

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

**Předtransfuzní vyšetření, klinicky významné protilátky proti
antigenům erytrocytů a vyhledávání kompatibilních erytrocytů u
pacientů s aloimunizací**

bakalářská práce

Autor práce:	Jana Ebrová, DiS.
Studijní program:	Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor:	Zdravotní laborant
Vedoucí práce:	MUDr. Helena Kubánková
Datum odevzdání práce:	2. 5. 2012

Abstrakt

Předtransfuzní vyšetření, klinicky významné protilátky proti antigenům erytrocytů a vyhledávání kompatibilních erytrocytů u pacientů s aloimunizací

Tématem práce jsou postupy předtransfuzního vyšetření se zaměřením na transfuze erytrocytů, klinicky významné protilátky a postupy vyhledávání kompatibilních erytrocytů u pacientů s aloimunizací.

Cílem práce je shrnout současné vědomosti o problematice aloimunizace v moderním transfuzním lékařství, vypracovat přehled klinicky významných protilátek a zjistit frekvenci výskytu aloprotilátek u krevních vzorků pro předtransfuzní vyšetření pacientů Nemocnice České Budějovice, a.s.

Práce informuje o postupu provedení předtransfuzního vyšetření, jeho náležitostech a doporučeních pro laboratorní praxi. Dále se práce věnuje imunohematologickým laboratorním metodám, které se využívají u předtransfuzního vyšetření. Následuje přehled skupinových systémů s jejich stručným popisem a výčtem klinicky významných nepravidelných protilátek. Přehled současného stavu problematiky je ukončen vysvětlením pojmu aloimunizace, uvedením příčin jejího vzniku, jejích následků a souhrnem doporučení pro výběr fenotypově vhodných erytrocytárních transfuzních přípravků pro aloimunizované pacienty.

U vzorků od pacientů před transfuzí přípravků obsahujících erytrocyty bylo provedeno předtransfuzní vyšetření, tzn. vyšetření krevní skupiny v AB0/RhD, screening nepravidelných protilátek proti antigenům erytrocytů a zkouška kompatibility. Při pozitivním screeningu protilátek byla provedena jejich identifikace a případně doplňující vyšetření erytrocytárních antigenů. Pro provedení těchto testů byla využita metoda sloupcové (gelové) aglutinace a metody ve zkumavce.

7 % vzorků bylo pozitivní na přítomnost nepravidelných protilátek. Z nich více než 50 % pocházelo od žen. Aloprotilátky byly nalezeny u 57,6 % pozitivních vzorků. Celkem bylo identifikováno 52 aloprotilátek: anti-E (23,08 %) > anti-D, -C^W (13,46 %) > anti-c, -K, -Kp^a (9,62 %) > anti-C, -Wr^a, -Jk^a, -S, -e, -Fy^b, -P1 (1,92 %). Nejvíce

nalezených aloprotilátek pocházelo ze systému Rh (68 %) a Kell (19 %). Vzájemné kombinace byly nejčastěji nalezeny mezi aloprotilátkami Rh a/nebo Kell systému.

Na základě zjištěných výsledků lze pro polytransfundované pacienty a ženy ve fertilním věku doporučit tento ideální algoritmus výběru transfuzních přípravků obsahujících erytrocyty: v rámci předtransfuzního vyšetření vyšetřit antigeny Rh systému a systému Kell a příjemcům podávat transfuzní přípravky s maximální shodou erytrocytárních antigenů ve výše uvedených systémech.

Abstract

Pretransfusion testing, important red cells antibodies and transfusion in alloimmunised recipients

The topic of this thesis is to analyse the pretransfusion testing focusing on red cells transfusion, important red cell antibodies and transfusion in alloimmunised patients.

This thesis is supposed to sum up the present knowledge of alloimmunisation in modern transfusion medicine, to provide a list of clinically significant antibodies and to determine the aloantibodies incidence in blood samples in pretransfusion testing in hospital Nemocnice České Budějovice, a.s.

The thesis informs about the pretransfusion testing procedure, its requirements and recommendation for laboratory praxis. Furthermore, it describes immunohematologic laboratory methods that use pretransfusion examination. Then, it lists group systems with short description and clinically important irregular antibodies. The summary of actual state of the topic is concluded with the explanation of the term alloimmunisation, causes of its emergence and recommendations for phenotypically suitable RBC transfusion preparations choice for alloimmunised patients.

In the patient samples before transfusion of preparations containing RBC, we did the pretransfusion testing, i.e. blood type examination in AB0/RhD, screening of irregular antibodies against RBC antigens and compatibility test. If the antibody screening was positive, we identified them and eventually processed them through some additional RBC antigens test. After those tests, we used column (gel) agglutination and tube methods.

In 7 % of the samples, the irregular antibodies were positive. More than 50 % of them came from women. Aloantibodies were found in 57,6 % of positive samples. Altogether, we identified 52 antibodies types: anti-E (23,08 %) > anti-D, -C^W (13,46 %) > anti-c, -K, -Kp^a (9,62 %) > anti-C, -Wr^a, -Jk^a, -S, -e, -Fy^b, -P1 (1,92 %). The majority of identified aloantibodies came from the Rh (68 %) and Kell (19 %) system. Combinations were found in aloantibodies of Rh and/or Kell system.

According to the results, polytransfused patients and fertile women can be recommended to use this ideal algorithm in the choice of transfusion preparations containing RBC: to test Rh and Kell system antibodies in the pretransfusion testing and to provide the recipients with transfusion preparations of maximal compliance of RBC antigens in above mentioned systems.

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích dne: 2. 5. 2012

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Děkuji MUDr. Heleně Kubánkové za odborné vedení bakalářské práce a za cenné teoretické i praktické rady z transfuzní praxe.

Seznam použitých zkratek

a.s.	akciová společnost
AHG	AntiHuman Globulin (protilátka proti lidskému globulinu)
AIHA	autoimunitní hemolytická anémie
aj.	a jiné
anti-IgG	protilátka proti imunoglobulinu G
atd.	a tak dále
C3d	složka komplementu
cca	cirka
č.	číslo
DNA	DeoxyriboNucleic Acid (deoxyribonukleová kyselina)
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid (ethylendiamintetraoctová kyselina)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ET	enzymový test
et al.	z lat. et alii (a kolektiv)
event.	eventuálně
HON	hemolytické onemocnění novorozence
HTR	hemolytická transfuzní reakce
Ig	imunoglobulin
IgG	imunoglobulin třídy G
IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	imunoglobulin třídy G skupiny 1 - 4
IgM	imunoglobulin třídy M
lat.	latinsky
LISS	Low Ionic Strenght Solution (roztok o nízké iontové síle)
LISS-NAT	nepřímý antiglobulinový test s použitím roztoku o nízké iontové síle
min.	minuta
např.	například

NAT	nepřímý antiglobulinový test
PAT	přímý antiglobulinový test
PCR	polymerázová řetězcová reakce
PEG	polyethylenglykol
polyspec.	polyspecifický
str.	strana
susp.	suspektní
tj.	to je
TP	transfuzní přípravek, transfuzní přípravky
tzn.	to znamená
tzv.	takzvaný

Obsah

ÚVOD.....	10
1 SOUČASNÝ STAV.....	12
1.1 Předtransfuzní vyšetření	12
1.2 Imunohem. lab. metody využívané u předtransfuzního vyšetření	18
1.3 Krevně-skupinové systémy.....	23
1.4 Vyhledávání kompatibilních erytrocytů u pacientů s aloimunizací.....	32
2 CÍL PRÁCE.....	33
3 METODIKA.....	34
3.1 Charakteristika souboru	34
3.2 Preanalytická část	34
3.3 Analytická část	34
3.4 Postanalytická část.....	42
4 VÝSLEDKY	43
5 DISKUZE	49
6 ZÁVĚR	51
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	52
8 KLÍČOVÁ SLOVA.....	58
9 PŘÍLOHY.....	59

Úvod

Problematicke předtransfuzního vyšetření věnuje odborná společnost i v dnešní době velkou pozornost. Důvodem jsou požadavky klinických lékařů na maximální bezpečnost podávaných transfuzních přípravků (TP). Pro bezpečnost transfuze erytrocytů u pacientů s aloimunizací má zásadní význam kompatibilita a event. širší shoda v erytrocytárních antigenech. Antigenní shoda má význam také při transplantacích kostní dřeně a při orgánových transplantacích, kdy často ovlivňuje úspěch procesu transplantace.

Od zmiňované údajně první provedené transfuze uběhlo již několik století. Současná transfuzní medicína trvale vyvíjí snahu o tzv. účelnou hemoterapii, tzn., že pacientovi by měl být aplikován pouze TP, který obsahuje takovou složku krve, která je pro pacienta v určitém léčebném momentu optimální. Zdá se, že výběr vhodného TP již patří mezi rutinní rozhodování klinických lékařů, ale o konkrétním přípravku obsahujícím erytrocyty spolurozhoduje i specialista z oboru transfuzní medicíny.

S výběrem TP úzce souvisí i proces předtransfuzního vyšetření, který od založení transfuzní služby prodělal výrazný vývoj, a to zejména ve smyslu výběru metod k provádění vlastní zkoušky kompatibility. V počátcích transfuzní služby postačovala k provedení transfuze shoda krevní skupiny v ABO a Rh systému mezi dárce a příjemcem. V současné době, kdy je hemoterapie více a více účelnější a sofistikovanější, je snaha příjemce transfuze zatěžovat co možná nejméně. S tím souvisí i správné provedení komplexu předtransfuzních vyšetření a v neposlední řadě i výběr vhodné metody k provedení vlastní zkoušky kompatibility.

Dnes je již samozřejmostí provádět vlastní zkoušky kompatibility na systémech sloupcové (gelové) aglutinace, které postupně nahradily provádění zkoušek kompatibility ve zkumavkách.

Nyní, když jsou k dispozici robustní laboratorní systémy, je možné pozornost při výběru transfuzního přípravku více zaměřit na antigenní shodu v erytrocytárních systémech.

Moje práce se věnuje výběru vhodného TP pro pacienty v Nemocnici České Budějovice, a.s. a s tím souvisejícím zjištěním frekvence klinicky významných antierytrocytárních protilátek u polytransfundovaných pacientů a v neposlední řadě i posouzení rozsahu vyšetření erytrocytárních antigenů u příjemce a dárce před plánovanou transfuzí s cílem snížit riziko aloimunizace v rámci erytrocytárních antigenních systémů.

1 Současný stav

1.1 Předtransfuzní vyšetření

Předtransfuzní vyšetření je soubor organizačních opatření, laboratorních zkoušek a kontrol, prováděných před podáním TP, nebo v situaci, kdy je jejich podání pravděpodobné.

Cílem předtransfuzního vyšetření je zajistit příjemci podání krve schopné dostatečně dlouhého přežití v jeho krevním oběhu a minimalizovat nežádoucí imunohematologické účinky transfuze.

Předtransfuzní vyšetření pro transfuzní přípravky obsahující erytrocyty se skládá z vyšetření krevní skupiny příjemce a dárce v AB0 a RhD systému, screeningu nepravidelných antierytrocytárních protilátek a vlastní zkoušky kompatibility⁽¹⁾.

1.1.1 Žádost o vydání transfuzního přípravku a kontrola údajů

Podnětem pro zahájení předtransfuzního vyšetření je obdržení požadavku na transfuzi a krevního vzorku pacienta. Požadavek k vyšetření vydává vždy pouze lékař a to na žádance (Příloha 1), která musí obsahovat předepsané údaje (Příloha 2). Jsou-li požadované údaje neúplné nebo dokonce chybí, laboratoř nesmí požadavek přijmout. Výjimkou je pouze stav ohrožující život pacienta. Údaje na zaslaném krevním vzorku pacienta musí být totožné s údaji na žádance.

Poté se provádí porovnání výsledků pacientových předchozích imunohematologických vyšetření se současnými testy. Jsou-li zjištěny nepřesnosti, musí být objasněny ještě před vydáním transfuze^(2,3).

1.1.2 Vzorky pro předtransfuzní vyšetření

K vyšetření jsou přijaty pouze správně odebrané a označené vzorky žilní krve, které nejeví známky hemolýzy. Volný hemoglobin totiž může maskovat protilátkami vyvolanou hemolýzu⁽²⁾. Používá se srážlivá nebo nesrážlivá (v EDTA) krev⁽⁴⁾.

Časté transfuze nebo těhotenství mohou vést k tvorbě protilátek. Odběr vzorku proto musí být načasován s ohledem na tuto skutečnost. U polytransfundovaných

pacientů je ke kontrole imunologického stavu dostatečný 72 hodin (maximálně) starý vzorek. Pro zkoušku kompatibility by vzorek měl být odebrán těsně před transfuzí.

Vzorky plné krve lze uchovávat po dobu 7 dní při 4 °C. Po separaci plazmy od krvinek je možné ji zamrazit při -30 °C po dobu 6 měsíců. Po ukončení testů jsou vzorky dárce i příjemce uchovávány v chladničce po dobu 7 dní a to z důvodu případného dalšího vyšetření u potransfuzních komplikací ⁽²⁾.

1.1.3 Stanovení krevní skupiny v AB0 systému a určení RhD znaku

Tento test je nejdůležitější ze všech předtransfuzních testů. Důsledkem chyby může být smrt pacienta nebo závažné poškození jeho zdraví. Vyšetření se provádí metodou přímé aglutinace.

Test má dvě části. V první se provádí určení antigenů na erytrocytech pomocí monoklonálních diagnostických sér anti-A a anti-B. Ve druhé části se stanovují pravidelné protilátky AB0 v séru pacienta za použití typových erytrocytů A₁ a B ^(2,3). K této části vyšetření se zařazuje také kontrola pomocí pacientových erytrocytů nebo erytrocytů skupiny 0 ⁽²⁾. Při interpretaci výsledné skupiny je nutné, aby si výsledky antigenů a protilátek odpovídaly. Dojde-li k jakékoliv nesrovnalosti, je nutné ji vyřešit ještě před vydáním výsledku ⁽⁴⁾.

Vyšetření RhD znaku se provádí duplicitně pomocí různých monoklonálních diagnostických sér anti-D třídy IgM, která nezachycují variantu D^{VI(1,3)}. Ke každé sérii vyšetření musí být použita pozitivní a negativní kontrola ⁽²⁾.

Vyhodnocení výsledků viz Tabulka 1.

Tabulka 1: Vyhodnocení výsledků testu krevní skupiny v AB0 systému

Skupina	Reagencie				
	anti-A	anti-B	krvinky A ₁	krvinky B	krvinky 0
A	+	-	-	+	-
B	-	+	+	-	-
0	-	-	+	+	-
AB	+	+	-	-	-

Zdroj: Knowles, S., Poole, G. (2005)⁽¹⁾

1.1.4 Screening nepravidelných aniterycytárních protilátek

Jeho cílem je odhalit klinicky významné protilátky⁽²⁾. Za referenční techniku pro screening protilátek je považován nepřímý antiglobulinový test (NAT), který se provádí ve zkumavce za použití erytrocytů resuspendovaných v roztoku o nízké iontové síle (LISS-NAT). Hranice citlivosti LISS-NAT se bere jako standardní nepodkročitelné minimum^(2,4).

Za standardní metody se považují testy sloupcové (gelové) aglutinace a testy na „pevné fázi“. Na základě dlouhodobých výsledků externí kontroly kvality bylo zjištěno, že metody sloupcové (gelové) aglutinace a pevné fáze dosahují lepších výsledků než zkumavková metoda. Z tohoto vyplývá, že by tyto metody měly být preferovány⁽⁴⁾.

Za doplňkovou techniku NATu je považován enzymový test (ET), který je v některých případech (např. u Rh protilátek) citlivější než již zmíněný NAT^(2,4).

Testy se provádějí podle návodu k použití, který je přiložen u příslušných testovacích systémů.

Základními diagnostiky pro screening protilátek jsou certifikované screeningové panely⁽²⁾. Screeningové panely se řídí frekvencí výskytu určitých antigenů v populaci⁽³⁾. Pro Českou Republiku je doporučeno použití panelu tří diagnostických erytrocytů se zastoupením antigenů C, C^W, c, D, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, M, N a Le^a⁽⁴⁾. Ve Velké Británii je tento panel bez antigenu C^W⁽³⁾ atd. Diagnostické erytrocyty by měly být zastoupeny ve fenotypu DCe/DCe a DcE/DcE. Ve screeningovém panelu by taktéž měly být v homozygotním zastoupení přítomny antigeny Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s⁽⁴⁾.

Screeningové diagnostické erytrocyty pro předtransfuzní vyšetření se nesmějí používat ve směsi, protože jejich smícháním se snižuje sensitivita testu⁽³⁾.

Při vyšetření u podezření na hemolytickou transfuzní reakci (HTR) nebo autoimunitní hemolytickou anémii (AIHA) se provádí ještě autologní kontrola nebo přímý antiglobulinový test (PAT). Tyto testy ale nejsou nezbytnou součástí screeningu protilátek⁽⁴⁾.

1.1.5 Identifikace nepravidelných protilátek

Identifikace protilátek navazuje na pozitivní screeningový test a používají se k ní diagnostické erytrocyty. Je určována specifita protilátky a její klinický význam (Příloha 3) ^(4,5).

K identifikaci protilátek se stejně jako při jejich screeningu používají komerční certifikované identifikační panely, které umožňují identifikovat často se vyskytující klinicky významné protilátky. U protilátek, slabě reagujících v NATu, a u směsí protilátek se doporučuje použít panel s enzymaticky ošetřenými diagnostickými erytrocyty ⁽⁴⁾.

Protilátka se hodnotí podle rozpisu antigenů jednotlivých erytrocytů a shody získaných reakcí. Součástí testu je provedení autologní kontroly, při které je vyšetřováno sérum příjemce s jeho vlastními erytrocyty. Toto vyšetření se provádí za stejných podmínek paralelně s identifikací protilátky ⁽²⁾.

1.1.6 Výběr vhodného transfuzního přípravku

Základem je podání transfuze shodné v AB0 systému (Tabulka 2) a RhD znaku (Tabulka 3). Výjimkou je pouze život ohrožující stav, kdy ještě nebyla určena pacientova krevní skupina. V tomto případě se používá krev skupiny 0 RhD negativní (K negativní) a plazma AB ⁽¹⁾. Při nedostatku RhD negativních přípravků lze neimunizovaným RhD negativním jedincům (tj. bez průkazu anti-D) podat RhD pozitivní erytrocyty ⁽⁵⁾. Jakmile je určena krevní skupina pacienta, měla by být použita skupinově odpovídající krev.

Tabulka 2: Kompatibilita v AB0 systému

Příjemce	Lze podat transfuzní přípravek
0	0
A	A, 0
B	B, 0
AB	AB, A, B, 0

Zdroj: doporučení č. STL2011_08 ⁽⁵⁾

Tabulka 3: Kompatibilita RhD znaku

Příjemce	Lze podat transfuzní přípravek
RhD pozitivní D ^w potvrzený vyšetřením DNA ²	RhD pozitivní; RhD negativní ¹
RhD negativní D ^{w/v} - nevyšetřeno PCR / neuzavřeno / sérologicky susp. varianta / varianta určená PCR nejasný (diskrepantní) výsledek vyšetření RhD	RhD negativní

¹Nejsou-li přítomny protilátky anti-e a/nebo anti-c.

²Jde-li pouze o sérologickou suspekci, pak u žen fertilního věku je bezpečnější pro transfuzi použít RhD negativní erytrocyty (současné sérologické rutinní postupy nemohou zcela vyloučit všechny variantní formy antigenu D, např. D III).

Zdroj: doporučení č. STL2011_08⁽⁵⁾

Neonatální transfuze mají být shodné nebo kompatibilní v AB0 systému a RhD znaku a též je vhodné, aby bylo přihlédnuto ke krevní skupině matky. Ženy ve fertilním věku by měly ideálně dostat K negativní erytrocyty.

Pro pacienty, kteří jsou celoživotně závislí na podávání krevních transfuzí, je vhodné podávání erytrocytů odpovídajících antigenům RhD systému a K⁽¹⁾.

Příjemci AB0 a eventuálně RhD inkompatibilní transplantace kostní dřeně musí být transfundováni podle AB0 protilátek přítomných u příjemce. Ty mohou být buď původního, dárcovského nebo obojího typu.

U nemocných s klinicky významnými aloprotilátkami je nutno k transfuzi vybrat erytrocyty bez antigenů, proti nimž jsou aloprotilátky namířeny^(2,3).

1.1.7 Test kompatibility

Tento test musí zachytit inkompatibilitu v AB0 systému a klinicky významné protilátky. Provádí se mezi sérem příjemce a dárcovskými erytrocyty^(2,3). Jeho provedení je možné sérologicky metodou sloupcové (gelové) aglutinace nebo pevné fáze s citlivostí odpovídající alespoň LISS-NAT při 37°C nebo pomocí elektronického testu^(2,3,5).

Test kompatibility platí nejdéle 72 hodin. Jeho platnost lze prodloužit až na 7 dnů a to u pacientů, u kterých prokazatelně nebyla podána v průběhu posledních 28 dní transfuze erytrocytů nebo trombocytů⁽⁵⁾.

1.1.8 Vydání výsledku předtransfuzního vyšetření a přípravku k podání

Výsledek vyšetření musí být vydán před nebo s prvním vydávaným TP a musí obsahovat identifikaci pacienta, identifikaci transfuzního přípravku, datum provedení a výsledek předtransfuzního vyšetření, identifikaci laboratoře, identifikaci osoby, která provedla vyšetření, ev. osoby odpovědné za interpretaci výsledku, místo doručení přípravku a datum jeho výdeje. Nestandardní výsledky musí být zřetelně vyznačeny⁽⁵⁾.

1.2 Imunohematologické laboratorní metody využívané u předtransfuzního vyšetření

1.2.1 Aglutinační testy

Aglutinační testy se rutinně používají k určování krevních skupin, při screeningu a identifikaci protilátek a u testů kompatibility. Jsou založeny na principu aglutinační reakce, při níž účinkem protilátek dochází ke shlukování erytrocytů, na jejichž povrchu je přítomen odpovídající antigen. Protilátky vytvářejí mezi antigeny jednotlivých erytrocytů vazby. Nastává shlukování erytrocytů, tj. aglutinace⁽²⁾.

1.2.1.1 Rozdělení podle reagensů použitých pro aglutinaci

Test s erytrocyty resuspendovanými v solném prostředí

Test v solném prostředí je nejjednodušší a nejlevnější ze všech testů⁽⁶⁾. Slouží k vyšetření nepravidelných přirozených protilátek a získaných imunitních protilátek třídy IgM a k vyšetření erytrocytárních antigenů pomocí diagnostik obsahujících protilátky třídy IgM. Test se provádí ve zkumavkách⁽⁷⁾. K vyšetření se používá 2% až 5% suspenze diagnostických nebo vyšetřovaných erytrocytů ve fyziologickém roztoku (1 kapka), ke které se přidává patientské sérum/plazma (2 kapky) nebo diagnostické sérum (1 nebo 2 kapky podle návodu výrobce). Zkumavky se poté mohou ihned centrifugovat, anebo inkubovat při pokojové teplotě a až poté centrifugovat. Pro některá vyšetření je třeba inkubace při 37 °C nebo při 4 °C. Doba inkubace se řídí účelem vyšetření. Pro svoji malou citlivost se dnes k vyšetření zkoušky kompatibility nepoužívá⁽⁶⁾.

Test s erytrocyty resuspendovanými v LISS (Low-Ionic-StrengthSolution) roztoku

Do praxe byl tento test zaveden v roce 1980⁽⁸⁾ a slouží pro detekci protilátek, které se nacházejí v séru v nízkém titru⁽²⁾. LISS zvyšuje rychlost, kterou se protilátky váží na antigeny erytrocytů⁽⁶⁾. Test zahrnuje inkubaci patientského séra/plazmy a diagnostických erytrocytů s LISS roztokem po dobu 10-15 minut při 37 °C. Následuje centrifugace a odečtení aglutinace. Test je velmi účinný

pro identifikaci protilátek a má značné výhody, mezi které patří zvýšená sensitivity při detekci protilátek a kratší doba inkubace⁽⁹⁾.

Enzymové testy (ET)

ET jsou založeny na proteolytické aktivitě některých enzymů. Ty mají při nízkých koncentracích schopnost natrávit povrch erytrocytů⁽⁷⁾, čímž dojde ke zrušení jejich negativního náboje⁽²⁾. To jim umožní více se k sobě přiblížit. Tímto způsobem usnadňují aglutinaci a zvyšují citlivost téměř všech antigenů (kromě M, N, a Fy)⁽⁷⁾, jsou však jen vzácně citlivější než NAT. Z tohoto důvodu se používají pouze k jeho doplnění.

Nejčastěji používané enzymy jsou papain a bromelin. Papain obvykle slouží pro ošetření erytrocytů před jejich použitím k testování. Bromelin je spíše používán jako reagentie, která se přidává do reakce (jako aditivum)⁽¹⁰⁾.

Rizikem ET je, že vlivem působení enzymu může dojít k destrukci některých antigenů (např. antigenů M, N, a Fy)⁽²⁾.

Provedení ET může být jednofázové (erytrocyty + enzym – bromelin/papain + sérum/plazma) nebo citlivější dvoufázové (enzymaticky upravené erytrocyty + sérum/plazma)⁽⁴⁾.

Testy využívající jiné potenciátory (PEG - PolyEthyleneGlycol)

Metoda využívající PEG je velmi citlivá⁽⁸⁾. PEG se používá k vytlačení molekul rozpouštědla. Tím účinně zvyšuje koncentraci protilátky a antigenu a výrazně posiluje jejich reakci. Test využívá 20% roztok PEG⁽⁹⁾ ve fosfátovém pufru při běžné iontové síle nebo v prostředí o nízké iontové síle. Slouží ke zvýšení senzitivity testů pro detekci klinicky významných protilátek třídy IgG a také může být použit k zesílení reakce slabých protilátek⁽⁶⁾. Sérum, diagnostické erytrocyty a PEG se inkubují 15 minut a poté, po promytí, se přidá antiglobulinové sérum⁽⁹⁾.

Antiglobulinové testy (Coombsovy testy)

Antiglobulinové testy byly poprvé popsány Robertem Roystonem Coombsem a jeho kolegy v roce 1945⁽¹¹⁾. Zahrnují dva druhy testů: přímý a nepřímý antiglobulinový test (Příloha 4). Patří do skupiny aglutinačních testů a používají se k detekci protilátek⁽²⁾. U obou se při reakci využívá polyspecifický AHG (antihuman globulin), což je reagencie, která obsahuje protilátky proti lidskému IgG a C3d⁽¹²⁾.

a) Přímý antiglobulinový test (PAT)

PAT se používá k detekci erytrocytů, které mají na svém povrchu navázané protilátky a/nebo složky komplementu^(12,13), zejména IgG a C3d⁽¹³⁾. Slouží k odhalení přítomnosti navázaných autoprotilátek na erytrocytech pacienta (AIHA), protilátek od matky na erytrocytech novorozence u hemolytického onemocnění novorozence (HON) a aloprotilátek na transfundovaných erytrocytech po inkompatibilní krevní transfuzi⁽¹⁴⁾.

Odebraný vzorek krve se zpracuje a přítomné erytrocyty se promyjí^(2,15). Promytím se odstraní pacientova plazma a s ní i nenavázané protilátky. Poté se vzorek inkubuje s AHG. Jsou-li na erytrocytech navázány protilátky a/nebo složky komplementu, dojde k navázání Fab částí Ig obsažených v AHG na Fc fragment protilátek vázaných na erytrocyty. Výsledkem je viditelná aglutinace erytrocytů (Příloha 4)^(2,15).

b) Nepřímý antiglobulinový test (NAT)

NAT detekuje přítomnost protilátek proti erytrocytům, které se vyskytují volně v séru⁽²⁾. NATem se detekují nepravidelné protilátky proti erytrocytům. Používá se k prenatálnímu testování těhotných žen a k testování před krevní transfuzí⁽¹⁴⁾.

V první fázi testu se sérum pacienta inkubuje s diagnostickými erytrocyty a poté se vzorek promývá (odstranění nenavázaných protilátek). Ve druhé fázi se uplatňují již pouze protilátky navázané na erytrocyty. Přidá se AHG, které v případě positivity způsobí aglutinaci erytrocytů (Příloha 4)^(2,15).

NAT se také používá k vyšetření některých erytrocytárních antigenů⁽²⁾.

1.2.1.2 Rozdělení podle celkového provedení testu

Ve zkumavce

Tradičně se aglutinační testy erytrocytů prováděly ve skleněných zkumavkách^(9,16). Poslední dobou jsou tyto testy masivně nahrazovány novými metodami (hlavně sloupcové (gelové) aglutinace), přesto se ale ještě u některých metod používají⁽¹⁷⁾.

Aglutinace je hodnocena makroskopicky pod silným světlem. Není-li aglutinace zpozorována makroskopicky, je možné suspenzi natřít na podložní sklíčko a prohlédnout pod mikroskopem (zachycení velmi slabých reakcí)⁽⁹⁾.

Na mikrotitrační destičce

Jedná se o modifikaci zkumavkových testů⁽⁷⁾.

Sloupcová (gelová) aglutinace

Gelový test vyvinul v roce 1988 Lapiere a jeho spolupracovníci⁽¹⁸⁾. Tato technika se používá pro screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek, zkoušku kompatibility enzymovým a nepřímým antiglobulinovým testem, identifikaci protilátek, ale také pro určování AB0, Rh a dalších antigenů erytrocytů⁽¹⁹⁾. Reakce séra a buněk u tohoto druhu testu neprobíhá ve zkumavce, ale v mikrozkuškových (Příloha 5), které jsou asi 15 mm dlouhé a 4 mm široké. Každá obsahuje asi 35 µl gelu připraveného v roztoku pufru jako LISS nebo fyziologickém roztoku⁽¹⁷⁾. Gely mohou obsahovat i jiné prvky např. konzervanty (azid sodný), hovězí sérový albumin a v některých případech i činidla jako např. polyspecifický AHG, anti-IgG nebo jiná specifická antiséra^(17,18). Tyto látky musí být do gelu přidány výrobcem již během jeho přípravy, tedy ještě před naplněním mikrozkuškové, aby došlo k rozptýlení činidla po celé délce sloupce. Mikrozkuškové jsou po 6 umístěny v plastových kartách (Příloha 6), které umožňují snadnou manipulaci, interpretaci výsledků a po provedení testu i snadnou likvidaci. Informace o postupu provedení testu a interpretaci výsledků jsou uvedeny na příbalovém letáku⁽¹⁷⁾.

Testy na principu pevné fáze

Test se používá již od roku 1980. Jeho základem je mikrotitrační destička, která se skládá z 96 jamek. Tu lze použít jako celek nebo po rozdělení jako osmijamkové stripky. Destičky jsou spolu s indikátorem vlhkosti uloženy ve foliových sáčcích. Růžové zbarvení indikátoru upozorňuje na to, že destička byla vystavena příliš velké vlhkosti a musí být zlikvidována. Komerční soupravy mohou být zakoupeny v několika provedeních. Jamky mohou být potaženy buď lyzátem erytrocytární membrány poolovaných erytrocytů z 2 nebo 4 erytrocytů nebo lyzátem z panelu o 13 erytrocytech. Dostupné jsou i destičky, které jsou pokryté pouze patentovaným lepidlem. Na tyto destičky se pak dají aplikovat neporušené tekuté nebo zmrazené erytrocyty. Reagent, který v této metodě nahrazuje anti-IgG, je indikátor erytrocytů označený IgG proti lidskému IgG. Informace o postupu provedení testu a interpretaci výsledků jsou uvedeny na příbalovém letáku⁽¹⁷⁾.

1.2.2 Jiné testy používané v imunoematologii

K imunoematologickým vyšetřením se používají ještě další reakce: precipitační reakce, testy na průkaz hemolyzinů, testy inhibice aglutinace, ELISA, aj.⁽²⁾ Tyto metody se ale nepoužívají k předtransfuznímu vyšetření. Přesahují rámec této práce, a proto zde nebudou podrobněji rozebírány.

1.3 Krevně-skupinové systémy

1.3.1 Systém Duffy

Antigeny

Systém Duffy zahrnuje 6 antigenů: Fy^a, Fy^b, Fy3, Fy4, Fy5 a Fy6 (frekvence výskytu viz Příloha 8). Jsou to transmembránové glykoproteiny, které 7x prostupují erytrocytární membránu. Mají extracelulární N-terminální doménu a cytoplazmatickou C-terminální doménu (Příloha 7). Běžně se vyšetřují antigeny Fy^a a Fy^b.

Glykoproteiny Duffy jsou receptory pro *Plasmodium vivax*, což je parazit, který napadá červené krvinky a způsobuje malárii. Erytrocyty, na kterých se tyto antigeny nenacházejí, jsou k proniknutí Plasmodia relativně rezistentní. Tato skutečnost má vliv na pokles četnosti výskytu krevní skupiny Duffy u populací, kde je běžný výskyt malárie^(20,21,22).

Zmíněné antigeny jsou exprimovány na erytrocytech, ale také na mnoha jiných buňkách (např. na endotelových buňkách krevních cév, epiteliálních buňkách sběrných tubulů ledvin, plicních sklípcích a Purkyňových buňkách mozečku).

Jsou velmi citlivé na většinu proteolytických enzymů. Zcela je zničí např. papain, ficin a bromelin⁽²⁰⁾.

Protilátky

Protilátky tohoto systému jsou typu IgG a váží komplement⁽²⁾. Anti-Fy^a a anti-Fy^b způsobují mírné i těžké, akutní i opožděné HTR. Byly popsány i smrtelné potransfuzní reakce. Mohou také vyvolat HON⁽²¹⁾.

Anti-Fy^a

Anti-Fy^a nejčastěji vzniká v důsledku krevních transfuzí. Její vznik může být vyvolán i těhotenstvím. Obvykle je třídy IgG (většinou IgG1). Nejlépe reaguje v NATu. Přibližně 50 % anti-Fy^a váže komplement. Může způsobit vážnou HTR, byly popsány i smrtelné případy. Z hlediska transfuzí se protilátka považuje za velmi významnou⁽²⁰⁾. Tato protilátka může být také příčinou mírného, ale i závažného HON⁽²²⁾. U mnoha případů výskytu HON matka prodělala předchozí transfuzi⁽²⁰⁾.

Anti-Fy^b

Relativně vzácná protilátka (asi 20x méně častá než anti-Fy^a). Nejlépe reaguje v NATu. Anti-Fy^b může být příčinou mírné i vážné potransfuzní reakce, byla popsána i smrtelná reakce. Vzácně může vyvolat také HON, které je většinou mírné⁽²⁰⁾.

1.3.2 Systém Lewis

Antigeny

Systém Lewis zahrnuje dva hlavní antigeny, Le^a a Le^b (frekvence výskytu viz Příloha 9), podléhající kontrole genů *FUT (Le)*^(2,20). Antigeny systému Lewis fenotypicky a biochemicky úzce souvisí se skupinami ABO a H. Nejsou produkovány erytroidními buňkami, na membrány erytrocytů se navazují sekundárně z plazmy^(20,22). Za krevně skupinové antigeny jsou považovány, protože byly prvně rozpoznány na erytrocytech⁽²⁰⁾.

Jsou to ve vodě rozpustné glykolipidy a glykoproteiny, které se nacházejí v tělesných tekutinách a sekretech jako jsou sliny, mateřské mléko, gastrointestinální šťáva, moč atd.⁽²⁾ Jejich oligosacharidové řetězce jsou obvykle konjugované s polypeptidy anebo ceramidy. Ve spojení s polypeptidy vytvářejí glykoproteiny s ceramidy glykosfingolipidy.

Tvorbu antigenů Le určují tyto geny: *FUT 2 (Se)* a *FUT 3 (Le)*. Každý z genů se vyskytuje ve dvou alelách: *FUT 2* jako *Se* (nositelé této alely se označují jako sekretoři a vylučují solubilní antigeny H, A a B do tělesných tekutin) a *se* (nositelé této alely se označují jako nonsekretoři a uvedené antigeny do tělesných tekutin nevylučují). *FUT 3* má alelu *Le* (nositelé této alely vytvářejí antigeny Le) a *le* (nositelé této alely nevytvářejí antigeny Le). Gen *Le* produkuje enzym katalyzující syntézu antigenu Le^a a Le^b.

Antigeny Lewis jsou syntetizovány specifickou glykosyltransferázou. Ta připojuje fukózu na prekurzorové řetězce typu 1 a 1 H, které jsou přítomny v plazmě, sekretech a endodermálních tkáních (na erytrocytech se nevyskytují). Řetězec 1 H je přítomen jen u sekretorů. Při tomto ději je Le gen v kompetici s geny A a B. Výsledkem procesu je: připojením fukózy na řetězec 1 vznik antigenní substance Le^a, připojením

fukózy na řetězec 1 H vznik antigenní substance Le^b . Solubilní antigeny Le^a a Le^b se z plazmy adsorbují na membránu erytrocytů a vzniká tak buď fenotyp $Le(a+b-)$, nebo $Le(a-b+)$. Antigen Le^b se tedy vytváří jen u sekretorů (v přítomnosti alely Se) a antigen Le^a jen u nonsekretorů (v přítomnosti alely se). Nositelé alely le nevytvářejí antigen Le a jejich fenotyp je $Le(a-b-)$ ⁽²⁰⁾.

Vedle hlavních antigenů Le^a a Le^b existují ještě vzácné antigeny Le^c , Le^d a Le^x . Při narození chybí nebo jsou slabé. Detekují se NATem nebo pomocí ET ⁽²⁾.

Protilátky

Všechny Lewis protilátky jsou třídy IgM a nezpůsobují tedy HON (neprocházejí placentou). Obvykle nejsou aktivní při 37 °C a nejsou obecně považovány za klinicky významné ⁽²²⁾. Tyto protilátky dobře reagují v testech při pokojové teplotě nebo v chladových testech ⁽²⁾.

Anti- Le^a

Anti- Le^a není neobvyklá a většinou má „přirozený“ původ. Tvoří ji pouze jedinci geneticky Le negativní (fenotyp $Le(a-b-)$). Osoby s fenotypem $Le(a-b+)$ protilátku anti- Le^a netvoří z toho důvodu, že Le^a je součástí jejich antigenní konstituce. Protilátka je převážně třídy IgM, pouze zřídka se vyskytne čistá IgG. Aglutinace erytrocytů s anti- Le^a je nejsilnější za nízkých teplot. Vzácněji reaguje při 37 °C. Její reaktivitu lze zesílit pomocí ošetření buněk proteázou. Některé anti- Le^a jsou lymfocytotoxické. Protilátky reagující při 37°C mohou ojediněle vyvolat HTR ⁽²⁰⁾.

Anti- Le^b

Vyskytují se méně často než anti- Le^a . Obvykle jsou tvořeny nonsekretory ABH s fenotypem $Le(a-b-)$ ⁽²⁾, mohou je však tvořit i lidé s fenotypem $Le(a+b-)$. Existují 2 typy anti- Le^b : anti- Le^{bH} a anti- Le^{bL} . Obvykle jsou třídy IgM a některé jsou lymfocytotoxické. Jsou podstatně méně nebezpečné než anti- Le^a . Pouze velmi vzácně vedou k hemolytickým reakcím ⁽²⁰⁾.

1.3.3 Systém Kidd

Antigeny

Systém Kidd zahrnuje 3 antigeny: Jk^a, Jk^b a Jk³ (frekvence výskytu viz Příloha 10). Jsou to glykoproteiny. Strukturně jde o integrální transmembránové proteiny, které se nacházejí na membráně erytrocytů. Předpokládá se, že 10x procházejí membránou a oba konce N i C jsou intracelulární (Příloha 7) ⁽²¹⁾. Běžně se vyšetřují antigeny Jk^a a Jk^b. JK³ je antigen o vysoké frekvenci.

Antigeny systému Kidd se vyskytují na červených krvinkách i jiných tkáních, jako jsou ledviny, mozek a srdce ⁽²⁾.

Protilátky

Protilátky obvykle váží komplement a jsou třídy IgG (častější) a IgM (méně časté). Anti-Jk^a je většinou třídy IgG nebo je směsí IgG a IgM, vzácně může být i čistá IgM. Anti-Jk^b je vzácnější a také je většinou třídy IgG, výjimečně i IgM. Není zaznamenán žádný případ přirozeně se vyskytující Kidd protilátky ⁽²⁰⁾.

Obě mohou způsobit těžké potransfuzní reakce a také, i když v menší míře HON. Protilátky v systému Kidd také mohou být příčinou pozdních HTR. Často jsou hůře detekovatelné pomocí sérologických metod. Po stimulaci mají tendenci rychle vymizet ^(20,22). Obecně je k jejich zjištění nutný antiglobulinový test a k průkazu slabších protilátek je vhodné použít enzymem ošetřené erytrocyty. Antigeny systému Kidd jsou rezistentní k proteolytickým enzymům (papain, ficin, trypsin, chymotrypsin a pronáza). Ošetření červenýchrvinek těmito enzymy obecně zvyšuje reaktivitu protilátek s antigeny Kidd ⁽²⁰⁾.

1.3.4 Systém Kell

Antigeny

Systém Kell je složitý antigenní systém zahrnující sady antigenů s alelickým vztahem: K/k, Kp^a/Kp^b, Js^a/Js^b (frekvence viz Příloha 11) a větší počet dalších antigenů o vysoké nebo nízké frekvenci.

Všechny antigeny systému Kell jsou vyjádřeny na glykoproteinu Kell umístěném na membráně erytrocytů⁽²⁰⁾.

Strukturně je protein Kell polypeptidový řetězec, který se skládá ze 732 aminokyselin⁽²¹⁾. Obsahuje C-extracelulární, transmembránovou a cytoplazmatickou doménu (Příloha 7)⁽²³⁾. Řetězec je glykosilovaný na 5 různých místech⁽²¹⁾. Je sekvenčním a strukturálním homologem se skupinou na zinku dependentních endopeptidáz^(20,24). Tyto endopeptidázy obsahují pentamerovou sekvenci, která je nezbytná pro vázání zinku a katalytickou aktivitu⁽²¹⁾.

Dříve se usuzovalo, že antigeny Kell jsou vyjádřeny pouze na krevních buňkách erytroidního původu (tzn. na erytrocytech a jejich prekurzorech). V poslední době ale bylo zjištěno, že se nacházejí také na myeloidní tkáni⁽²⁵⁾. V malém množství jsou vyjádřeny také na různých orgánech. Jedná se o lymfatické orgány, svaly (srdeční a kosterní), nervový systém⁽²⁶⁾ a pankreas⁽²⁷⁾.

Klinicky nejvýznamnější antigen tohoto systému je antigen K⁽²¹⁾. Jde o jeden z nejvýznamnějších antigenů z hlediska transfuzí i HON. Jeho frekvence v populaci je přibližně 9 %. Alelicky komplementární k němu je také klinicky významný antigen k. Jeho frekvence v populaci je přibližně 99,8 %^(20,22).

Protilátky

Protilátky jsou nejčastěji třídy IgG (hlavně IgG1) a vzácně třídy IgM⁽²³⁾. Jsou klinicky významné⁽²⁰⁾, mohou tedy způsobit závažné formy HON a v případě podání inkompatibilní krve i těžké potransfuzní reakce. Optimální metodou pro jejich vyšetření je NAT⁽²³⁾.

Anti-K

Anti-K je nejčastější imunní protilátka červených krvinek mimo ABO a Rh systém. Často špatně reaguje v LISS. Může způsobit těžké potransfuzní reakce a těžké HON. Asi 10 % K negativních pacientů, kteří dostanou jednotku K pozitivní krve, poté produkují protilátku anti-K. To tento antigen v míře imunogenosti řadí na druhé místo, hned za antigen D.

Asi 0,1 % ze všech HON je způsobeno anti-K. HON způsobená touto protilátkou se svým mechanismem liší od Rh HON. Anti-K způsobuje fetální anemii potlačením tvorby červených krvinek, protože antigeny Kell jsou přítomny již na nezralých prekurzorech červených krvinek. Naproti tomu při HON vyvolané Rh protilátkami dochází k rozpadu zralých erytrocytů plodu ^(20,22). Při výběru vhodného transfuzního přípravku platí jedno základní pravidlo: dětem a ženám ve fertilním věku je nutné podávat K negativní erytrocytové TP ⁽²³⁾.

Anti-k

Vzácná protilátka díky velmi nízké frekvenci fenotypu k-. Většinou je třídy IgG. Nejlépe reaguje v NATu. Je známa i chladová anti-k třídy IgM. Může způsobit těžkou HTR i vážné HON ^(20,22).

Většina ostatních Kell protilátek je vzácná a nejlépe se prokazují NATem ⁽²²⁾.

1.3.5 Rh systém

Antigeny

Rh systém zahrnuje více než 50 antigenů. Mezi nejvýznamnější patří D ^(20,22) (po antigenech A a B nejvýznamnější ze všech) ⁽²⁴⁾, C, c, E a e, ⁽²²⁾ (frekvence viz Příloha 12) v České republice také C^W ⁽⁴⁾. Antigeny Rh systému jsou kódovány dvěma geny uloženými v těsné blízkosti na krátkém raménku chromozomu 1. Jsou to: gen *RHD*, který kóduje antigen D, gen *RHCE*, který kóduje antigeny Cc, Ee. Blízkost genů umožňuje při meióze výměnu genetického materiálu mezi *RHD* a *RHCE* na homologních chromozomech. Výsledkem jsou hybridní geny obsahující genetický materiál z obou genů. Jejich produktem jsou variantní a slabé antigeny RhD a různé odchylky v antigenech C, c a E, e. Antigen C^W se dědí na genu *RHCE*, ale není alelou C a c (20). V České Republice se vyskytuje ve vyšší frekvenci (6-7%) než v anglosaských zemích (2-3%) ⁽²⁸⁾.

Antigeny Rh systému jsou transmembránové proteiny. Tyto proteiny nenesou oligosacharidové řetězce, ale jsou palmitované. 12x procházejí buněčnou membránou

erytrocytů. Oba terminální konce jsou v cytosolu (Příloha 7). Mají také šest externích smyček, které jsou potenciálními místy antigenní aktivity⁽²²⁾.

Antigeny Rh jsou vyjádřeny jako část proteinového komplexu na membráně erytrocytů. Tento komplex se nachází pouze na buňkách erytroidní řady, a proto se Rh antigeny nalézají pouze na erytrocytech. Složení komplexu proteinů není dosud přesně známé, ale předpokládá se, že jde o tetramer, který je složen ze dvou molekul tzv. Rh asociovaného glykoproteinu (RhAG) spojeného se dvěma molekulami Rh proteinu. Rh proteiny mohou být RhD (nesou-li antigen D) nebo RhCE (nesou-li antigen C, c, E nebo e). RhAG nese antigeny Rh systému, ale jeho přítomnost je nutná pro expresi Rh antigenů. Oba tyto proteiny jsou transmembránové a jsou nedílnou součástí membrány erytrocytů.

Antigeny Rh hrají roli v zachování integrity buněčné membrány erytrocytů. Absence komplexu Rh má za následek změnu tvaru červených krvinek, což zkracuje jejich životnost a následkem toho vzniká mírná hemolytická anemie⁽²¹⁾.

Antigeny Rh systému jsou vysoce imunogenní, nejvíce imunogenní je antigen D. Po podání 200 a více ml D pozitivních červených krvinek si anti-D tvoří kolem 85 % D negativních jedinců⁽²⁰⁾.

Protilátky

Vznikají jako následek imunizace transfuzí nebo těhotenstvím, ale někdy je možno nalézt i přirozené protilátky⁽²⁾. Většina je typu IgG, některé také IgM⁽²¹⁾. Mohou být příčinou těžké i mírné, časně i pozdní HTR nebo HON⁽²⁾. Jen vzácně váží komplement, a proto je odstraňování erytrocytů zprostředkováno zpravidla prostřednictvím makrofágů ve slezině – extravaskulární hemolýza⁽²¹⁾.

Anti-D

Po anti-A a anti-B je to nejvýznamnější protilátka. Je převážně třídy IgG (podtřídy IgG1 a IgG3)⁽²⁰⁾. Tato protilátka může způsobit těžkou akutní nebo pozdní HTR, a proto nesmí být nikdy podána D pozitivní krev pacientovi s anti-D. Anti-D je nejčastější příčinou těžkých forem HON^(20,22), které byly v minulosti hlavní příčinou úmrtí plodu⁽²¹⁾. Od zavedení anti-D imunoglobulinové profylaxe⁽²²⁾ spolu s pečlivým

sledováním rizikových těhotenství se významně snížil výskyt HON způsobené inkompatibilitou v antigenu RhD. Přes veškerá zavedená opatření však nelze ve všech případech RhD aloimunizaci zabránit, a proto i nadále zůstává jednou z hlavních příčin HON⁽²¹⁾.

Anti-C, anti-c, anti-E a anti-e

Tyto protilátky mají mnoho charakteristik podobných anti-D. Většinou jsou imunní a třídy IgG (nejčastěji IgG1, také ale IgG2, IgG3 a také byly pozorovány IgG4). Všechny způsobují mírné i vážné HTR, často pozdního typu. Anti-c je hned po anti-D nejdůležitější Rh protilátkou a může způsobit těžké formy HON. Anti-C, -E a -e způsobují HON vzácněji a většinou jde o mírné formy⁽²⁰⁾.

Anti-C^W

Anti C^W je poměrně častá protilátka^(20,22) a její výskyt je v různých populacích variabilní⁽²⁴⁾. Může působit HON, většinou však jde o mírné formy^(20,22).

1.3.6 Systém MNSs

Antigeny

Systém MNS se skládá ze 45 antigenů⁽²⁴⁾. Nejvýznamnějšími antigeny jsou M, N, S a s (frekvence viz Příloha 13). Antigeny systému MNS se nacházejí na membránových glykoforinech A a B (Příloha 7). Antigeny M, N jsou přítomny na glykoforinu A, antigeny S, s na glykoforinu B⁽²⁰⁾. Antigeny MNS jsou také vyjádřeny na endotelu ledvin a na epitelu⁽²⁴⁾.

Geny kódující systém MNS jsou umístěny v těsné blízkosti na dlouhém raménku chromozomu 4. Jejich blízkost umožňuje výměnu genetického materiálu podobně jako v Rh systému, vznik hybridních genů a v důsledku toho vznik mnoha antigenů o nízké frekvenci a různých odchylek v MNS systému⁽²⁰⁾.

Glykoforiny A a B jsou transmembránové glykoproteiny, které jednou protínají erytrocytární membránu. Glykoforiny obsahují velké množství kyseliny sialové, která přispívá k vytvoření negativního povrchového náboje na erytrocytární membráně⁽²¹⁾.

Existují pozorování, že glykoforiny mohou působit jako receptory pro *Plasmodium falciparum*, což je parazit, který u lidí způsobuje malárii⁽²⁰⁾.

Anti-M

Anti-M je poměrně běžná, většinou třídy IgM a předpokládá se, že je především přirozeného původu, protože se často vyskytuje u dětí, které dosud nedostaly krevní transfuzi. Většina anti-M reaguje pouze při teplotě pod 37 °C (optimum jsou 4 °C). U dětí je častější než u dospělých. Často je závislá na pH^(20,22). Pokud reaguje jen při teplotě pod 37 °C, nemá klinický význam, ale reaguje-li při 37 °C v NATu, je nutné na ni při transfuzích brát ohled. Protilátka reagující při 37 °C může způsobit HTR a vzácně může být příčinou HON⁽²⁰⁾.

Anti-N

Ve srovnání s anti-M je méně častá. Většinou se vyskytuje přirozeně a je třídy IgM⁽²⁰⁾. Projevuje se jako chladová protilátka (neaktivní při teplotě nad 37 °C)⁽²⁾. Jsou však známy vzácné případy vzniku imunní anti-N, která se vytvořila následkem vícečetných transfuzí⁽²⁰⁾.

Anti-S

Obvykle imunní protilátka, většinou neváže komplement a je třídy IgG, ačkoli byly zaznamenány i případy IgM. Obvykle reaguje při 37°C, ale většina má ideální reakční rozmezí 10-22 °C⁽²⁰⁾.

Anti-s

Imunní protilátka, která byla objevena 4 roky po anti-S. Může být třídy IgM i IgG a většinou neváže komplement. Optimální reakční teplota je 22 °C a méně.

Anti-S i anti-s mohou působit těžké HTR i vážné formy HON⁽²⁰⁾.

1.4 Vyhledávání kompatibilních erytrocytů u pacientů s aloimunizací

Aloimunizace je jedním z rizik krevní transfuze. Je to proces, při kterém se vytvářejí protilátky proti jednomu nebo více aloantigenům erytrocytů v důsledku genetických rozdílů mezi dárcem a příjemcem⁽²⁹⁾. To, zda imunitní systém příjemce bude reagovat, závisí na jeho genetických a získaných faktorech, na dávce, počtu a frekvenci transfuzí a také na imunogenicitě daného antigenu^(29,30,31).

Nejčastějšími příčinami vzniku aloimunizace jsou krevní transfuze a to hlavně opakované, u kterých riziko vzniku několikanásobně vzrůstá⁽³²⁾, těhotenství a orgánové transplantace⁽³⁰⁾.

Klinickými důsledky aloimunizace jsou akutní i pozdní HTR, HON^(33,34) a případně zvýšené riziko rejekce po orgánové transplantaci⁽³⁴⁾.

HON je nejčastěji způsobeno aloprotilátkou anti-D⁽³⁵⁾. Nejúspěšnější metodou prevence HON způsobeného touto protilátkou je podání RhD imunoglobulinu^(36,37). Na rozvoji HON se mohou podílet i protilátky vytvářející se proti dalším erytrocytárním antigenům (např. antigenu K, c⁽³⁸⁾ a S⁽³⁹⁾). Proti tomuto a dalším erytrocytárním antigenům zatím nebyly vyvinuty imunoglobuliny zabraňující tvorbě protilátek⁽³⁸⁾.

Aloimunizace po transfuzi erytrocytů je častou komplikací u pacientů s chronickými onemocněními (např. srpkovitá anemie, talasemie, atd.), která vyžadují pravidelné podávání transfuzí^(33,40). Její vznik u těchto pacientů lze omezit podáváním fenotypově shodných krevních transfuzí⁽⁴¹⁾.

U D negativních žen ve fertilním věku je důležité zabránit Rh imunizaci antigenem D. U těchto žen, je-li to možné, by proto měl být podán přípravek obsahující D negativní erytrocyty⁽³⁾. V některých státech (Nizozemí, Austrálie) je ženám ve fertilním věku mimo RhD negativní rutinně podávána i Kell negativní krev⁽³⁸⁾.

Podávání fenotypově shodných transfuzních přípravků je indikováno ještě v několika dalších případech (Příloha 14)⁽⁵⁾.

2 Cíl práce

- I. Shrnout současné vědomosti o problematice aloimunizace v moderním transfuzním lékařství.
- II. Vypracovat přehled klinicky významných protilátek.
- III. Zjistit frekvenci výskytu aloprotilátek u krevních vzorků pro předtransfuzní vyšetření pacientů Nemocnice České Budějovice, a.s.
- IV. Navrhnout ideální postup předtransfuzního vyšetření u polytransfundovaných pacientů a u žen ve fertilním věku.

3 Metodika

3.1 Charakteristika souboru

Praktická část bakalářské práce byla vypracována na Transfúzním oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. v období 1.-30. 11. 2011. Během sledovaného období bylo vyšetřeno 1122 vzorků. Z těchto vzorků bylo u 926 požadováno provedení předtransfuzního vyšetření. U nich bylo provedeno vyšetření krevní skupiny AB0, RhD a screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek.

3.2 Preanalytická část

Preanalytická část byla provedena v souladu s Doporučením Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_07 ze dne 1. 3. 2011 (Základní imunohematologické laboratorní vyšetření červené řady – Obecné zásady a technické postupy) ⁽⁴⁾ a ČLS JEP č. STL2011_08 ze dne 1. 3. 2011 (Předtransfuzní laboratorní vyšetření) ⁽⁵⁾.

3.3 Analytická část

3.3.1 Vyšetření krevní skupiny zkumavkovou metodou

Diagnostika a chemikálie

- 1 zkumavka 6 ml krve pacienta v EDTA, ev. sražené krve
- Diagnostikum anti-A monoklonální Sanquin Reagents
- Diagnostikum anti-B monoklonální Sanquin Reagents
- Diagnostikum anti-AB monoklonální Sanquin Reagents
- Lektin anti-A1 Sanquin Reagents
- Lektin anti-H Sanquin Reagents
- Pufrovaný fyziologický roztok o pH 6,98

Spotřební a pomocný materiál

- aglutinační a Wassermannovy zkumavky
- stojánky na zkumavky

- jednorázové 3 ml pipety
- špičky k pipetám
- skleněné pasteurky

Přístroje a technické vybavení

- laboratorní centrifuga na centrifugaci zkumavek
- stojan na zkumavky

Vyšetřovaný vzorek nesrážlivé/srážlivé žilní krve byl centrifugován 2 min. při 3000 ot/min. Poté byl do předem označené aglutinační zkumavky odsát supernatant (plazma/sérum). Sediment erytrocytů byl promyt v nadbytku fyziologického roztoku a byl z něj připraven 2% náplav (makroskopicky lososové barvy). Dalším krokem bylo označení zkumavek: anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D (IgM+IgG) a pro reakce s typovými erytrocyty A₁, A₂, B a 0. Do příslušných zkumavek bylo nakapáno po 2 kapkách příslušného diagnostického séra a příslušných erytrocytů. Do zkumavek s diagnostickými séry bylo přidáno po 2 kapkách 2% náplavu vyšetřovaných erytrocytů. Do zkumavek s typovými erytrocyty bylo přidáno po 2 kapkách vyšetřované plazmy/séra. Zkumavky byly lehce protřepány a centrifugovány 1 min. při 1000 ot/min. Aglutinace byla odečítána makroskopicky při jemném poklepání na dno zkumavky. Nakonec byl interpretován výsledek. Negativní (-): erytrocyty volně rozptýlené u dna zkumavky, pozitivní (+): přítomna aglutinace nebo hemolýza erytrocytů (Tabulka 4 a 5).

Stejným způsobem bylo provedeno vyšetření druhým sérem anti-D třídy IgM.

Tabulka 4: Interpretace výsledků vyšetření krevní skupiny

Krevní skupina	Reakce s						
	anti-A	anti-B	anti-AB	erythrocyty	erythrocyty	erythrocyty	erythrocyty
				A ₁	A ₂	B	0
A	+	-	+	-	-	+	-
B	-	+	+	+	+	-	-
AB	+	+	+	-	-	-	-
0	-	-	-	+	+	+	-

Zdroj: Hrubíško, M. et al. (1980)⁽⁷⁾

Tabulka 5: Interpretace výsledků vyšetření RhD znaku

Krevní skupina	Reakce s anti-D
RhD pozitivní	+
RhD negativní	-

Zdroj: Hrubíško, M. et al. (1980)⁽⁷⁾

3.3.2 Vyšetření krevní podskupiny zkumavkovou metodou

Pomůcky (viz kapitola 3.3.1 Vyšetření krevní skupiny zkumavkovou metodou str. 34-35)

Podskupiny A byly vyšetřovány v tom případě, byla-li při vyšetření krevní skupiny zjištěna skupina A nebo AB.

Zkumavky byly označeny anti-A₁ a anti-H. Poté do nich bylo nakapáno po 2 kapkách příslušného lektinu anti-A₁ nebo anti-H a po 2 kapkách 2% náplavu vyšetřovaných erytrocytů v 0,9% roztoku NaCl. Dále byl obsah zkumavek řádně promíchán a inkubován 10 min. Nakonec byly zkumavky odstředěny 1 min. při 1000 ot/min. Aglutinace byla odečítána makroskopicky při jemném poklepání na dno zkumavky. Nakonec byl interpretován výsledek. Reakce anti-A₁ znamená podskupinu A₁. Reakce anti-H znamená podskupinu A₂ (Tabulka 6).

Tabulka 6: Interpretace výsledků vyšetření podskupin A₁ a A₂

Erytrocyty	Sérum	
	anti-A ₁	anti-H
A ₁	+	-
A ₂	-	+

Zdroj: Hrubíško, M. et al. (1980) ⁽⁷⁾

3.3.3 Screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek metodou sloupcové (gelové) aglutinace DiaMed

Diagnostika a chemikálie

- 1 zkumavka 6 ml krve pacienta v EDTA, ev. sražené krve
- screeningový panel ID-DiaCell I-II-III
- screeningový panel ID-DiaCell I-II-III (papainizované erytrocyty)
- karty dělené (3 mikrozkušavky pro NaCl/enzymový a chladový test, 3 mikrozkušavky pro LISS/Coombs – AGH polyspec.)
- karty LISS/Coombs (AGH polyspec.) DiaMed ID
- karty NaCl/enzymový a chladový test DiaMed ID
- ID-Diluent 2 (modifikovaný LISS roztok) DiaMed ID (modifikovaný LISS roztok)
- ID-Papain – roztok pro papainizaci erytrocytů

Spotřební a pomocný materiál

- aglutinační a Wassermannovy zkumavky
- stojánky na zkumavky
- jednorázové 3 ml pipety
- špičky k pipetám
- skleněné pasteurky

Přístroje a technické vybavení

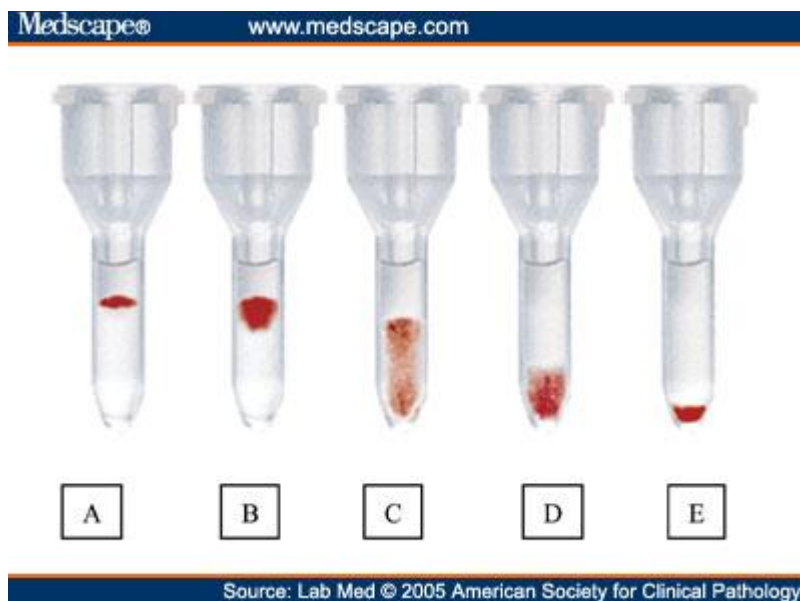
- laboratorní centrifuga na centrifugaci zkumavek
- inkubátor nastavený na 37 °C

- odstředivka DiaMed ID – 1202
- inkubátor DiaMed DG – 223
- stojan na zkumavky a na ID karty DiaMed ID
- ID-Pipetor FP-2, FP-3
- zásobník s rozplňovačem na roztok ID Diluent 2
- pipety k pipetování 10, 25 a 50 μ l

Vzorek krve a žádanka byly označeny číslem a vyšetřovaný vzorek krve byl centrifugován cca 2 min. při 3000 ot/min. aby se oddělila plazma/sérum od erytrocytů.

Na dělených kartách DiaMed byly označeny příslušné zkumavky tak, aby bylo zřejmé, v jaké mikrozkušavce je jaký typ screeningových erytrocytů. Dále byly karty označeny číslem vzorku. Do mikrozkušavek bylo posléze napipetováno dle označení po 50 μ l příslušných typových erytrocytů (příslušné typové erytrocyty do příslušně označené mikrozkušavky) a po 25 μ l vyšetřované plazmy/séra. Do mikrozkušavek pro LISS/Coombs byly napipetovány erytrocyty screeningového panelu ID-DiaCell I-II-III, do mikrozkušavek pro NaCl/enzymový a chladový test byly napipetovány erytrocyty screeningového panelu ID-DiaCell I-II-III-P. Všechny karty byly následně inkubovány 15 min. v inkubátoru DiaMed při 37 °C a po inkubaci centrifugovány 10 min. v centrifuze DiaMed. Výsledky byly makroskopicky odečteny (Obrázek 1 str. 39) a zaznamenány. Při pozitivním výsledku byla příčina positivity určena identifikací protilátek.

Obrázek 1: Hodnocení výsledku sloupcové (gelové) aglutinace



Mikrozkumavka	Reakce	Popis
A	4+	erythrocyty tvoří linii u horní části mikrozkumavky
B	3+	většina erythrocytů je v linii u horní části mikrozkumavky, některé erythrocyty jsou umístěny pod linií, směřují ke spodní části mikrozkumavky
C	2+	erythrocyty jsou plynule rozmístěny mezi horní a spodní částí mikrozkumavky
D	1+	některé erythrocyty jsou umístěny nad spodní částí mikrozkumavky, většina je u dna mikrozkumavky
E	negativní	všechny erythrocyty jsou umístěny u dna mikrozkumavky

Zdroj: Delaflor-Weiss, E., Chizhevsky, V. (2005)⁽¹⁶⁾
<http://www.medscape.com/viewarticle/509092>

3.3.4 Identifikace nepravidelných antierytrocytárních protilátek metodou sloupcové (gelové) aglutinace

Potřeby (viz kapitola 3.3.3 Screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek metodou sloupcové (gelové) aglutinace DiaMed str. 37-38), navíc byly použity tyto panely erytrocytů:

- identifikační panel erytrocytů ID-DiaPanel DiaMed-ID
- identifikační panel erytrocytů ID-DiaPanel-P DiaMed-ID (papainizované erytrocyty)

- identifikační panel erytrocytů Makropanel 16 Exbio

Vyšetřované erytrocyty byly napipetovány do označené aglutinační zkumavky a promyty v nadbytku fyziologického roztoku (aglutinační zkumavka byla doplněna cca do $\frac{3}{4}$ fyziologickým roztokem, centrifugována cca 2 min. při 3000 ot/min., supernatant byl slit na suchou kapku/koncentrát promytých erytrocytů). Vzorek nesrážlivé žilní krve byl centrifugován cca 2 min. při 3000 ot/min., aby byla oddělena plazma od erytrocytů.

Identifikace byla provedena pouze v tom testu, ve kterém byl zjištěn pozitivní screening protilátek.

Ze sedimentu promytých vyšetřovaných erytrocytů byl připraven náplav v ID Diluentu 2 následujícím způsobem: do 1 ml ID Diluentu 2 bylo napipetováno 10 μ l sedimentu promytých vyšetřovaných erytrocytů.

Dále byly označeny karty pro vlastní identifikaci. Pro identifikaci v NAT byly označeny karty LISS/Coombs (AGH polyspec.), pro identifikaci v ET byly označeny karty NaCl/enzymový a chladový test. Karty byly označeny identifikací pacienta, jednotlivé mikrozkušavky byly označeny čísly jednotlivých diagnostických erytrocytů panelu, též byla označena mikrozkušavka pro autokontrolu. Do mikrozkušavek bylo napipetováno dle označení 50 μ l příslušných diagnostických erytrocytů, a to: pro vyšetření v NAT erytrocyty panelu ID-DiaPanel, pro vyšetření v ET erytrocyty panelu ID-DiaPanel P. Do mikrozkušavek označených pro vyšetření autokontroly bylo napipetováno 50 μ l náplavu erytrocytů vyšetřovaného vzorku. Dále bylo do všech mikrozkušavek napipetováno po 25 μ l vyšetřovaného séra. Karty byly inkubovány 15 min. v inkubátoru DiaMed při 37 °C. Po inkubaci byly karty centrifugovány 10 min. v centrifuze DiaMed.

Doplňující panel Makropanel 16

Tento panel byl použit při nejednoznačném výsledku s panelem DiaMed. Vyšetření bylo provedeno podle informace uvedené na příbalovém letáku.

Nakonec byly odečteny (viz Obrázek 1 str. 39) a interpretovány výsledky. Interpretace byla provedena podle přiložené příbalové informace (Příloha 15 a 16). Byl určen klinický význam zjištěných protilátek. U klinicky významných protilátek byly vybrány TP bez odpovídajících antigenů. Klinická interpretace výsledků byla provedena lékařem.

3.3.5 Vyšetření fenotypu erytrocytů zkumavkovou metodou a metodou sloupcové (gelové) aglutinace (DiaMed)

Diagnostika a chemikálie (specifická pro jednotlivé antigenní systémy)

Ostatní potřeby (stejně jako u předchozích vyšetření)

Postup vyšetření jednotlivých skupinových systémů erytrocytů je různý. Při vyšetření skupinových systémů erytrocytů byl dodržen doporučený pracovní postup výrobce příslušného diagnostika. Hodnocení jednotlivých testů bylo provedeno v souladu s doporučeným postupem výrobce příslušného diagnostika.

3.3.6 Zkouška kompatibility metodou sloupcové (gelové) aglutinace

Potřeby (viz kapitola 3.3.3 Screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek metodou sloupcové (gelové) aglutinace DiaMed str. 37-38)

Vzorek „nesrážlivé“ žilní krve pacienta byl centrifugován cca 2 min. při 3000 ot/min. Tím byla oddělena plazma od erytrocytů. Vzorek TP byl promyt v nadbytku fyziologického roztoku (aglutinační zkumavka byla doplněna cca $\frac{3}{4}$ fyziologickým roztokem, centrifugován cca 2 min. při 3000 ot/min., supernatant byl slit na suchou kapku/koncentrát promytých erytrocytů), po promytí byl ze vzorku TP následujícím způsobem připraven náplav erytrocytů: do 1 ml ID Diluentu 2 bylo napipetováno 10 μ l sedimentu promytých erytrocytů (0,8% roztok). Stejným způsobem byly do označených zkumavek připraveny náplavy erytrocytů z pilotních zkumavek vybraných erytrocytárních přípravků.

Podle požadavku klinického oddělení byly k transfuzi vybrány vhodné erytrocytární přípravky.

Karty LISS/Coombs (AGH polyspec.) byly označeny číslem vzorku a mikrozkušavky příslušným číslem zvoleného TP. Do mikrozkušavek označených karet bylo napipetováno po 50 µl náplavu erytrocytů zvolených TP a 25 µl séra/plazmy pacienta. Dále byly karty inkubovány 15 min. v inkubátoru DiaMed při 37 °C a centrifugovány 10 min. v centrifuze DiaMed. Poté byly makroskopicky odečteny (Obrázek 1 str. 39) a následně zaznamenány výsledky.

Zkouška kompatibility představuje vyšetření reakce plazmy/séra příjemce a erytrocytů daného přípravku za účelem zjištění kompatibility (slučitelnosti) plazmy/séra příjemce a erytrocytů daného přípravku.

Negativní výsledek zkoušky kompatibility při negativním screeningu protilátek značí kompatibilitu daného TP pro příjemce.

Pozitivní výsledek zkoušky kompatibility znamená inkompatibilitu daného TP pro příjemce. Pokud je pozitivita zkoušky kompatibility způsobena klinicky významnou aloprotilátkou, je nutno vybrat k transfuzi krev bez příslušného antigenu. V přítomnosti autoprotiátek je pro výběr vhodného TP třeba použít další speciální imunohematologické metody.

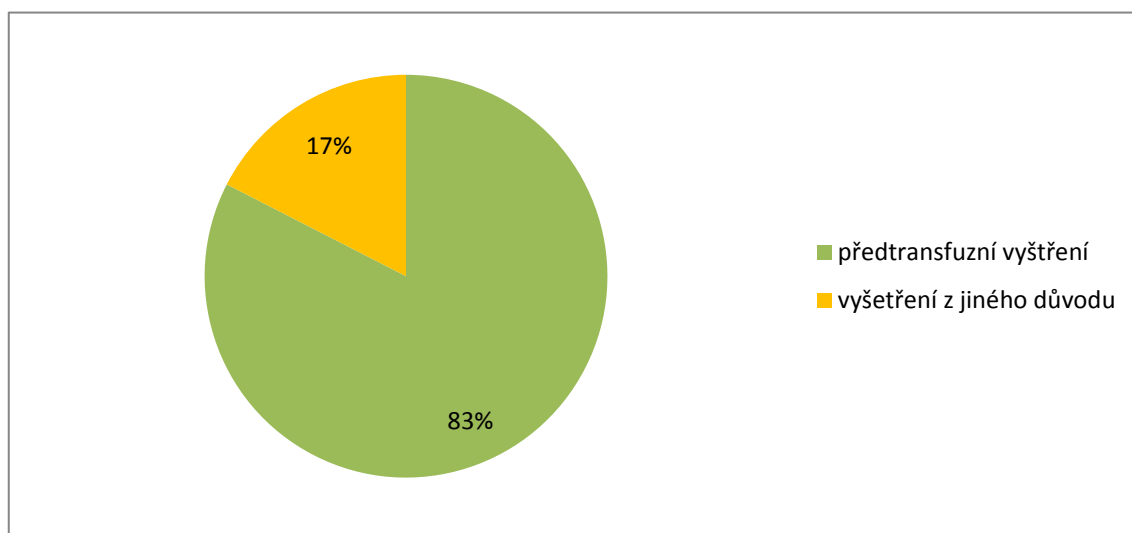
3.4 Postanalytická část

Postanalytická část byla provedena v souladu se SOP Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s.

4 Výsledky

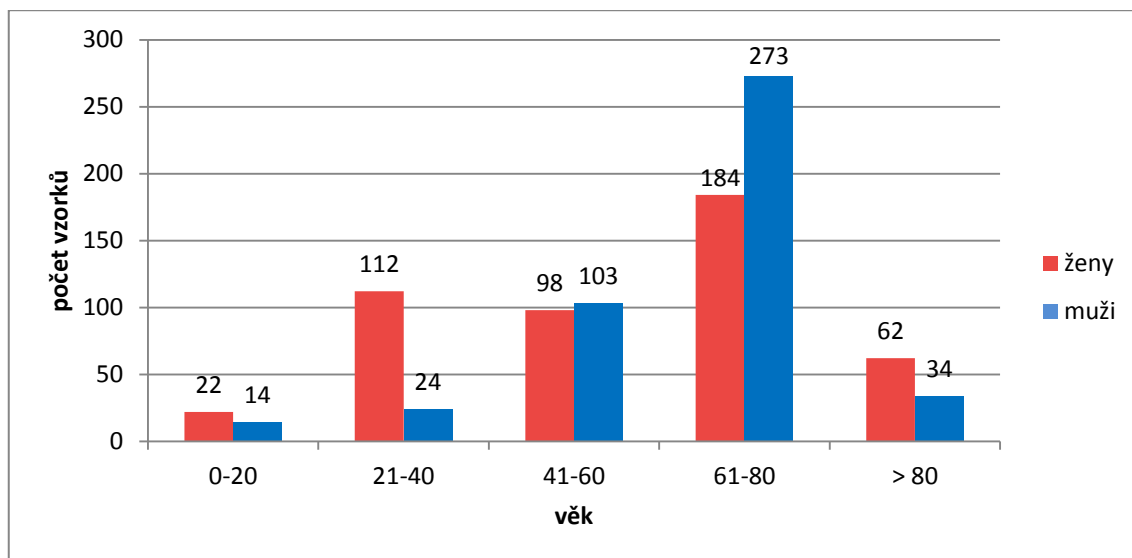
Během sledovaného období bylo vyšetřeno 1122 vzorků. Z těchto vzorků bylo u 926 (83 %) požadováno provedení předtransfuzního vyšetření (Graf 1). U nich bylo provedeno vyšetření krevní skupiny v ABO systému, Rh/D znak a screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek.

Graf 1: Příčiny vyšetření vzorků



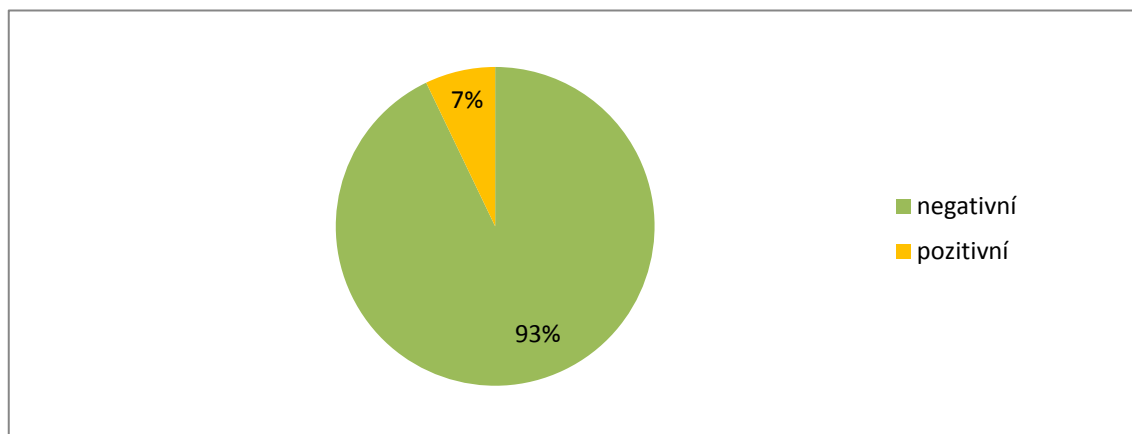
Od žen bylo 51,62 % a od mužů 48,38 % vzorků. Nejvíce vzorků pocházelo od pacientů ve věku 61-80 let (49,35 %) (Graf 2).

Graf 2: Rozložení vzorků s požadavkem na provedení předtransfuzního vyšetření podle pohlaví a věku pacientů



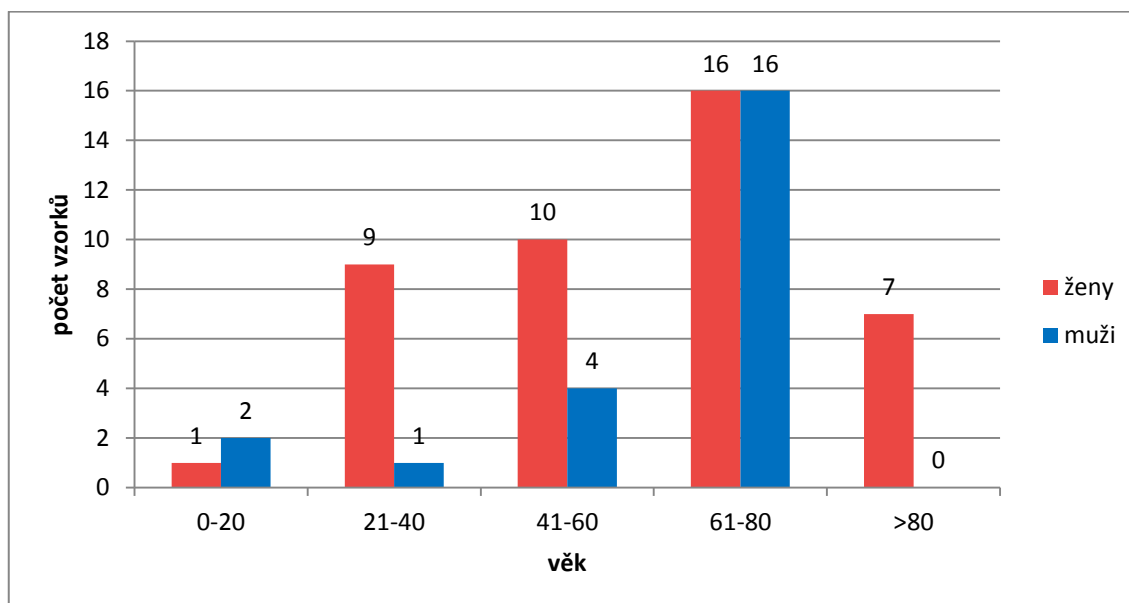
66 (7 %) vzorků bylo pozitivní na přítomnost protilátek (Graf 3).

Graf 3: Počet pozitivních a negativních vzorků vyšetřených screeningem protilátek



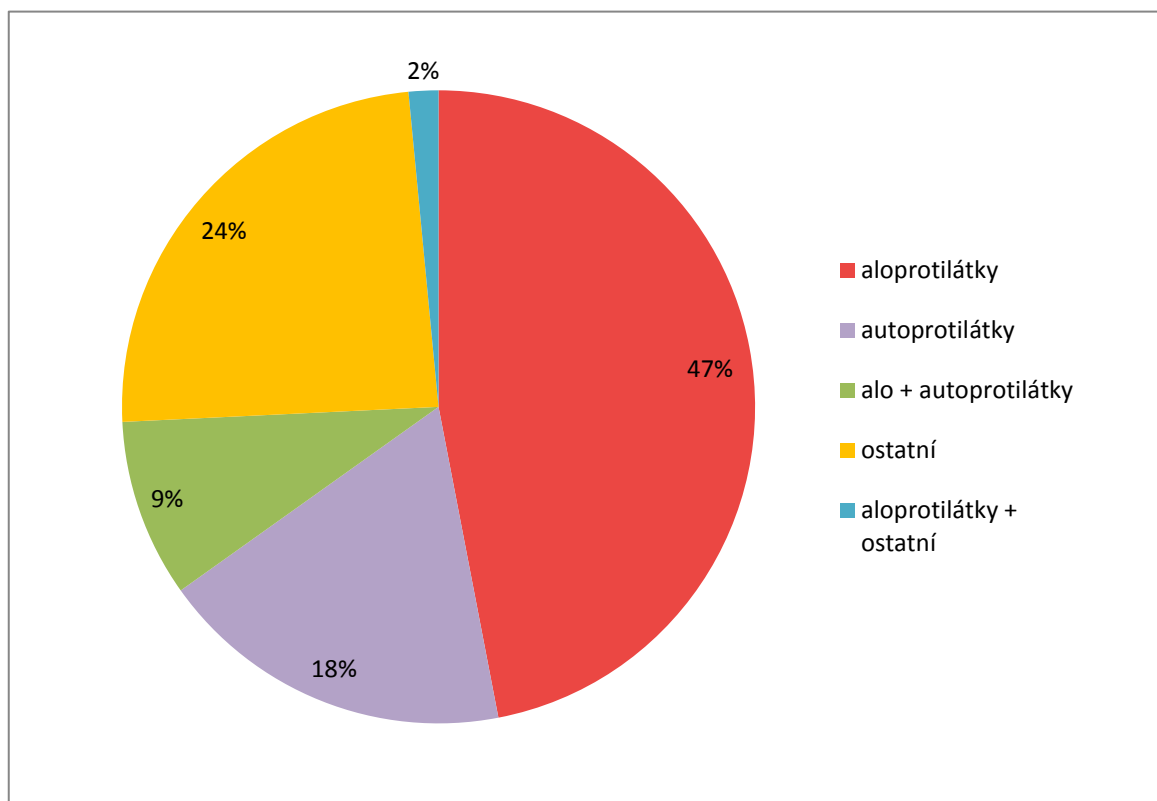
Od žen bylo 69,74 % a od mužů 30,26 % vzorků. Nejvíce vzorků pocházelo od pacientů ve věku 61-80 let (42,11 %) (Graf 4).

Graf 4: Rozložení pozitivních vzorků ve screeningu protilátek podle pohlaví a věku



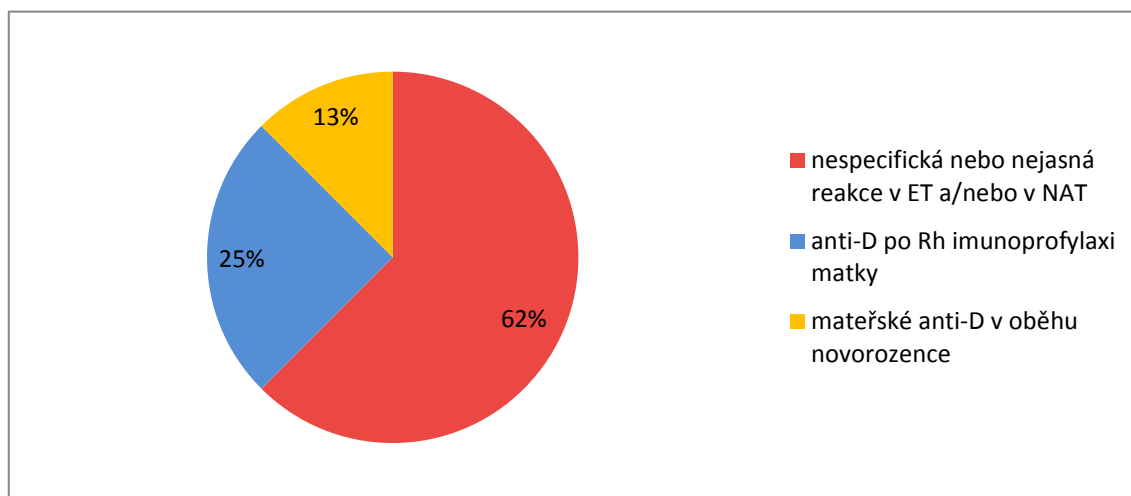
U těchto vzorků byla dále provedena identifikace přítomných protilátek, jejímž výsledkem bylo zjištění, že pouze aloprotilátky obsahovalo 31 (47 %) vzorků a pouze autoprotilátky obsahovalo 12 (18 %) vzorků. Kombinace alo a autoprotilátek byla nalezena u 6 (9 %) vzorků. V 1 (2 %) případě se vyskytla kombinace aloprotilátek a protilátek, které byly označeny jako „ostatní“ (Graf 5). Jak je z tohoto grafu patrné, aloprotilátky byly přítomny celkem u 38 (58 %) vzorků.

Graf 5: Rozdělení vzorků pozitivních ve screeningu protilátek podle jejich typu



Jak již bylo řečeno, ve vzorcích byly nalezeny pozitivní reakce, které byly označeny jako ostatní. Celkem bylo takových vzorků 17 (26 %). 16 (24 %) obsahovalo pouze „ostatní“ protilátky. Z tohoto množství 11 (65 %) vzorků reagovalo nespecifickou nebo nejasnou reakcí v ET a NAT, u 4 (23 %) byla přítomna protilátka anti-D získaná po Rh imunoprophylaxi matky a u 2 (12 %) vzorků byly přítomny mateřské anti-D v oběhu novorozence (Graf 6). V 1 vzorku (2 %) se nacházela kombinace nejasné reakce v ET a NAT s alopřilátkami.

Graf 6: Typy samostatných „ostatních“ protilátek



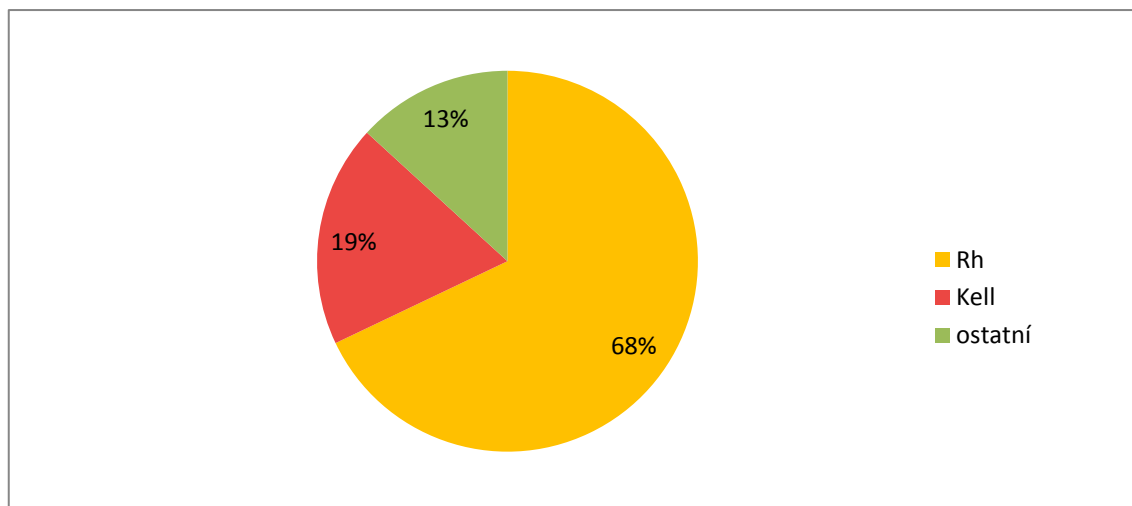
Celkem bylo identifikováno 52 aloprotilátek: anti-E (23,08 %) > anti-D, -C^W (13,46 %) > anti-c, -K, -Kp^a (9,62 %) > anti-C, -Wr^a, -Jk^a, -S, -e, -Fy^b, -P1 (Tabulka 7).

Tabulka 7: Specifita a frekvence výskytu aloprotilátek nalezených u 37 vzorků

Specifita aloprotilátky	Frekvence výskytu	
	počet	%
anti-E	12	23,08
anti-D	7	13,46
anti-C ^W	7	13,46
anti-c	5	9,62
anti-K	5	9,62
anti-Kp ^a	5	9,62
anti-C	4	7,69
anti-Wr ^a	2	3,85
anti-Jk ^a	1	1,92
anti-S	1	1,92
anti-e	1	1,92
anti-Fy ^b	1	1,92
anti-P1	1	1,92

Nejvíce nalezených aloprotilátek bylo ze systému Rh (68 %) a Kell (19 %) (Graf 7).

Graf 7: Zastoupení aloprotilátek v Rh, Kell a v ostatních systémech



Kombinace dvou aloprotilátek byla nalezena u 14 vzorků. Nejčastější byly kombinace aloprotilátek anti-C^W, anti-Kp^a (35,72 %) a anti-E, anti-c (14,29 %), tedy systémů Rh a Kell (Tabulka 8).

Tabulka 8: Specifita a frekvence výskytu aloprotilátek nalezených ve směsi

Kombinace aloprotilátek	Frekvence výskytu	
	počet	%
anti-C ^W , -Kp ^a	5	35,72
anti-E, -c	2	14,29
anti-E, -D	1	7,14
anti-E, -K	1	7,14
anti-E, -C ^W	1	7,14
anti-C, -K	1	7,14
anti-C, -D	1	7,14
anti-C ^W , -Wr ^a	1	7,14
anti-K, -Jk ^a	1	7,14

5 Diskuze

Tato práce byla provedena ke zjištění frekvence výskytu aloprotilátek proti antigenům erytrocytů u vzorků od pacientů z Nemocnice České Budějovice, a.s. Během sledovaného období bylo 7 % vzorků pozitivních na přítomnost protilátek. Podobné údaje o počtech pozitivních vzorků uvádějí i další autoři. Jsou to např. Reedman et al. (1996), který protilátky nachází u 10,8 % vyšetřených vzorků⁽⁴²⁾ a de Oliveira Cruz et al. (2011), kterému se můj výsledek blíží více, ten uvádí 7,5 %⁽²⁹⁾.

Od žen pocházelo více než 50 % vzorků pozitivních na výskyt protilátek a také aloprotilátky u nich převažují a to v poměru 2,3 : 1. Verduin et al. provedli v roce 2012 detailní rozbor literatury (z let 1950-2011) o erytrocytární aloimunizaci, na jejímž základě navrhli ženské pohlaví jako rizikový faktor aloimunizace po transfuzi. Uvádějí, že mimo jiné může častější výskyt protilátek u žen způsobit imunizace vzniklá vlivem těhotenství⁽⁴³⁾. Stejný údaj ve své práci uvádí i Rosse et al. (1990)⁽⁴⁴⁾. Ze získaných výsledků rovněž vyplývá, že počet imunizovaných pacientů roste úměrně věku. Toto souvisí s tím, že u žen s věkem roste počet těhotenství (s každým dalším těhotenstvím se zvyšuje pravděpodobnost imunizace), dále přibývá množství úrazů, operací a transfuzí a s vyšším věkem se také vyskytuje více chronických a zvyšuje se počet prodělaných infekčních onemocnění.

Z celkového počtu vzorků pozitivních na přítomnost protilátek obsahovalo 58 % aloprotilátky (samotné anebo v kombinaci s auto nebo „ostatními“ protilátkami). K podobnému výsledku 47 % (u dospělých) ve své práci o aloimunizaci u pacientů se srpkovitou anémií dospěl i Aygun et al. (2002)⁽⁴⁵⁾. V roce 2011 byla v Indii provedena studie o výskytu aloprotilátek u pacientů s thalasemií. Aloprotilátky byly přítomny u 9,48 % těchto pacientů⁽⁴⁶⁾.

Nejvíce nalezených aloprotilátek pocházelo ze systému Rh (68 %) a Kell (19 %). Ke stejnému závěru, tedy že nejčastěji aloprotilátky vznikají proti antigenům Rh a Kell systému, ve své práci o aloimunizaci u pacientů se srpkovitou anémií dospěl i Roose et al. (1990)⁽⁴⁴⁾ a Narol et al. (1994)⁽⁴⁷⁾. Toto zjištění odpovídá frekvenci výskytu antigenů těchto systémů⁽²¹⁾ a také jejich vysoké imunogenicitě^(29,30,31).

Z celkového počtu 52 identifikovaných aloprotilátek bylo nejvíce typu anti-E (23,08 %) dále anti-D, -C^W (13,46 %) a anti-c, -K, -Kp^a (9,62 %). K podobným výsledkům dospěl ve své práci i de Oliveira Cruz et al. (2011) ⁽²⁹⁾. Výjimkou ve frekvenci výskytu je anti-C^W a anti-Kp^a, které jsou v jeho práci významně nižší. Častý výskyt anti-C^W a anti Kp^a je v mé práci způsoben jednou 5x ve stejném období vyšetřenou pacientkou, u které se tyto obě dvě tyto protilátky vyskytují.

Nejčastější kombinace tvoří aloprotilátky Rh a/nebo Kell systému ⁽²⁰⁾. S tímto se shodují i mé výsledky. Protilátky, které jsem v kombinaci objevila, jsou nejčastěji anti-C^W s anti-Kp^a (35,72 %). Jedná se ale o již zmíněnou pacientku, která byla vyšetřována vícekrát ve sledovaném období. Z tohoto důvodu nemá přítomnost těchto protilátek statistický význam. Druhou nejčastější kombinací je anti-E s anti-c (14,29 %), které obě patří do Rh systému.

Pro porovnání frekvence vzácnějších protilátek byl hodnocen příliš malý počet vzorků. Z tohoto důvodu nebylo možné zachytit statisticky významné množství těchto vzácných protilátek. Z celkového počtu zjištěných protilátek byly zachyceny dvě aloprotilátky anti-Wr^a. Tato přirozená protilátka se tvoří proti antigenu o nízké frekvenci. Její záchyt lze vysvětlit tím, že laboratoř v Nemocnici České Budějovice, a.s. se věnuje záchytu této protilátky u těhotných a u nemocných s projevy autoimunity proti erytrocytům.

6 Závěr

Výsledky práce potvrzují, že podání TP obsahujícího erythrocyty může u příjemce transfuze vyvolat tvorbu nepravidelných protilátek proti erythrocytárním antigenům. V tomto ohledu jsou nejvíce riziková polytransfundovaná pacienta a ženy ve fertilním věku.

U pacientů s transfuzí erythrocytů v anamnéze byly v Nemocnici České Budějovice, a.s. zjištěny tyto klinicky významné protilátky: anti-E, -D, -C^W, -c, -K, -Kp^a, -C, -Wr^a, -Jk^a, -S, -e, -Fy^b, -P1 ve frekvencích viz výsledky (Tabulka 7).

Vzhledem k tomu, že daleko nejčastějšími aloprotilátkami v mém výzkumu i v literatuře jsou protilátky namířené proti antigenům systémů Rh a Kell, se jako ideální postup ke snížení frekvence aloimunizace jeví výběr erythrocytových přípravků podle Rh-Kell fenotypu. Tento postup by měl velký klinický význam zejména u žen ve fertilním věku a u pacientů dlouhodobě odkázaných na transfuze erythrocytů.

Z praxe imunohematologické laboratoře v Nemocnici České Budějovice, a.s. je zřejmé, že není problémem zajistit transfuzi u pacientů s výskytem protilátky proti antigenu s nízkou a střední frekvencí v populaci.

Zvláštní pozornost je však třeba věnovat i situaci, kdy je zjištěna protilátka proti antigenu s vysokou frekvencí v populaci. V mém výzkumu jsem vzhledem k jejich vzácnosti žádnou takovou protilátku nezachytila. Pro výběr kompatibilních TP pro pacienty s protilátkami proti antigenům s vysokou frekvencí je důležité udržování a aktualizace národního registru vzácných krevních skupin s napojením na mezinárodní registry.

Z výsledků mé práce i z dostupné literatury vyplývá mimořádný klinický význam správně provedeného předtransfuzního vyšetření a vyhodnocení klinického významu pozitivního nálezu protilátek. Správně provedené předtransfuzní vyšetření se všemi doplňujícími vyšetřeními je předpokladem pro výběr bezpečného kompatibilního TP obsahujícího erythrocyty.

7 Seznam použitých zdrojů

- 1 KNOWLES, S., POOLE, G. Blood transfusion in hospitals. In: MURPHY, M. F., PAMPHILON, D. H. *Practical Transfusion Medicine*. Second edition. Oxford: Blackwell Publishing, 2005, s. 290-297. Dostupné z: <<http://www.scribd.com/doc/34622155/Practical-Transfusion-Medicine-2nd-Ed>>.
- 2 TESAŘOVÁ, E. et al. *Imunohematologie a transfuzní služba*. 2. Vydání. Brno: Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, 2008, s. 24-26, s. 39-49, s. 80-85.
- 3 WHITE, J. Pre-transfusion testing. *ISBT Science Series*. 2009; 4(1): 37-44.
- 4 Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_07 ze dne 1. 3. 2011. *Základní imunohematologické laboratorní vyšetření červené řady – Obecné zásady a technické postupy*. Dostupné z: <<http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>>.
- 5 Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_08 ze dne 1. 3. 2011. *Předtransfuzní laboratorní vyšetření*. Dostupné z: <<http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>>.
- 6 LIEB, M. A., ALDRIDGE, L. Compatibility testing. In: RUDMANN S. V. *Blood Banking and Transfusion Medicine*. 2nd edition. Philadelphia: Elsevier saunders, 2005, s. 293-294.
- 7 HRUBIŠKO, M. et al. *Hematologie a krevní transfuze II: Krevní transfúze*. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1983, s. 82-118.
- 8 Canadian Blood Services [online]. 2009 – 2012 [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: <<http://www.transfusionmedicine.ca/resources/books/vein-vein/pretransfusion/compatibility-testing/antibody-detection-crossmatch/antihum>>.
- 9 MC CULLOUGH, J. *Transfusion Medicine*. Second edition. Philadelphia: Elsevier churchill livingstone, 2005, s. 224-225.

- 10 Identifikace produktu: 05751. ID-Diluent 1 – Modifikovaný roztok bromelinu pro stanovení revních skupin a pro enzymatické testy.
- 11 COOMBS, R. R. Historical note: past, present and future of the antiglobulin test. *Vox Sang.* 1998; 74(2): 67-73.
- 12 DAS, S. S., CHAUDHARY, R., KHETAN, D. A comparison of conventional tube test and gel technique in evaluation of direct antiglobulin test. *Hematology.* 2007; 12(2): 175-178.
- 13 LIUMBRUNO, G. M., TOGNACCINI, A., BONINI, R., CURCIARELLO, G., MASINI, I., RINGRESSI, A., TORNEABENE, F., VANCORE, R. The role of the direct antiglobulin test in pre-transfusion investigations and the approach to selecting blood for transfusion in autoimmune haemolytic anaemia: results of a regional survey. *Blood Transfus.* 2008; 6(3): 156-162.
- 14 Lab Test Online [online]. 3.3.2010 [cit. 2011-11-1]. Dostupné z: <<http://www.labtestonline.cz/>>.
- 15 ZARADONA, J. M., YAZER, M. H. The role of the Coombs test in evaluating hemolysis in adults. *CMAJ.* 2006; 174(3): 305-307.
- 16 DELAFLOR-WEISS, E., CHIZHEVSKY, V. Implementation of Gel Testing for Antibody Screening and Identification in a Community Hospital, a 3-Year Experience. *Labmedicine.* 2005; 36(8): 489-492.
- 17 RUMSEY, D. H., CIESIELSKI, D. J. New protocols in serologic testing: a review of techniques to meet today's challenges. *Immunohematology.* 2000; 16(4): 131-137.
- 18 LAPIERRE, Y., RIGAL, D., ADAM, J., JOSEF, D., MEYER, F., GREBER, S., DROT, C. The gel test: A new way to detect red cells antigen - antibody reactions. *Transfusion* 1990; 30(2): 109-113.

- 19 SWARUP, D., DHOT, P. S., KOTWAL, J., VERMA, A. K. Comparative Study of Blood Cross Matching Using Conventional Tube and Gel Method. *MJAFI*. 2008; 64(2): 129-130.
- 20 DANIELS, G. *Human Blood Groups*. Oxford: Blackwell Science, 1995, s. 77-447.
- 21 DEAN, L. *Blood Groups and Red Cell Antigens*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2005. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/>>.
- 22 DANIELS, G. Human blood group systems. In: MURPHY, M. F., PAMPHILON, D. H. *Practical Transfusion Medicine*. 2nd edition. Oxford: Blackwell Publishing, 2005, s. 24-33. Dostupné z: <<http://www.scribd.com/doc/34622155/Practical-Transfusion-Medicine-2nd-Ed>>.
- 23 KUČERÁKOVÁ, M., LAURINCOVÁ, M., MACHÁČOVÁ, A. *Skupinový systém Kell a Kx* [online]. 28.1.2011 [cit. 2012-03-16]. Dostupné z: <www.hematology.sk/docs/Kell_Kx.pdf>.
- 24 DANIELS, G. a BROMILOW, I. *Essential Guide to Blood Groups*. 2nd edition. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010, 128 s.
- 25 WAGNER, T., RESCH, B., REITERER, F., GASSNER, C., LANZER, G. Pancytopenia due to suppressed hematopoiesis in a case of fatal hemolytic disease of the newborn associated with anti-K supported by molecular K1 typing. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004; 26(1): 13-15.
- 26 REID, M. E., LOMAS-FRANCIS, C. *The Blood Group Antigen Facts Book*. Second edition. New York: Elsevier Academic Press, 2004, 584 s. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780125865852>>.
- 27 COLIN, Y., CARTRON, J. P. Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfus Clin et Biol*. 2001; 8(3): 163–199.

- 28 PÍSAČKA, M. Ústní sdělení na Pracovním dnu STL s tématem imunohematologie, Praha, 30.10.2008.
- 29 DE OLIVEIRA CRUZ, R., MOTA, M. A., CONTI, F. M., D'ALMEIDA PEREIRA, R. A., KUTNER, J. M., ARAVECHIA, M. G., CASTILHO, L. Prevalence of erythrocyte alloimmunization in polytransfused patients. *Einstein*. 2011; 9(2): 173-178.
- 30 SCHONEWILLE, H., VAN DE WATERING, L. M., LOOMANS, D. S., BRAND, A. Red blood cell alloantibodies after transfusion: factors influencing incidence and specificity. *Transfusion*. 2006; 46(2): 250-256.
- 31 TORMEY, C. A., STACK, G. The persistence and evanescence of blood group alloantibodies in men. *Transfusion*. 2009; 49(3): 505-512.
- 32 SCHONEWILLE, H., VAN DE WATERING, L. M., BRAND, A. Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic alloimmunized patient cohort: is it time to take precautionary measures? *Transfusion*. 2006; 46(4): 630-635.
- 33 BADJIE, K. S. W., TAUSCHER, C., VAN BUSKIRK, C., WONG, C., JENKINS, S., SMITH, C., STUBBS, J. R. Red blood cell phenotype matching for various ethnic groups. *Immunohematology*. 2011; 27(1): 12-19.
- 34 COOLING, L. Mining the possibilities behind RBC alloimmunization. *Blood*. 2008; 112(6): 2180-2181.
- 35 RABEYA, Y., AZIZ, S. A., NURASYIKIN, Y., LEONG, C. H. Hemolytic disease of the fetus and newborn caused by anti-D and anti-S alloantibodies: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2012; 6(1): 71.
- 36 KUMPEL, B. M. Lessons learnt from many years of experience using anti-D in humans for prevention of RhD immunization and haemolytic disease of the fetus and newborn. *Clin Exp Immunol*. 2008; 154(1): 1-5.

- 37 LUBUSKY, M. Prevention of RhD alloimmunization in RhD negative women. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010; 154(1): 3-8.
- 38 LUBUŠKÝ, M. Kell aloimmunizace matky může vést k rozvoji anémie plodu. *Gynekologie po promoci.* 2009; 9(1): 24-31.
- 39 YOUSUF, R., ABDUL AZIZ, S., YUSOF, N., LEONG, C. F. Hemolytic disease of the fetus and newborn caused by anti-D and anti-S alloantibodies: a case report. *J Med Case Reports.* 2012; 6(1): 71.
- 40 SANTOS, F. W. R., MAGALHÃES, S. M. M., MOTA, R. M. S., PITOMBEIRA, M. H. Post-transfusion red cell alloimmunisation in patients with acute disorders and medical emergencies. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2007; 29(4): 369-372.
- 41 CHAUDHARI, S. C. C. N. Red Cell Alloantibodies in Multiple Transfused Thalassaemia Patients. *MJAFI.* 2011; 67(1): 34-37.
- 42 REDMAN, M., REGAN, F., CONTRERAS, M. A prospective Study of the Incidence of Red Cell Allo-Immunisation following Transfusion. *Vox Sanguinis.* 1996; 71(4): 216-220.
- 43 VERDUIN, E. P., BRAND, A., SCHONEWILLE, H. *Is Female Sex a Risk Factor for Red Blood Cell Alloimmunization After Transfusion? A systematic Review* [online]. 2012 [cit. 2012-04-04]. Dostupné z: <<http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/22244869>>.
- 44 ROSSE, W. F., GALLAGHER, D., KINNEY, T. R., CASTRO, O., DOSIK, H., MOOHR, J., WANG, W., LEVY, P. S. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood.* 1990; 76: 1431-1437.
- 45 AYGUN, B., PADMANABHAN, S., PALEY, C., CHANDRASEKARAN, V. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. *Transfusion.* 2002; 42(1): 37-43.

- 46 GUPTA, R., SINGH, D. K., SINGH, B., RUSIA, U. Alloimmunization to red cells in thalassemics: emergency problém and future strategies. *Official Journal of the European Society for Hemapheresis*. 2011; 45(2): 167-170.
- 47 NAROL, F., NADJAH, J., BACHIR, D., DESAINT, C., GUILLOU BATAILLE, M., BEAUJEANM F., BIELING, P., BONIN, P., GALACTEROS, F., DUEDARI, N. Transfusion and alloimmunization in sickle cell anemia patients. *Journal de la Societe Francaise de Transfusion Sanguine*. 1994; 1(1): 27-34.
- 48 SelectScience® [online]. 2012 [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: <<http://www.selectscience.net/products/invitrogel-test-system/?prodID=113400>>.
- 49 WILKINSON, S. L. Secretor and Soluble ABH Antigens, The Lewis, I, P, and Globoside Blood Group Systems. In: RUDMANN, S. V. *Blood Banking and Transfusion Medicine*. 2nd edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005, s. 88.

8 Klíčová slova

aglutinační testy

aloimunizace

aloprotilátky

antigen

klinicky významné protilátky

nepřímý antiglobulinový test

předtransfuzní vyšetření

přímý antiglobulinový test

9 Přílohy

Příloha 1: Příklady žádanky o TP

Zkumavku se sraženou krví (5 ml) opatřete zátkou s nálepkou s čitelným jménem

Oddělení	ŽÁDANKA O ISOSEROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ A O TRANSFÚZNÍ PŘÍPRAVKY rodné číslo: č. pojišťovny: Jméno nar. kr. sk. Diagnóza: č. chor. Počet předchozích transf. porodů potratů Reakce po transfúzích: Imunní protilátky nezjištěny - zjištěny (kdy, jaké):
Žádáme o vyšetření: krev. skup., kříž. zkoušky imunních protilátek:	dodání krve, erytrocyt. masy, plazmy: na den hodinu
Zaškrtněte, oč žádáte Datum: DITIS-114-731/0	Podpis a razítko lékaře: Dodává DITIS, s. r. o., PS 31, Plickova 976, 562 06 Ústí nad Orlicí, tel.: 0465/524 027, fax + záznam: 0465/525 701

Laboratoř	Jméno:									
	Došlo dne: Č. vyš.:									
Krevní skupina:	Výsledek imunohematol. vyšetření									
Křížová zkouška:	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">kons. č.</td> <td style="width: 33%;">kons. č.</td> <td style="width: 33%;">kons. č.</td> </tr> <tr> <td>skup. ml.</td> <td>skup. ml.</td> <td>skup. ml.</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">kompatibilní</td> </tr> </table>	kons. č.	kons. č.	kons. č.	skup. ml.	skup. ml.	skup. ml.	kompatibilní		
kons. č.	kons. č.	kons. č.								
skup. ml.	skup. ml.	skup. ml.								
kompatibilní										
Vydáno:	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>dne hod.</td> <td>dne hod.</td> <td>dne hod.</td> </tr> </table>	dne hod.	dne hod.	dne hod.						
dne hod.	dne hod.	dne hod.								
Transfudováno:	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>dne ml.</td> <td>dne ml.</td> <td>dne ml.</td> </tr> <tr> <td>od do hod.</td> <td>od do hod.</td> <td>od do hod.</td> </tr> </table>	dne ml.	dne ml.	dne ml.	od do hod.	od do hod.	od do hod.			
dne ml.	dne ml.	dne ml.								
od do hod.	od do hod.	od do hod.								
Zajišťovací zkouška										
Biol. zkouška										
Komplikace										
Lab. vyšetření provedl: (podpis a razítko)	Transfúzi provedl: (podpis a razítko)									

Založit do chorobopisu

Zdroj: Transfúzní oddělení Nemocnice Kolín



Fakultní transfuzní oddělení VFN v Praze
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

ŽÁDANKA O TRANSFUZNÍ PŘÍPRAVKU A ZÁKLADNÍ IMUNHEMATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

PŘÍJMENÍ	NÁZEV ODDELENÍ			Vypíšíte laboratoř
JMÉNO	NÁKL. STŘEDISKO	RAZÍTKO ODDELENÍ		POZNÁMKA LABORATOŘE DATUM A ČAS PRŮJMU DO LAB. PŘEZKOUMÁNÍ ŽÁDANKY – PODPIS
ČÍS. POJIŠTĚNCE	TELEFONNÍ KONTAKT	JMÉNO A PODPIS LÉKAŘE		
POJIŠTOVNA	ODBĚR (DATUM, ČAS)			
DIAGNÓZA (čís. kód)	ODEBÍRAJÍCÍ SESTRA			

Požadované vzorky: nesrážlivá žilní krev odebraná do EDTA – fialový vacutainer 5 - 7 ml. V případě vyšetření novorozence: nesrážlivá žilní krev odebraná do EDTA – fialový vacutainer – minimálně 1ml.
 Pokyny pro odběr naleznete na webových stránkách <http://laboratoř.vfn.cz>

Požadavky na transfuzní přípravky		Množství	Další volby		Ozáření
Požadovaný druh TP			deleukotizované (případně ery + filtr)	pro výměnnou transfuzi	
ERYTROCYTY <small>Rezerva a výdej maximálně 72 hodin od odběru vzorku</small>		TU	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PLAZMA <small>Musí být vyšetřena krevní skupina.</small>		<input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> ml	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
TROMBOCYTY DELEUKOTIZOVANÉ <small>(případně trombo + filtr) Musí být vyšetřena krevní skupina. Rezerva max. 24h od přijetí požadavku.</small>		TD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Požadovaný výdej	<input type="checkbox"/> na datum: (plánované podání) <input type="checkbox"/> rezerva <input type="checkbox"/> statim (vydání do 120 min. po přijetí požadavku) <input type="checkbox"/> vitální indikace (vydání do 20 min. po přijetí požadavku)				
Transfuzní anamnéza	neznámá	Předchozí transfuze NE <input type="checkbox"/> ANO <input type="checkbox"/> Nepravdivé protilátky NE <input type="checkbox"/> ANO <input type="checkbox"/> jaké: Potransfuzní reakce NE <input type="checkbox"/> ANO <input type="checkbox"/> jaké:			
	<input type="checkbox"/>				

Základní imunohematologická vyšetření

Krevní skupina nebo opis krevní skupiny	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Screening antierycytmárních protilátek (nepřímý antiglobulinový test – NAT)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PAT (přímý antiglobulinový test)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Identifikace antierycytmárních protilátek	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vyšetření chladových aglutinínů	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vyšetření jednotlivých erytrocytmárních antigenů	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Poznámky laboratoře:

Zdroj: Fakultní transfuzní oddělení VFN v Praze

Příloha 2: Náležitosti žádanky o TP

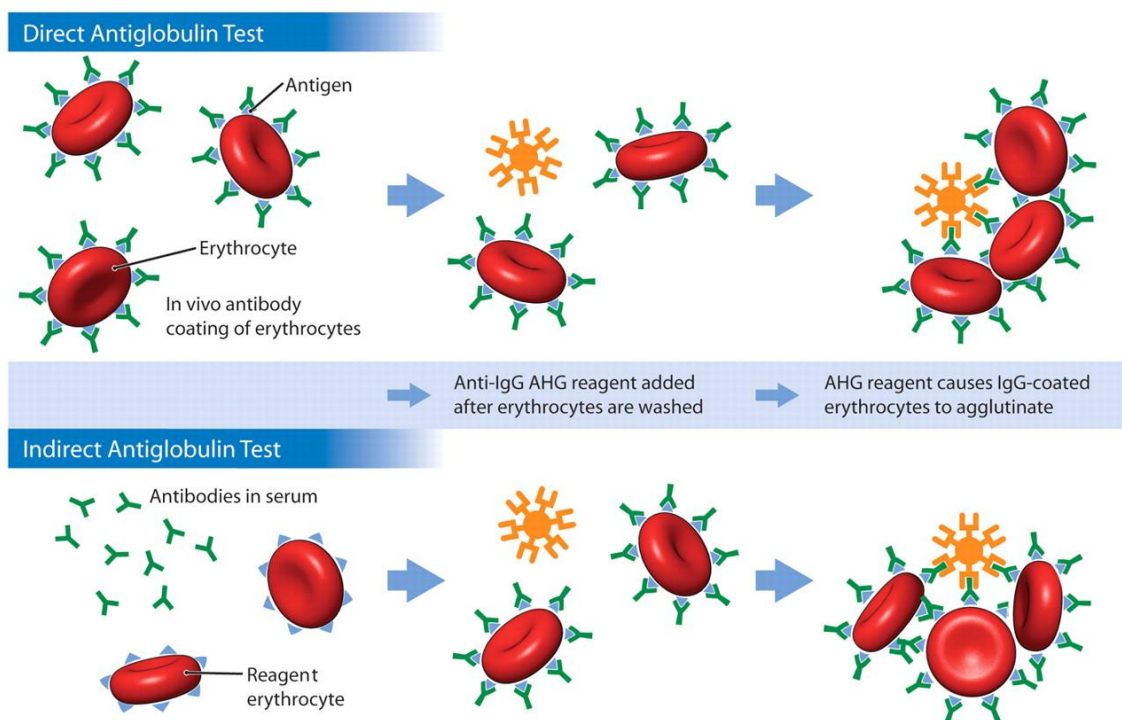
- identifikační údaje poskytovatele: **název** poskytovatele, jeho identifikační číslo, pokud bylo přiděleno, název oddělení,
- **jméno**, případně jména, příjmení, **identifikační číslo pacienta-pojištěnce**, rodné číslo plánovaného příjemce transfuzního přípravku (pokud se shoduje s identifikačním číslem pojištěnce) nebo datum narození; v případě, že nejsou potřebné údaje známy, uvede se údaj jednoznačně identifikující plánovaného příjemce (vhodný je údaj o pohlaví a pravděpodobném věku),
- identifikační číslo **zdravotní pojišťovny** (*nejedná-li se o cizince a další bez pojištění*),
- **důvod** podání transfuzního přípravku nebo **diagnózu** pacienta,
- **krevní skupinu** (AB0 a RhD), pokud byla vyšetřena, informaci o **dříve zjištěných protilátkách** (uvést specifitu),
- transfuzní / imunohematologickou **anamnézu** obsahující předchozí transfuze, porody, těhotenství, potransfuzní reakce, hemolytické onemocnění novorozence, případný výskyt imunohematologických komplikací v rodině a podobně,
- **druh** jmenovitě uvedeného transfuzního přípravku, počet kusů, transfuzních jednotek nebo terapeutických dávek,
- **naléhavost** požadavku (vitální – statim – standard den a hodinu podání),
- případné požadavky na další úpravu transfuzního přípravku (deleukotizace, ozáření, CMV-negativita, apod.),
- **datum** vystavení,
- jméno, případně jména, příjmení a podpis **lékaře**, který požaduje transfuzní přípravek,
- jméno a podpis sestry, která odebrala krevní vzorek ⁽⁵⁾.

Příloha 3: Klinická závažnost protilátek proti erytrocytům

Specifita	Klinická závažnost	Výběr transfuzního přípravku
anti-A, anti-B	vždy ano	AB0 kompatibilní
Rh protilátky (reagující v NAT) anti-D, -C, -c, -E, -e	ano	negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
anti-C ^w		negativní test kompatibility ve směsi s jinou protilátkou negativní pro daný antigen
Kell protilátky (anti-K, -k)	ano	negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
anti-Kp ^a	vzácně	negativní test kompatibility ve směsi s jinou protilátkou negativní pro daný antigen
Duffy protilátky (anti-Fy ^a , -Fy ^b)	ano	negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
Kidd protilátky (anti-Jk ^a , -Jk ^b)	ano	negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
anti-S, -s, -U	ano	negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
anti-A ₁ , -P ₁ , -N	vzácně	negativní test kompatibility
anti-M (nereagující při 37 °C)	vzácně	negativní test kompatibility
anti-M (reagující při 37 °C)	někdy ano	negativní pro daný antigen a negativní test kompatibility
anti-Le ^a , -Le ^{a+b}	vzácně	negativní test kompatibility
anti-Le ^b	ne	lze ignorovat
anti-Lu ^a	vzácně	negativní test kompatibility
protilátky s vysokým titrem a nízkou aviditou (HTLA)	nepravděpodobná	podle doporučení specializované či referenční laboratoře
protilátky proti antigenům s nízkou/vysokou frekvencí	podle specifity	podle doporučení specializované či referenční laboratoře

Zdroj: doporučení č. STL2011_08⁽⁵⁾

Příloha 4: Znázornění přímého a nepřímého antiglobulinového testu



Zdroj: Zaradona, J. M., Yazer, M. H. (2006) ⁽¹⁵⁾

<http://www.cmaj.ca/content/174/3/305/F1.expansion.html>

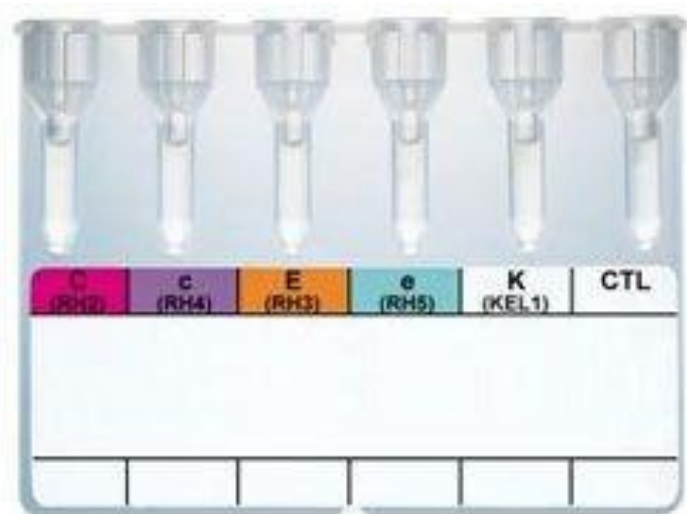
Příloha 5: Mikrozkmavka používaná k provedení gelového testu



Zdroj: Delaflor-Weiss, E., Chizhevsky, V. (2005) ⁽¹⁶⁾

<http://www.medscape.com/viewarticle/509092>

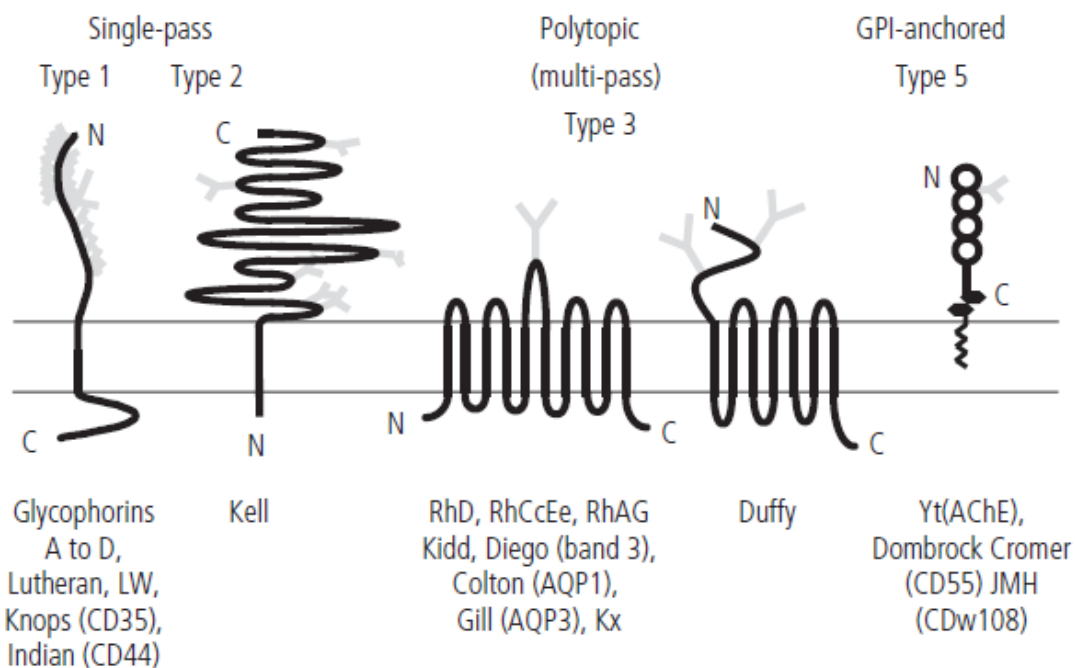
Příloha 6: Karta s mikrozkuvkami k provedení sloupcové (gelové) aglutinace



Zdroj: SelectScience®⁽⁴⁷⁾

<http://www.selectscience.net/products/invitro-gel-test-system/?prodID=113400>

Příloha 7: Schematické znázornění druhů glykoproteinů na membráně eryocytů



Zdroj: Daniels, G. (2005)⁽²²⁾

<http://www.scribd.com/doc/34622155/Practical-Transfusion-Medicine-2nd-Ed>

Příloha 8: Frekvence výskytu antigenů Duffy

Antigen	%		
	běloši	černoši	Asiaté
Fy ^a	66	10	99
Fy ^b	83	23	18,5
Fy3	100	32	99,9

Zdroj: Reid, M. E., Lomas-Francis, C. (2004)⁽²⁶⁾

Příloha 9: Frekvence výskytu antigenů Lewis

Antigen	%		
	běloši	černoši	Asiaté
Le ^a	22	23	-
Le ^b	72	55	-
Le ⁰	6	22	-

Zdroj: Wilkinson, S. L. (2005)⁽⁴⁸⁾

Příloha 10: Frekvence výskytu antigenů Kidd

Antigen	%		
	běloši	černoši	Asiaté
Jk ^a	77	92	73
Jk ^b	74	49	76
Jk3	100	-	-

Zdroj: Reid, M. E., Lomas-Francis, C. (2004)⁽²⁶⁾

Příloha 11: Frekvence výskytu antigenů Kell

Antigen	%		
	běloši	černoši	Asiaté
K ⁽²⁴⁾	9	1,5	vzácný
k ⁽²⁴⁾	vysoká frekvence ve všech populacích (99,8)		
Kp ^{a(24)}	2	0	0
Kp ^{b(23)}	vysoká frekvence ve všech populacích (99,9)		
Js ^{a(23)}	< 0,01	19,5	-
Js ^{b(23)}	vysoká frekvence ve všech populacích (99,9)		

Zdroj: Daniels, G., Bromilow, I. (2010)⁽²⁴⁾; Kučeráková et al. (2011)⁽²³⁾

Příloha 12: Frekvence výskytu antigenů Rh

Antigen	%		
	běloši	černoši	Asiaté
D	85	92	99
C	68	27	93
E	29	22	39
c	80	96	47
e	98	98	96

Zdroj: Reid, M. E., Lomas-Francis, C. (2004)⁽²⁶⁾

Příloha 13: Frekvence výskytu antigenů MNSs

Antigen	%		
	běloši	černoši	Asiaté
M	78	74	-
N	72	75	-
S	55	31	-
s	89	93	-

Zdroj: Reid, M. E., Lomas-Francis, C. (2004)⁽²⁶⁾

Příloha 14: Výčet a zásady výběru odpovídajících erytrocytových přípravků

PŘÍJEMCE	ERYTROCYTOVÝ TRANSFUZNÍ PŘÍPRAVEK
Dívky a ženy ve fertilním věku (do 50 let)	Kell kompatibilní
<i>Vhodné vyšetřit Rh-Kell fenotyp²</i>	optimálně shodný v negativních znacích (je-li znám Rh-Kell fenotyp příjemce)
RhD negativní	ccee (RhD negativní) kromě příjemců s prokázanou pozitivitou antigenu C nebo E)
Pacienti závislí na transfuzích erytrocytů (thalasemie, srpkovitá anémie, chronické hematologické poruchy)	Kell kompatibilní
<i>Vyšetřit Rh-Kell fenotyp²</i>	optimálně Rh fenotyp shodný s příjemcem v negativních znacích ²
<i>Vhodné je před zahájením hemoterapie stanovit fenotyp i v dalších klinicky významných krevně-skupinových systémech (jako Duffy, Kidd, MNSs apod.).</i>	
Pacient s klinicky významnou specifickou aloprotilátkou (i v anamnéze)	bez odpovídajících antigenů + optimálně u anti-E bez Ag „c“; u anti-c bez Ag „E“; u anti-D bez Ag „C“ (zvažovat podle Rh fenotypu příjemce)
	Kell negativní ¹
<i>Vyšetřit Rh-Kell fenotyp^{2,3}</i>	optimálně Rh fenotyp shodný s příjemcem v negativních znacích ²
Pacient s AIHA s tepelnými protilátkami a zároveň s aloprotilátkou (-tkami)	bez odpovídajícího antigenu k aloprotilátce
	Kell-negativní ¹
<i>Vyšetřit Rh fenotyp²</i>	Rh fenotyp shodný s příjemcem v negativních znacích ²
<i>Vhodné vyšetřit Jk a Fy fenotyp, S⁴</i>	optimálně Jk, Fy a S fenotyp shodný

	s příjemcem ⁴
Pacient s AIHA se specifickou tepelnou autoprotilátkou	optimálně bez odpovídajícího antigenu; posuzuje se podle klinického stavu pacienta
	Kell negativní ¹
<i>Vyšetřit Rh fenotyp^{4, 5}</i>	optimálně Rh fenotyp shodný s příjemcem v negativních znacích ^{4, 5}

Př.: anti-e = u klinicky významné akutní hemolýzy (Hb ≤ 70 g/l, event. laboratorní průkaz hemolýzy nebo průkaz klinické významnosti PAT) se upřednostní podání erytrocytů s fenotypem EE; v ostatních případech se podávají erytrocyty s fenotypem odpovídajícím fenotypu příjemce

Pacient s AIHA s nespecifickými tepelnými protilátkami (panspecifické)	Kell negativní
<i>Vyšetřit Rh fenotyp⁴</i>	optimálně Rh fenotyp shodný s příjemcem v negativních znacích ⁴
<i>Event. další významné antigeny, je-li to vhodné (např. Jk, Fy, S^d)</i>	optimálně fenotyp shodný s příjemcem v negativních znacích ⁴

Test kompatibility: přednostně v NAT zkumavkovou metodou; vybrat EBR s nejslabší reakcí

¹není-li prokázána pozitivita antigenu Kell u příjemce

²v neurgentních případech; nebyl-li příjemce transfundován v posledních 3 měsících

³u klinicky významných protilátek (anti-Rh, -K, -k, -Fy, -Jk, -MNSs, -Lu, -Wr^a)

⁴v neurgentních případech; nebyl-li příjemce transfundován v posledních 3 měsících; pouze dg. séry třídy IgM nebo po odstranění autoprotilátek z povrchu erytrocytů

⁵s přihlédnutím ke specifitě autoprotilátky

Zdroj: doporučení č. STL2011_08⁽⁵⁾

Příloha 15: Příbalový leták BIO RAD: ID-DiaPanel, ID-DiaPanel-P

BIO-RAD

Set ID-DiaPanel: 45161.59.Z (Japan: 4516.59.ZZ)
Set ID-DiaPanel P: 45171.59.Z (Japan: 4517.59.ZZ)

Antigen-Tablet / Antigen-tablet / Table d'antigènes
 Antikörper-Identifizierung / Antibody Identification / Identificación d'anticòrps
 Identificación anticòrpal / Identification dell'anticòrpo / Identification of antibodies

LOT 06171.59.Z - (Japan: 0617.59.ZZ) 2011.11.07 (Japan: 07.11.11)
 06271.59.Z - (Japan: 0627.59.ZZ)
 05361.59.Z - (Japan: 0536.59.ZZ)
 05461.59.Z (Japan: 0546.59.ZZ)

V.I.P. Software: **P09** **ID-DiaPanel-P**

	Rh-ir	Rh-ir			Kell			Duffy	Kidd	Lewis	P	MNS			Luth.	Xg	Spec. Antigene Specialtyes Antigènes part. Antigeni part. Otras Antígenas Tipos especiales	Enzimtest / Enzymtest / Autocombi / Auto-combina	Resultat / Result / Résultats / Resultado / Resultado / Resultado		Bemerkungen / Remarks / Remarques / Note Observaciones / Observações																	
		D	C	E	k	Kp	Ka	Js	U	Le	S	P	M	N	S	Lu			L	Xg		LSS / Coombs	Enzyme 4°C															
1	C ^w CD. ee	R ₁	R ₁	R ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				1																	
2	CCD. ee	R ₁	R ₁	R ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				2																	
3	ccD.EE	R ₂	R ₂	R ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				3																	
4	CcDdee	r ₁	r ₁	r ₁	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				4																	
5	ccddEe	r ₁	r ₁	r ₁	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				Bg ^{a+}																	
6	ccDdee	rr	rr	rr	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				5																	
7	ccDdee	rr	rr	rr	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				6																	
8	ccD. ee	R _{af}	R _{af}	R _{af}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				7																	
9	ccDdee	rr	rr	rr	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				8																	
10	ccDdee	rr	rr	rr	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				9																	
11	ccDdee	rr	rr	rr	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				10																	
																					11																	
Patient / Patient / Patient / Paciente / Paciente																																						

ID-DiaPanel-Zellen 1-11 (wenn unter der Rubrik „spezielle Antigene“ nicht anders vermerkt) sind ID-DiaPanel cells 1-11 (except as indicated under „special types“) are ID-DiaPanel cells 1-11 (except as indicated under „antigenes particuliers“) son:

Die farbige gekennzeichneten Antigene können im Enzymtest unentdeckt oder zersört werden. Should column indicate antigens destroyed or diminished in reactivity by enzyme treatment; aux enzymes protéolytiques. Les colonnes ombragées indiquent les antigènes détruits ou diminués en réactivité par le traitement enzymatique.

Die Enzyme des Systems NHS, Duffy or Xg, si les cellules sont traitées par les enzymes, protéolytiques. Les colonnes ombragées indiquent les antigènes détruits ou diminués en réactivité par le traitement enzymatique.

Os esfrições teste 1-11 de ID-DiaPanel (excepto se indicado sob „tipos especiais“) são: The columns are shaded to indicate that antigens are destroyed or diminished in reactivity by enzyme treatment.

Die Enzyme des Systems NHS, Duffy or Xg, si les cellules sont traitées par les enzymes, protéolytiques. Les colonnes ombragées indiquent les antigènes détruits ou diminués en réactivité par le traitement enzymatique.

Os esfrições teste 1-11 de ID-DiaPanel (excepto se indicado sob „tipos especiais“) são: The columns are shaded to indicate that antigens are destroyed or diminished in reactivity by enzyme treatment.

s = stark / strong / fort / forte / forte / forte / forte / forte
 w = schwach / weak / faible / débil / débil / débil / débil / débil
 nt = nicht getestet / not tested / pas tests / non testado / no probado / no probado / no probado / no probado

Name / Name / Nom / Nome / Nombre / Nome	Blutgruppe + Antigene / Blood group + antigens / Groupe sanguin + antigènes / Gruppo sanguigno + antigeni / Grupo sanguíneo + antígenos / Grupo sanguíneo + antígenos	Interpretation / Interpretation / Interpretation / Interpretación / Interpretazione / Interpretazione	Datum / Date / Date / Data / Fecha / Data

800415 10.10 26.08.2011 / 14.35

Diamed GmbH, 1785 Cressier FR, Switzerland

Zdroj: Příbalový leták BIO RAD: ID-DiaPanel, ID-DiaPanel-P

