % z celkového počtu vysycených vzorků. U dvou pacientů byla určena specifita aloprouláték, v jednom případě kombinace prouláték anti-C, anti-D, anti-Fy^a, v druhém aloproulátka anti-M spíše homozygotní formy. V jednom vzorku nebyla specifita v NAT testu určena, zjištěny byly ojedinělé reakce bez specifity a jednou byla stanovena nespecifita v enzymovém papainovém testu. V poslední řadě byly u jednoho pacienta po vysycení plazmy identifikovány dokonce i specifické autoproulátky anti-D, anti-C, anti-Jk^a.

Druhá výzkumná otázka se zabývala počtem cyklů potřebných ke kompletnímu vysycení plazmy pacienta. V roce 2021 byly autoproulátky vysyceny z plazmy po šesti cyklech u 12 pacientů, u ostatních 8 vzorků bylo potřeba pokračovat ve vysycení v několika dalších cyklech, nejvyšší počet cyklů byl dvacet. V roce 2022 byly autoproulátky vysyceny z plazmy po šesti cyklech dokonce u 17 pacientů a u zbylých 3 pacientů byl počet cyklů potřebných k odstranění autoprouláték vyšší, nejvyšší počet cyklů byl čtrnáct. Pomocí této výzkumné otázky je poukázáno na velkou časovou náročnost přípravy kompatibilního erytrocytárního transfuzního přípravku. Samotné vysycení plazmy při standardních šesti cyklech trvá 4-5 hodin, při vyšším počtu cyklů je pak časová náročnost mnohonásobně vyšší a erytrocytární transfuzní přípravek může být pro pacienta připraven až druhý den. U pacientů, kteří měli senzibilizované erytrocyty složkou komplementu, se nám osvědčilo střídat prostředí u jednotlivých cyklů vysycení, tj. v teple při 37 °C a v chladu při 4 °C. Erytrocytární transfuzní přípravky byly vždy pro pacienty s vysycenou plazmou vybírány dle krevní skupiny v AB0 systému, Rh fenotypu a musela být zachována negativita minimálně v antigenech Rh, Kell, Cw, Jk^a, Jk^b. Vždy musely být individuálně zohledněny zjištěné aloproulátky (popř. autoproulátky) u jednotlivých pacientů. Zkoušky kompatibility z vysycené plazmy je možné provádět do 7 dnů od odběru vzorku a expedice transfuzních přípravků může být taktéž do 7 dnů od odběru vzorku.

Pacienti s MM, u kterých bylo provedeno ošetření erytrocytů pomocí DTT v roce 2021 i 2022 nevykazovali po odstranění panreakivity žádné proulátky. V každém roce bylo vyšetřeno na TO FN Plzeň pouze 5 pacientů, kteří byli léčeni monoklonálními proulátkami (Daratumumab-Darzalex). Informace o zahájení léčby by měla být zapsána od lékaře z klinického oddělení na žádance, která na TO spolu se vzorkem přichází. V ideálním případě by si měl lékař před zahájením této léčby vyžádat vyšetření antierytrocytárních prouláték a také by se měly otypovat pacientovy erytrocytární antigeny. U některých pacientů tato vyšetření před zahájením léčby nebyla provedena

nebo dokonce chyběla informace o zahájení léčby přesto, že jsou lékaři s těmito informacemi seznámeni. Erytrocytární transfuzní přípravky byly vždy pro tyto pacienty vybírány dle krevní skupiny v AB0 systému a musela být zachována negativita minimálně v antigenech Rh, C^w, Jk^a, Jk^b. V tomto případě musí být vždy podávány Kell negativní dárcovské erytrocyty, protože DTT denaturuje antigen Kell a případné protilátky anti-Kell by nebyly odhaleny. Důležité je také se zmínit o provedení zkoušky kompatibility, ta musí být provedena ihned po ošetření erytrocytů. Ošetřené erytrocyty pomocí DTT rychle hemolyzují a není možné zkoušky kompatibility odkládat nebo znovu opakovat. Vždy musíme erytrocyty ošetřit pomocí DTT znovu a až poté zkoušku kompatibility zopakovat, to samé platí i pro screening protilátek po ošetření erytrocytů. Soubor pacientů s MM je příliš malý, proto jsem z něho žádné grafické vyhodnocení nevytvořila. Tato metoda je v naší laboratoři prováděna teprve třetím rokem a nebylo tak možné vybrat více pacientů a lépe metodu vyhodnotit. Jak už jsem uvedla, důležité pro mě bylo porovnat tuhle metodu s metodu vysycení.

Na základě dat, která byla získána a vyhodnocena v této práci, lze upozornit na důležitost těchto předtransfuzních vyšetření. Při neodhalení některých skrytých aloprotilátek (popř. autoprotilátek) by mohlo dojít k další imunizaci pacienta daným antigenem, proti němuž má již vytvořené protilátky a to by mohlo vést u klinicky významných protilátek i k závažné hemolytické potransfuzní reakci.

5 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem popsala všechna předtransfuzní laboratorní vyšetření, která jsou zapotřebí u pacientů s diagnózou AIHA a MM vykonat, aby mohl být zajištěn kompatibilní erytrocytární transfuzní přípravek. Při zpracování vzorků byly při vyšetření nalezeny i některé klinicky závažné protilátky, proto považuji daná vyšetření za velmi důležitá pro podání bezpečné transfuze erytrocytárních transfuzních přípravků u takto problematických pacientů. Při požadavku na transfuzi erytrocytů u těchto pacientů je nutné předem informovat lékaře klinického oddělení na časovou náročnost přípravy kompatibilního transfuzního přípravku. Musí se tak zajistit včasný odběr vzorku pro daná vyšetření s předpokladem delší přípravy kompatibilních dárcovských erytrocytů. Ve výjimečných případech, kdy pacientovi je ze závažných důvodů indikována transfuze z vitální indikace, propouštíme po domluvě s lékařem TO nejméně laboratorně pozitivní transfuzní přípravky, u kterých je zachována negativita v některých důležitých antigenních systémech a dodatečně pak provádíme vysycení plazmy u pacientů s AIHA nebo ošetření erytrocytů pomocí DTT u pacientů s MM.

6 Seznam použité literatury

1. ADAM, Z., KREJČÍ, M. a VORLÍČEK, J., 2008. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2502-4.
2. BARTŮŇKOVÁ, J. a PAULÍK, M., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3533-7.
3. BASAVARAJEGOWDA, A a SHASTRY, S., 2022. *Pretransfusion Testing*. [online]. StatPearls. [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585033/>
4. DANIELS, G. a BROMILOW, I., 2014. *Essential guide to blood groups*. Third edition. Chichester, West Sussex, UK: Wiley Blackwell. ISBN 9781118688922.
5. DANIELS, G., 2013. *Human blood groups*. 3rd ed. Chichester: Wiley-Blackwell,. ISBN 9781444333244.
6. *Daratumumab-Zdravotnický pracovník-Edukační materiály*, 2022. [online]. SÚKL. [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/leciva/em-daratumumab>
7. DEAN, L., 2005. *Blood Groups and Red Cell Antigens* [online]. [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2264/>
8. FÁBRYOVÁ, V., 2012. *Imunohematologie a transfúzní medicína pro praxi*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4391-2.
9. HOŘEJŠÍ, V., 2013. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-713-2.
10. CHIU, M., DENNIS, L., GOULET, R., TEPLYAKOV, A. a GILLILAND, G., L., 2019. *Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics*. *Antibodies* [online]. 8(4) [cit. 2023-03-27]. ISSN 2073-4468. Dostupné z: doi:10.3390/antib8040055
11. CHOTTOVÁ-DVOŘÁKOVÁ M. a MISTROVÁ, E., 2018. *Fyziologie krve a základy imunity*. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-3833-1.
12. INDRÁK, K., 2014. ed. *Hematologie a transfúzní lékařství*. V Praze: Triton. Lékařské repetitorium. ISBN 978-80-7387-722-4.
13. JÍLEK, P., 2014. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4822-1.

14. KUBISZ, P. a DOBROTOVÁ, M., 2006. *Hematológia a transfuziológia: učebnica*. Praha: Grada. ISBN 80-247-1779-4.
15. MASOPUST, J. a PÍSAČKA, M., 2022. *Praktická imunohematologie - erytrocyty*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-3377-2.
16. MASOPUST, J., BOHONĚK, M., GALUSZKOVÁ, D., GAŠOVÁ, Z., PÍSAČKA, M., PROCHÁZKOVÁ, R., ŘEHÁČEK, P., TUREK, P., 2022. *Předtransfuzní laboratorní vyšetření* [online]. Doporučení společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_08. verze 4 (2022_05_01) [cit. 2023-02-11]. Dostupné z: http://www.transfuznispolecnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator_kategorie=DOPORUCENE_POSTUPY
17. MASOPUST, J., PÍSAČKA, M., TUREK, P., 2019. *Základní imunohematologické laboratorní vyšetření červené řady – obecné základy a technické postupy* [online]. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL_07, VERZE 4 (2019_09) [cit. 2023-01-13] Dostupné z: http://www.transfuznispolecnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator_kategorie=DOPORUCENE_POSTUPY
18. MICHALAK, S., S., OLEWICZ-GAWLIK, A., RUPA-MATYSEK, J., WOLNY-ROKICKA, E., NOWAKOWSKA, E. a GIL, L. 2020. *Autoimmune hemolytic anemia: current knowledge and perspectives*. *Immunity & Ageing* [online]. 17(1) [cit. 2023-03-27]. ISSN 1742-4933. Dostupné z: doi:10.1186/s12979-020-00208-7
19. MURPHY, M. F., ROBERTS, D. J., YAZER, M., H. a DUNBAR, N., M., 2022. *Practical transfusion medicine*. Sixth edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. ISBN 9781119665816.
20. NAVRÁTIL, L., 2008. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2319-8.
21. PANCZAK, A., OTOVÁ, B., 2013. *Lékařská biologie a genetika (III. díl)*. Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-2415-0.
22. PENKA, M. a BULIKOVÁ, A., 2009. *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2299-3.
23. PENKA, M. a TESAŘOVÁ, E., 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0.
24. PENKA, M. a TESAŘOVÁ, E., 2012. *Hematologie a transfuzní lékařství II*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3460-6

25. PÍSAČKA, M., KOŘÍNKOVÁ, P., MATĚJKOVÁ, E., BOLCKOVÁ, H., T., 2012. *Imunohematologie - historie, současný stav poznání a role ÚHKT*. [online] *Vnitřní lékařství. 60 let Ústavu hematologie a krevní transfuze Praha*. [cit. 2022-01-24]. ISSN 0042-773X. Dostupné z:
<https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2012/89/14.pdf>
26. ŘEHÁČEK, V. a MASOPUST, J., 2013. *Transfuzní lékařství*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4534-3.
27. SAKALOVÁ, A. a LIPŠIC, T., 1995. *Hematológia a transfuziológia: teória a cvičenia*. Martin: Osveta. ISBN 80-217-0444-6.
28. SANDLER, S. G., LANDEBERG, A., RUMSEY, D. H. a NOVAK, S. C., 2000. *A solid phase and microtiter plate hemagglutination method for pretransfusion compatibility testing*. *Haematologia* [online]. 30(3), 149-157 [cit. 2023-04-08]. ISSN 0017-6559. DOI: 10.1163/156855900300109143. Dostupné z:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11128107/>
29. SOMPAYRAC, L., 2012. *How the Immune system works*. 4. vydání. Wiley-BlackWell. ISBN-10: 0470657294
30. Standardní operační postupy Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice Plzeň

7 Seznam obrázků

Obrázek 1: Molekula imunoglobulinu

Obrázek 2: Schéma krevních skupin

Obrázek 3: Diagnostické erytrocyty ID-DiaCell a ID-DiaCell P od firmy Bio-Rad

Obrázek 4: Imunohematologický analyzátor IH-500 od firmy Bio-Rad

Obrázek 5: Diagnostické panelové erytrocyty ID-DiaPanel a ID-DiaPanel P od firmy Bio-Rad

Obrázek 6: Schéma ošetření erytrocytů pomocí DTT

Obrázek 7: Identifikační tabulka antigenů od firmy Bio-Rad

Obrázek 8: ID-karta LISS/Coombs AGH s pozitivním PAT a ID-kartu DC-Screening I s pozitivní třídou protilátek IgG (ID-karty od firmy Bio-Rad)

Obrázek 9: ID-karta DAT IgG-Dilution od firmy Bio-Rad s titrem IgG 1:300+

Obrázek 10: ID-karty DAT IgG1/IgG3 od firmy Bio-Rad s titrem IgG1 1:100 +- a IgG3 1:100 +

Obrázek 11: Pozitivní reakce se všemi diagnostickými erytrocyty u pacienta s AIHA (screening + panel v NAT i papainovém testu)

Obrázek 12: Výsledek screeningu erytrocytů v NAT i papainovém testu negativní po vysycení plazmy pacienta

Obrázek 13: Grafické znázornění výsledků screeningu po vysycení u pacientů v roce 2021

Obrázek 14: Grafické znázornění screeningu po vysycení u pacientů v roce 2021

Obrázek 15: Počet pacientů s jednotlivými třídami protilátek a složkami komplementu v letech 2021 až 2022

Obrázek 16: Grafické znázornění výsledků vysycených pacientů v roce 2022

Obrázek 17: Grafické znázornění počtu cyklů u vysycených pacientů v roce 2022

8 Seznam tabulek

Tabulka 1: Vyšetření pacienti s AIHA za rok 2021 (základní informace)

Tabulka 2: Výsledky pacientů s AIHA za rok 2021 (tepelné a chladové protilátky)

Tabulka 3: Výsledky pacientů s AIHA za rok 2021 (PAT a senzibilizace erytrocytů)

Tabulka 4: Výsledky screeningu a identifikace protilátek po vysycení u pacientů s AIHA za rok 2021

Tabulka 5: Počet cyklů nutných k vysycení u pacientů s AIHA za rok 2021

Tabulka 6: Vyšetření pacienti s AIHA za rok 2022 (základní informace)

Tabulka 7: Vyšetření pacienti s AIHA za rok 2022 (tepelné a chladové protilátky)

Tabulka 8: Vyšetření pacienti s AIHA za rok 2022 (PAT a senzibilizace erytrocytů)

Tabulka 9: Výsledky screeningu a identifikace protilátek po vysycení u pacientů s AIHA za rok 2022

Tabulka 10: Počet cyklů nutných k vysycení u pacientů s AIHA za rok 2022

Tabulka 11: Vyšetření pacienti s MM za rok 2021 (základní informace)

Tabulka 12: Vyšetření pacienti s MM za rok 2021 (tepelné a chladové protilátky, PAT)

Tabulka 13: Výsledky po ošetření erytrocytů pomocí DTT u pacientů s MM za rok 2021

Tabulka 14: Vyšetření pacienti s MM za rok 2022 (základní informace)

Tabulka 15: Vyšetření pacienti s MM za rok 2022 (tepelné a chladové protilátky, PAT)

Tabulka 16: Výsledky po ošetření erytrocytů pomocí DTT u pacientů s MM za rok 2022

9 Seznam použitých zkratk

AIHA	autoimunitní hemolytická anémie
MM	mnohočetný myelom
DTT	dithiotreitol
NAT	nepřímý antiglobulinový test
PAT	přímý antiglobulinový test
CD 38	označení povrchových molekul buněk (38)
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
IgA	imunoglobulin třídy A
IgD	imunoglobulin třídy D
IgE	imunoglobulin třídy E
IgG	imunoglobulin třídy G
IgM	imunoglobulin třídy M
pH	záporný dekadický logaritmus látkové koncentrace vodíkových iontů
HON	hemolytické onemocnění novorozence
SOP	standardní operační postup
AGH	anti-human globulinum serum
PEG	polyethylenglyko
WAIHA	AIHA s tepelnými protilátkami
CAS	choroba chladových aglutininů
PNH	paroxysmální chladová hemoglobinurie
DIHA	léky indukované hemolytické stavy
ELFO	elektroforéza
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace
LD	laktátdehydrogenáza
LIS	laboratorní informační systém
FN	Fakultní nemocnice
TO	Transfuzní oddělení