

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Jana Třeštková

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Jana Třeštková

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**ÚLOHA IMUNOHEMATOLOGIE V PŘEDTRANSFUZNÍM
VYŠETŘENÍ**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Eva Fronková

PLZEŇ 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 30. 3. 2022

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Třeščíková Jana

Katedra: Záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Úloha imunohematologie v předtransfuzním vyšetření

Vedoucí práce: MUDr. Eva Fronková

Počet stran – číslované: 57

Počet stran – nečíslované: 83

Počet příloh: 4

Počet titulů použité literatury: 20

Klíčová slova: imunohematologie, transfuze, protilátky

Souhrn:

Tato práce se zabývá hodnocením počtu imunizovaných pacientů v průběhu sledovaného období. Zároveň je v práci vysvětlen dopad metodiky práce na počty zachycených erytrocytárních aloprotilátek a to zda výběr erytrocytárních transfuzních přípravků dle Rh-Kell fenotypu vybraným pacientům (ženy ve fertilním věku, u pacientů se známými nepravidelnými protilátkami, u nemocných s předpokládanou potřebou opakovaných transfuzí) od roku 2018 má vliv na četnost výskytu aloprotilátek v následujících letech. V průběhu sledovaného období se počty zachycených erytrocytárních aloprotilátek mírně měnily. Důležité je, že nedochází k menšímu záchytu v důsledku použité metodiky v porovnání se začátkem sledovaného období. Dle nově zavedeného postupu od roku 2018 můžeme říci, že se dá očekávat zlepšení, co se týče počtu imunizovaných pacientů z vybraných skupin v následujících letech.

Abstract

Surname and name: Třeštíková Jana

Department: Paramedicine, diagnostic disciplines and public health

Title of thesis: The role of immunohematology in pre-transfusion testing

Consultant: MUDr. Eva Fronková

Number of pages – numbered: 57

Number of pages – unnumbered: 83

Number of appendices: 4

Number of literature items used: 20

Keywords: immunohematology, transfusion, antibodies

Summary:

This paper deals with the evaluation of the number of immunized patients during the period under study. It also explains the impact of the methodology of the work on the number of detected erythrocyte alloproteobodies and whether the selection of erythrocyte transfusion products according to Rh-Kell phenotype for selected patients (women of childbearing age, patients with known irregular antibodies, patients with the expected need for repeated transfusions) from 2018 onwards has an impact on the frequency of alloproteobodies in subsequent years. During the selected period, the numbers of erythrocyte alloproteobodies detected varied slightly. Importantly, there is no decrease in the number of detections due to the methodology used compared to the beginning of the reporting period. According to the newly introduced procedure as of 2018, we can say that an improvement can be expected in terms of the number of immunized patients from selected groups in the following years.

Předmluva

Účelem mé práce bylo poukázat na důležitost imunohematologie v souvislosti se základním předtransfuzním vyšetřením. Představit nejčastější aloprotilátky proti erytrocytům zachycené na TO FN Plzeň a důležitost vyšetřování Rh-Kell fenotypu u vybraných skupin pacientů (ženy ve fertilním věku, u pacientů se známými nepravidelnými protilátkami, u nemocných s předpokládanou potřebou opakovaných transfuzí). Zhodnotit průběh dat ve sledovaném období.

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí práce MUDr. Evě Fronkové za odborné vedení práce, poskytování rad, materiálních podkladů a za vstřícný přístup při konzultacích.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	12
SEZNAM OBRÁZKŮ	13
SEZNAM TABULEK	14
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	17
TEORETICKÁ ČÁST	18
1 IMUNOHEMATOLOGIE.....	18
1.1 Imunita	18
Přírozená imunita – nespecifická, vrozená	18
Získaná imunita – specifická	18
1.1.1 Antigeny	19
1.1.2 Protilátky	19
1.1.3 Reakce antigenu s protilátkou	22
2 ÚČEL PŘEDTRANSFUZNÍHO VYŠETŘENÍ.....	24
3 KREVNÍ SKUPINY	26
3.1 Krevní skupinový systém AB0	27
3.2 Skupinový systém Rh	27
3.3 Ostatní krevně-skupinové systémy	28
3.3.1 Skupinový systém Lewis	28
3.3.2 MNS systém	28
3.3.3 P1PK systém.....	29
3.3.4 Lutheran systém.....	29
3.3.5 Kell systém a Kx systém	29
3.3.6 Duffy systém	30
3.3.7 Kidd systém	30
4 TRANSFUZNÍ PŘÍPRAVKY	30
4.1 Plná krev	31
4.2 Erytrocyty	31
4.3 Trombocyty.....	33
4.4 Plazma.....	33
4.5 Granulocyty	34
4.6 Neonatální transfuze, intrauterinní (intraumbilikální) transfuze (IUT)	34
5 INDIKAČNÍ KRITÉRIA A NALÉHAVOST PODÁNÍ.....	34
5.1 Indikační kritéria hemoterapie	35
5.1.1 Plná krev	35

5.1.2	Erytrocytový koncentrát	35
5.1.3	Trombocytový koncentrát	35
5.1.4	Čerstvá zmrazená plazma	36
5.1.5	Transfuzní přípravky zbavené leukocytů	36
5.1.6	Transfuzní přípravky chudé na leukocyty	36
5.1.7	Ozářené transfuzní přípravky	36
5.2	Stupně naléhavosti požadavku	37
5.2.1	Vitální indikace	37
5.2.2	Statim.....	37
5.2.3	Plánovaná transfuze	38
5.2.4	Plánovaný erytrocytový transfuzní přípravek do zálohy	38
5.2.5	Masivní transfuze	38
6	POTRANSFUZNÍ REAKCE	38
6.1	Klasifikace potransfuzních reakcí	39
6.1.1	Akutní hemolytická reakce	39
6.1.2	Pozdní hemolytická reakce	40
6.1.3	Alergická reakce	40
6.1.4	Poškození plic způsobené transfuzí – TRALI (Transfusion Related Acute Lung Injury).....	40
6.1.5	Transfuzí indukovaná reakce štěpu proti hostiteli TA-GvHD.....	41
6.1.6	Potransfuzní trombocytopenická purpura.....	41
6.1.7	Transfuzí způsobené oběhové přetížení – TACO (Transfusion Associated Circulatory Overload).....	41
6.1.8	Transfuzí přenosné infekce.....	42
6.1.9	Febrilní nehemolytické potransfuzní reakce.....	42
7	ZÁKLADNÍ PŘEDTRANSFUZNÍ VYŠETŘENÍ	43
7.1	Stanovení krevních skupin systému AB0 Rh(D).....	43
7.1.1	Vyšetření aglutinogenů a Rh(D) antigenu sklíčkovou metodou	44
7.1.2	Vyšetření aglutinogenů a Rh(D) antigenu včetně aglutininů zkumavkovou metodou ⁴⁵	
7.1.3	Stanovení krevních skupin AB0/RhD metodou sloupcové aglutinace.....	46
7.2	Vyšetření Rh-Kell fenotypu.....	49
7.2.1	Stanovení fenotypů Rh a Kell na ID-Kartě DiaClon Rh-Subgroups + K.....	49
7.3	Vyšetření screeningu protilátek proti erytrocytům	50
7.3.1	Screening protilátek nepřímým antiglobulinovým testem (NAT).....	50
7.3.2	Screening protilátek enzymovým testem s papainizovanými krvinkami	51
7.4	Identifikace protilátek proti erytrocytům	52
7.4.1	Identifikace protilátek NAT.....	53

7.4.2	Identifikace protilátek enzymovým testem s papainizovanými krvinkami ...	53
7.5	Test kompatibility	54
7.5.1	Test kompatibility NAT	54
7.5.2	Test kompatibility enzymovým papainovým testem (jednostupňový test) ...	55
PRAKTICKÁ ČÁST		57
8	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	57
8.1	Hlavní cíl.....	57
8.2	Dílčí cíle.....	57
9	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	58
10	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	59
11	METODIKA PRÁCE	60
12	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	61
12.1	Analýza pozitivních a negativních vzorků	61
12.2	Četnost výskytu jednotlivých protilátek.....	63
12.3	Vývoj výskytu protilátek Rh-Kell systému za sledované období	64
12.3.1	Analýza výskytu protilátky anti-E ve sledovaném období.....	64
12.3.2	Analýza výskytu protilátky anti-Kell ve sledovaném období	65
12.3.3	Analýza výskytu protilátky anti-D ve sledovaném období	66
12.3.4	Analýza výskytu protilátky anti-C ve sledovaném období.....	67
12.3.5	Analýza výskytu protilátky anti-c ve sledovaném období	68
12.3.6	Analýza výskytu protilátky anti-e ve sledovaném období	69
12.4	Vývoj výskytu aloprotilátek u žen ve fertilním věku ve sledovaném období... ..	70
DISKUZE		72
ZÁVĚR.....		74
SEZNAM LITERATURY		75
SEZNAM PŘÍLOH		77
PŘÍLOHY		78
Příloha A – Grafy zobrazující záchyt jednotlivých protilátek za jednotlivé roky ve sledovaném období 2015 – 2022		78
Příloha B – Obrázek příkladu tabulek antigenů erytrocytů		82
Příloha C- Tabulka zobrazující počet negativních a pozitivních vzorků		83
Příloha D - Tabulka zobrazující počet pozitivních ostatních pacientů a počet pozitivních žen ve fertilním věku na aloprotilátku.....		83

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Počet pozitivních a negativních vzorků z celkového počtu vyšetřovaných vzorků pro jednotlivé roky 2015-2022	61
Graf 2 Počet pacientů s protilátkou anti-E za jednotlivé roky.....	64
Graf 3 Počet pacientů s protilátkou anti-Kell za jednotlivé roky	66
Graf 4 Počet pacientů s protilátkou anti-D za jednotlivé roky	67
Graf 5 Počet pacientů s protilátkou anti-C za jednotlivé roky	68
Graf 6 Počet pacientů s protilátkou anti-c za jednotlivé roky	69
Graf 7 Počet pacientů s protilátkou anti-e za jednotlivé roky	70
Graf 8 Porovnání počtu pozitivních vzorků na aloprotilátku a počet žen ve fertilním věku s aloprotilátkou.....	71
Graf 9 Počty zachycených protilátek za rok 2015	78
Graf 10 Počty zachycených protilátek za rok 2016.....	78
Graf 11 Počty zachycených protilátek za rok 2017.....	79
Graf 12 Počty zachycených protilátek za rok 2018.....	79
Graf 13 Počty zachycených protilátek za rok 2019.....	80
Graf 14 Počty zachycených protilátek za rok 2020.....	80
Graf 15 Počty zachycených protilátek za rok 2021	81
Graf 16 Počty zachycených protilátek za rok 2022.....	81

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Protilátka IgM a IgG	21
Obrázek 2 Reakce antigen-protilátka	23
Obrázek 3 Vyhodnocení zkumavkové metody.....	46
Obrázek 4 Hodnocení sloupcové aglutinace	47
Obrázek 5 Příklady tabulek antigenů erytrocytů	82

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Základní krevní skupiny - AB0 antigeny, AB0 protilátky	27
Tabulka 2 AB0 kompatibilita pro plnou deleukotizovanou krev	31
Tabulka 3 AB0 kompatibilita	32
Tabulka 4 RhD kompatibilita	32
Tabulka 5 AB0 a RhD slučitelnost u plazmy	34
Tabulka 6 Hodnocení reakcí AB0 krevních skupin při stanovení aglutinogenů.....	48
Tabulka 7 Hodnocení reakcí při stanovení aglutininů AB	48
Tabulka 8 Hodnocení reakcí Rh(D)	48
Tabulka 9 Makroskopické zhodnocení reakcí při screeningu, identifikaci protilátky, testu kompatibility.....	56
Tabulka 10 Poměrové zastoupení pozitivních pacientů s aloprotilátkou z celkového počtu vyšetřovaných za jednotlivé roky	63
Tabulka 11 Počty pacientů s danou protilátkou za jednotlivé roky.....	63
Tabulka 12 Poměr protilátky anti-E ze všech zachycených protilátek za jednotlivé roky..	65
Tabulka 13 Poměr protilátky anti-Kell ze všech zachycených protilátek za jednotlivé roky	66
Tabulka 14 Poměr protilátky anti-D ze všech zachycených protilátek za jednotlivé roky .	67
Tabulka 15 Poměr protilátky anti-C ze všech zachycených protilátek za jednotlivé roky..	68
Tabulka 16 Poměr protilátky anti-c ze všech zachycených protilátek za jednotlivé roky ..	69
Tabulka 17 Poměr protilátky anti-e ze všech zachycených protilátek za jednotlivé roky ..	70
Tabulka 18 Poměr žen ve fertilním věku s aloprotilátkou z celkového počtu pacientů s aloprotilátkou.....	71
Tabulka 19 Počty negativních a pozitivních vzorků na aloprotilátku za jednotlivé roky ...	83
Tabulka 20 Počty pozitivních ostatních pacientů a pozitivních žen ve fertilním věku	83

SEZNAM ZKRATEK

AGH.....	anti-human globulin
APC.....	antigen prezentující buňka
CMV.....	Cytomegalovirus
EBR.....	erythrocyty bez buffy-coatu resuspendované
EDTA.....	ethylenediaminetetraacetic acid
ERD.....	erythrocyty resuspendované deleukotizované
ET.....	enzymový test
FN.....	Fakultní nemocnice
GPA.....	glykoforin A
GPB.....	glykoforin B
Hb.....	hemoglobin
HLA.....	lidský leukocytární antigen
HON.....	hemolytické onemocnění novorozence
Ht.....	hematokrit
HTR.....	hemolytická potransfuzní reakce
IUT.....	intrauterinní transfuze
LISS.....	solný roztok s nízkou iontovou koncentrací (low ionic strength solution)
NAT.....	nepřímý antiglobulinový test
NK.....	natural killer
PCH.....	paroxysmální chladové hemoglobinurie

rcf..... relativní centrifugační síla

T.U. transfuzní jednotka

TACO..... transfuzí způsobené oběhové přetížení

TA-GvHD..... transfuzí indukovaná reakce štěpu proti hostiteli

TO..... Transfuzní oddělení

TP..... transfuzní přípravek

TRALI..... poškození plic způsobené transfuzí

VL..... vlastní erytrocyty

ÚVOD

Tématem mé bakalářské práce je úloha imunohematologie v základním předtransfuzním vyšetření. Imunohematologické vyšetření je nepostradatelnou součástí předtransfuzního procesu. V současné době se bez něj hemoterapie neobejde, pokud nejde o stavy bezprostředního ohrožení života a podání transfuzních přípravků z vitální indikace. Ale i v těchto situacích je nutné ho co nejdříve doplnit.

V práci jsem se teoreticky zabývala tématy souvisejícími s imunohematologií a předtransfuzním vyšetřením. Téma je a bude stále aktuální, imunohematologie v průběhu let neztrácí na důležitosti v souvislosti s hemoterapií. Metody, kterými se provádí předtransfuzní vyšetření prochází v závislosti na modernizaci a dalších okolnostech obměnami. V této práci jsem se zaměřila na analýzu konkrétního období, ve kterém také došlo ke změnám metodiky a je důležité ukázat si, zda jde daná metodika správným směrem.

Cílem práce je zhodnotit četnost výskytu aloprotilátek proti erytrocytům u transfundovaných pacientů na krevních skladech Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice v Plzni. Dále pak zjistit, zda výběr eryrocytárních transfuzních přípravků dle Rh-Kell fenotypu pro konkrétní pacienty vedl ke snížení četnosti výskytu protilátek. Současně jsem ověřovala, zda a jakým způsobem (pozitivně či negativně) konkrétní metodika ovlivňovala výsledky.

Ze zpřístupněného souboru dat jsem vyhledávala počty pozitivních pacientů na erytoctyární protilátku. Vybraná data jsem dále analyzovala.

TEORETICKÁ ČÁST

1 IMUNOHEMATOLOGIE

1.1 Imunita

Imunita je schopnost organismu bránit se cizorodým látkám, škodlivým a nebezpečným. Imunitu dělíme na přirozenou a získanou. (1)

Přirozená imunita – nespecifická, vrozená

Jde o první linii obrany, jejíž mechanismy jsou stejně účinné proti různým antigenům. Rychlost reakce je v řádu minut až hodin. Do nespecifické imunity řadíme fyzikální, chemické a biologické bariéry (kůži, pohyb řasinek sliznice, nepatogenní flóru zažívacího traktu). K humorální části patří komplement, cytokiny a interferony. Mezi buněčné složky patří fagocytující a NK buňky. (1)

Získaná imunita – specifická

U tohoto druhu imunity je reakce pomalejší, reaguje v průběhu dnů, jde až o druhou linii obrany organismu. Odpověď se vyvíjí až po kontaktu se specifickým antigenem. Nastává tedy v situaci, kdy buňky imunitního systému obsahují receptor pro daný antigen. Má schopnost imunologické paměti. V řízení této odpovědi hrají roli různé signální molekuly, lymfokiny, cytokiny či chemokiny. Protilátky neboli imunoglobuliny, produkované B lymfocyty, patří do humorální složky specifické imunity. Zatímco T lymfocyty v periferních lymfatických orgánech patří do složky buněčné. T lymfocyty můžeme po diferenciaci ještě dále rozlišovat na T_c nebo T_h . (1, 2)

Odpovědi se dále účastní dendritické buňky a makrofágy (APC), které jsou schopné štěpit antigeny na peptidy a ve spojení s molekulami hlavního histokompatibilního komplexu je předkládat T lymfocytům. (1)

V obraně proti extracelulárním (exogenním) antigenům se uplatňují protilátky, které neutralizují, opsonizují nebo vedou k aktivaci komplementu a lýze patogenů. Proti intracelulárním (endogenním) patogenům působí buňkami zprostředkovaná cytotoxická odpověď s účastí T lymfocytů. (1, 2)

1.1.1 Antigeny

Imunogen je substance, která navodí imunitní odpověď.

Antigen je organická látka rozpustná v tělních tekutinách nebo se vyskytuje na povrchu buněk. Na svém povrchu obsahuje antigenní determinanty, které organismus rozpozná jako cizí a reaguje na ně imunitní odpovědí. Antigeny rozlišujeme na sacharidové a proteinové.

Hapten, jde o malou molekulu, která je antigenní, ale nikoli imunogenní, i přesto po vazbě na imunogenní nosič může vést k tvorbě protilátek.

Epitop je část antigenu a váže se na něj produkt specifické odpovědi, tedy protilátka.

Imunogenicita je navození imunitní odpovědi. Jde o reakci, která je závislá na cizorodosti patogenní molekuly. Za normálních okolností imunitní systém rozpoznává vlastní a cizí molekuly a reaguje pouze na ty cizí. Reaguje na jejich velikost, složení, na fyzikální formu daného antigenu a na způsob odstranění antigenu z organismu. Při této reakci rozhodují i další faktory.

Antigenicita, jde o schopnost antigenu, kdy je antigen schopný specificky vázat protilátky nebo receptory T lymfocytů. Můžeme říci, že všechny imunogeny jsou antigeny, ale ne že všechny antigeny jsou imunogenní. (1)

1.1.2 Protilátky

Protilátka je specifický protein, vzniká jako odpověď na imunogen a reaguje se specifickým antigenem. Konkrétně jde o glykoproteiny. Protilátka se na antigen váže k jeho specifickému antigennímu epitopu, a to na základě vzájemné komplementarity v místech označovaných jako variabilní domény. Tuto reakci můžeme definovat pojmem „zámek a klíč“. Proti jednomu epitopu vzniká řada protilátek, s rozdílem, že každá kopíruje jeho povrch jinak. Protilátky, jinak též imunoglobuliny, mají i jiné efektorové vlastnosti, například mohou vázat komplement a tím uvolnit biologicky aktivní molekuly a vést k lýze buňky. Nebo se připojit k jiným buňkám, které pro ně mají receptor a tyto buňky následně aktivovat. (1, 2)

Základní jednotka imunoglobulinu je tetramer složený ze dvou identických lehkých a dvou identických těžkých řetězců ve tvaru písmene Y. Lehké i těžké řetězce mají svou variabilní a konstantní část a jsou stočeny do kompaktních globulí, jinak též nazývaných domén. Tyto domény jsou složeny z cca 110 aminokyselin. Středová část je označována jako pantová a je flexibilní. Na konci V oblasti je hypervariabilní část, která díky spojení lehkého a těž-

kého řetězce vytváří vazebné místo pro antigen. Jednotlivé protilátky se liší složením aminokyselin, na aminových koncích řetězců. Různé varianty protilátek existují tedy díky variabilitě těchto oblastí. (1, 3, 4))

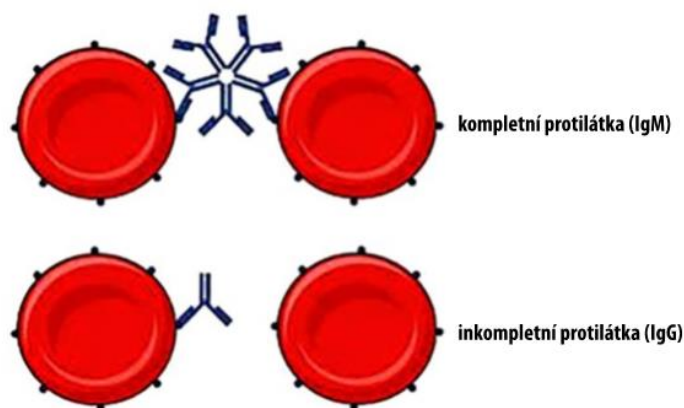
V pantové oblasti lze imunoglobulin štěpit. Pomocí proteolytického štěpení papainem získáme dva shodné Fab fragmenty dvou lehkých a dvou těžkých řetězců. Ty obsahují vazebné místo pro antigen a dále pak fragment Fc, který plní efektorovou funkci protilátky a je tvořený dvěma těžkými řetězci. (1, 4)

Protilátky se skládají ze dvou typů řetězců. Typu L - jde o lehký řetězec a H – jde o těžký typ řetězce. Ty se pak ještě dále dělí. Lehký řetězec je buďto kappa nebo lambda, ty těžké se rozlišují na mí, gamma, delta, alfa a epsilon. Podle těchto aminokyselin v těžkých řetězcích lze imunoglobuliny rozdělit do pěti imunoglobulinových tříd a to na IgM, IgG, IgD, IgA a IgE. Dále je můžeme diferencovat na podtřídy IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IGA₂. V imunohematologii mají uplatnění pouze IgG a IgM protilátky. (1, 3, 4)

Co se týče protilátky IgG, jde o malou molekulu, o rozměru 150 000 Daltonů (Dalton je unifikovaná atomová hmotnostní jednotka). Je to inkompletní protilátka, to znamená, že aby propojila erythrocyty, musíme reakci ovlivnit. Například přidáním AGH nebo snížením povrchového napětí erythrocytů. Klinicky je tato protilátka důležitá, dále pak jako jediná může procházet placentou. Protilátky rozdělujeme na tepelné, chladové a bifazické, podle teploty, při které optimálně reagují. IgG protilátky jsou tepelné povahy, optimální teplota reakce je 37°C, to znamená, že způsobují destrukci erythrocytů při tělesné teplotě. (3)

Protilátky IgM mají velkou molekulu, uvádí se velikost 900 000 daltonů. Jde o kompletní protilátku, propojí tedy dva erythrocyty v solném prostředí. Až na anti-A a anti-B jde o klinicky méně důležité protilátky. Obvykle jsou chladové povahy, optimálně reagují při teplotě < 20 °C, výjimečně způsobují hemolýzu in vivo (například v zimě, v akrálních částech končetin). (3)

Obrázek 1 Protilátka IgM a IgG



Zdroj: Praktická imunohematologie – erythrocyty

Protilátky můžeme dále dělit:

a) **Přírozené:** zde není žádný imunizační podnět související s alogenními erythrocyty. Tvorbu přírodních protilátek zřejmě způsobuje vystavení organismu antigenům prostředí, bakterií nebo virů. (2, 4)

b) **Imunní:** vznikají po styku s antigenem, který není přítomen v organismu daného jedince. Frekvence tvorby u zdravých dárců je velmi nízká, u chronicky transfundovaných pacientů (s talasemií, srpkovitou anemií) může dosahovat až 50 %. (2, 4)

Pokud se organismus s daným antigenem doposud nesetkal, nastává primární imunizace.

K sekundární imunizaci dochází, pokud byl organismus daným antigenem imunizován a došlo k dalšímu imunizačnímu podnětu tím samým antigenem. Sekundární odpověď bývá rychlá. (2)

Obecně se uvádí vliv některých chorob na tvorbu aloprotilátek, a to jak vyšší riziko, tak i nižší riziko tvorby aloprotilátek po opakovaných transfuzích. Existují však studie, které neprokazují souvislosti mezi tvorbou aloprotilátek a chorobami, místo toho za primární faktor tvorby aloprotilátek považují genetické predispozice. (2)

c) **Pasivně přenesené:** přenášejí se podáním imunoglobulinu, dárcovské plazmy, lymfocytů z transplantovaného orgánu nebo hematopoetických buněk. (2)

Pravidelné protilátky, vyskytují se očekávaně v lidské plazmě/séru, jsou to protilátky anti-A a anti-B, **nepravidelné** jsou všechny ostatní protilátky. (2)

Alogenní protilátka (aloprotilátka), působí proti antigenu, který u daného jedince není přítomen, tedy proti cizímu antigenu. (1, 2)

Autologní protilátka (autoprottilátka), je protilátka, působící proti antigenu, který daný jedinec nese na svých erythrocytech, působí proti vlastnímu antigenu. (1, 2)

Afinita protilátky vyjadřuje sílu vazby (asociace), mezi určitým epitopem antigenu a vazebným místem dané protilátky. (2)

Avidita protilátky uvádí pevnost vazby antigen-protilátka, mezi polyvalentní protilátkou a polyvalentním antigenem. Jde tedy o afinitu všech vazebných míst protilátek a antigenních epitopů. (2)

Antiglobulinové sérum = AGH, jsou to sekundární protilátky, které se vážou na primární protilátky nebo na složku komplementu. (2)

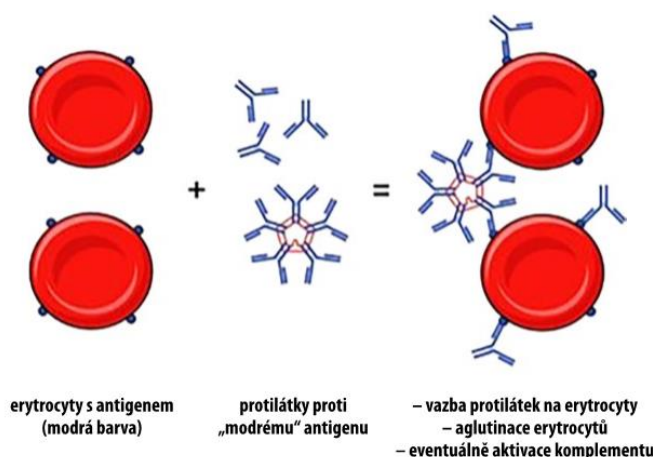
Rozděluje se na: a) **Monospecifické** - podle toho, proti čemu jsou namířené, je dále dělíme na anti-IgG, anti-C3d, anti-IgA, anti-IgM, anti-C3c. (2)

b) **Polyspecifické** - sérum obsahuje anti-IgG a anti-C3d. (2)

1.1.3 Reakce antigenu s protilátkou

Jde o chemickou reakci malého místa glykoproteinové molekuly protilátky, tedy paratopu (oblast variabilní části protilátky) s vazebnými místy (epitopy) na povrchu membrány erythrocytu. K připojení dochází pomocí nekovalentních vazeb, které jsou slabé, fungují jen na malou vzdálenost a jsou reverzibilní. Pro pevné spojení je nutné velké množství vazeb a vysoká vzájemná komplementarita antigenu a protilátky. (1)

Obrázek 2 Reakce antigen-protilátka



Zdroj: *Praktická imunohematologie - erythrocyty*

Specifičnost reakce je vlastnost protilátky reagovat jen s jedním antigenem, konkrétně jen s jedním epitopem.

Zkřížená reaktivita je naopak schopnost protilátky reagovat s různými epitopy, pokud jsou zkříženě reagující epitopy podobné antigenu, který navodil imunizaci. (1, 2)

Vznik vazby mezi protilátkou a antigenem mohou ovlivnit různé faktory.

a) Teplota

Ideální teplota, při které daná protilátka optimálně reaguje s antigenem, určuje také její klinický význam. Převážná většina klinicky významných protilátek reaguje při 37 °C. Pokud je vazba mezi antigenem a protilátkou polární, jde o exotermní reakci a tudíž je silnější za nižších teplot. V této vazbě se uplatňují především antigeny sacharidové povahy. Pokud jde o hydrofobní vazbu antigen-protilátka, reakce je silnější při vyšších teplotách. Zde se uplatňují hlavně proteinové antigeny. (1, 2)

b) pH

Optimální pH prostředí je pro různé protilátky odlišné, ale většina reakcí probíhá při hodnotách pH kolem 7 – za této situace mají protilátky slabě pozitivní náboj, což je vzhledem k negativnímu náboji erythrocytů optimální. Při snížení pH může dojít k disociaci protilátkové vazby, což následně může vést k dosažení falešně negativních výsledků. Pro udržení optimálního pH pro reakce se doporučuje provádět testy v prostředí pufovaného fyziologického roztoku. (1, 2)

c) iontová síla prostředí

Jak polární, tak i hydrofobní protilátkové vazby jsou ovlivňovány ionty v reakčním prostředí. Typickým diluentem pro reakce je izotonický fyziologický roztok. Pokud chceme vazeb antigenů a protilátek dosáhnout rychleji, je možnost použít roztok s nižším obsahem Na^+ a Cl^- iontů. (1, 2)

d) poměr množství antigenu a protilátky

Aby se mezi antigeny a protilátkami mohly uplatnit přitažlivé síly, je zapotřebí co nejtěsnější přiblížení. Sílu vazby, tedy míru afinity, lze vyjádřit pomocí rovnovážné konstanty. Výsledek reakce ovlivňuje hustota exprese antigenu na membráně, stejně jako koncentraci protilátek. Pro ideální výsledky laboratorních testů je potřebný nadbytek protilátek nad antigeny. (1, 2)

Fenomén prozóny znamená, že vzniká slabá až falešně negativní reakce, dochází k němu při extrémním nadbytku protilátek. Protilátky obsadí všechny antigeny na jednom erytrocytu, což znamená, že nezůstává žádný volný antigen, na který by se navázala přemosťující protilátka. Falešně negativnímu výsledku můžeme zabránit nařazením vyšetřovaného materiálu. (2)

2 ÚČEL PŘEDTRANSFUZNÍHO VYŠETŘENÍ

Cílem předtransfuzního laboratorního vyšetření je vyšetření patientského vzorku krve a určení správné a bezpečné hemoterapie. Součástí je vyšetření v oboru imunohematologie, která studuje vztah imunitního systému a krve. Úkolem transfuzního oddělení je zároveň příprava kvalitních transfuzních přípravků. (1, 3)

Transfuzní terapie se neustále vyvíjí v souladu s trendy moderní transfuzní medicíny s cílem maximalizovat bezpečnost transfuzních přípravků. Imunohematologie propojuje transfuzní pracoviště s klinickými odděleními. (5)

V případě nesprávného určení hemoterapie nastává problém ze strany protilátek. Funkcí protilátek je obrana vlastního organismu před cizími elementy a jejich odstranění. Doposud jsou popsány tři mechanismy, jak protilátky působí při destrukci erytrocytů:

- aktivace komplementové kaskády, která vede jak k intravaskulární tak extravaskulární hemolýze,

- fagocytóza erytrocytů s navázanými IgG protilátkami, po které následuje extravaskulární hemolýza,
- přímé narušení stability membrány vazbou protilátek. (2)

Abychom se těmito mechanismům u pacienta vyhnuli, musíme dodržovat přísná pravidla. Před samotnou transfuzí předcházejí důležité kroky, musí dojít ke správné indikaci transfuze lékařem, správnému vystavení žádanky o transfuzní přípravek a správnému odběru vzorku pro předtransfuzní vyšetření. Musí se tedy dodržet správná identifikace pacienta / příjemce, správný odběr, označení a transport vzorku, úplné a správné údaje v žádance. (6)

Vzorek pacientské krve se z velké většiny odebírá do zkumavek s EDTA, k vyšetření tedy používáme nesrážlivou krev, ale lze použít i krev srážlivou (zkumavky se Serum Clot Activator, bez gelu). Odběr se musí vždy provádět už do předem označených (jménem, příjmením, rodným číslem, rodným číslem, případně náhradním identifikačním číslem pacienta) zkumavek. (6)

Co se týče žádanky o transfuzní přípravky (TP), obsahuje:

- název a identifikační údaje poskytovatele zdravotnických služeb, tedy žadatele o TP
- jméno a příjmení pacienta/příjemce transfuzního přípravku a jeho rodné číslo nebo náhradní identifikaci (dále například datum narození, pohlaví, číslo pojištěnce)
- důvod podání TP nebo diagnózu pacienta
- pokud byla vyšetřena, tak krevní skupinu (AB0 a RhD) a dále informaci o zjištěných nepravidelných protilátkách proti erytrocytům
- informace o předchozích transfuzích, porodech, těhotenství, potransfuzních reakcích, případném výskytu imuno hematologických komplikací v rodině a podobně
- druh TP, počet kusů, transfuzních jednotek nebo terapeutických dávek
- razítko poskytovatele

- naléhavost požadavku
- požadavky na další úpravu transfuzního přípravku
- datum vystavení
- informace o lékaři, který TP požaduje
- druh požadovaného vyšetření, test kompatibility
- datum a čas odběru vzorku pacienta
- identifikační údaje osoby, která vzorek odebrala
- identifikaci zdravotní pojišťovny příjemce transfuzního přípravku

Při příjmu vzorku a žádanky musí přijímací pracovník zkontrolovat úplnost údajů a to jak na žádance, tak na štítku vzorku, vzhled vzorku a správnost časování odběru vzorku vzhledem k datu transfuze. Zjištěné nesrovnalosti a závady je nutné zaznamenávat a hlásit. (6)

3 KREVNÍ SKUPINY

Systém krevních skupin je charakterizován jako soubor fenotypů definovaných lidskými protilátkami a vyznačujících se společnými vlastnostmi, jako jsou:

- známá biochemická podstata,
- definovaná chromozomální lokalizace,
- identifikovaný a sekvenovaný gen.

V systému může být přítomen jen jeden antigen (P, H a jiné), ale i desítky antigenů (Rh, MNS). (3)

Genotyp je soubor přítomných genů, zatímco fenotyp je soubor morfologických a funkčních znaků jedince. (1)

Běžné stanovení krevních skupiny se vztahuje na ty nejdůležitější z hlediska imunogenicity a to na AB0, Rh a případně Kell systém. Tímto se předchází rozvoji reakcí při transfuzích, transplantacích, komplikacích v těhotenství a novorozeneckém věku. Stanove-

ní krevních skupin se dá využít i v jiných směrech, v soudním lékařství, v určování otcovství a v rodových studiích. (4)

3.1 Krevní skupinový systém AB0

Jde o nejvýznamnější systém, oproti ostatním systémům je charakterizován jedinečnou vlastností, a to existencí přirozených protilátek proti antigenům, které nejsou na krvinkách dané osoby. Tyto protilátky vznikají po narození, na základě imunizačního působení antigenů zevního prostředí. Takto vytvořené protilátky mají často hemolytický potenciál a inkompatibilní transfuze mohou způsobit akutní hemolytické reakce se závažným klinickým průběhem, který mnohdy končí až fatálně. (3)

AB0 antigeny jsou oligosacharidy, které jsou součástí glykoproteinů a glykolipidů v membráně erytrocytů a jejich rozpustná forma je také obsažena v sekretech. V základním modulu jsou uváděny 2 antigeny a 4 fenotypy. (1, 3)

Tabulka 1 Základní krevní skupiny - AB0 antigeny, AB0 protilátky

Krevní skupiny	AB0 antigeny	AB0 protilátky
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
0	žádné	Anti-A, anti-B
AB	A, B	žádné

Převzato: Praktická imunohematologie - erytrocyty

3.2 Skupinový systém Rh

Rh systém je druhým nejvýznamnějším systémem, zároveň jde o nejpolymorfnější systém s největší aloimunogenicitou a častou tvorbou IgG protilátek. Označení Rh bylo poprvé použito v roce 1940 a bylo odvozené na základě protilátky získané imunizací králíků a morčat krvinkami opice *Macacus rhesus*. I přesto, že se později ukázalo, že lidská a zvířecí protilátka mají jisté odlišnosti, zůstalo pro lidskou protilátku vžitě označení anti-Rh. (1, 3)

Při popisování Rh antigenů se používají i kromě ISBT numerické klasifikace dvě historické nomenklatury, z toho starší Wienerův „faktorový“ Rh/Hr systém a Fisherův „třígenový“ CDE systém. V současné době rozeznáváme 56 antigenů Rh systému,

k nejvýznamnějším a nejznámějším patří antigeny D, C, c, E a e. Osoby s exprimovaným D antigenem se označují jako RhD pozitivní, jedinci s chybějícím D antigenem jako RhD negativní. Protilátky proti Rh antigenům se nevytváří přirozeně, proto vznik protilátek předpokládá antigenní stimulaci imunitního systému jedince například transfuzí nebo těhotenstvím. (1, 2)

Rh antigeny kódují dva homologní geny RHCE a RHD, ty podléhají autozomálně dominantnímu typu dědičnosti a jsou umístěné na 1. chromozomu. Normální D antigen sestává z více jak 30 částí, které označujeme jako epitopy, s diagnostickými antiséry dává silné, jasně pozitivní reakce. Existují i D antigeny, které dávají s diagnostickými antiséry slabé nebo diskrepantní reakce. Ty se rozdělují do dvou kategorií, které se liší počtem antigenních míst na erytrocytu a změnami D epitopů. Jde o slabé D antigeny (D^{weak}) a varianty antigenu D (D^{variant}). D^{weak} antigen je kvantitativní varianta antigenu, jde o kompletní antigen, ale s redukováným počtem antigenních míst. D^{variant} je antigen s kvalitativní změnou, tedy nekompletní antigen, chybí jeden nebo více epitopů. Pacienti s variantní formou antigenu D mohou po podání Rh(D) pozitivních erytrocytů vytvořit protilátku anti-D. (1)

3.3 Ostatní krevně-skupinové systémy

3.3.1 Skupinový systém Lewis

Antigeny v tomto systému jsou na membrány erytrocytů adsorbovány z plazmy, tudíž na rozdíl od jiných se nemění po transplantaci krvetvorných buněk. Vyskytují se na erytrocytech, lymfocytech a trombocytech. Jejich syntéza je tkáňově omezená, se silnou expresí v tekutinách a respiračních, gastrointestinálních a urogenitálních tkáních. Jsou známy dva hlavní antigeny tohoto systému, Le^a a Le^b a čtyři potencionální fenotypy Lewisových červených krvinek, ačkoli pouze tři typy jsou považovány za běžné. Biosyntéza těchto antigenů závisí na dalších spolupracujících systémech, produktem Lewis genu je fukosyltransferáza měnící řetězec H-prekurzoru typu 1 za vzniku Le^a nebo H řetězce typu 1 za vzniku Le^b , konečný Lewis fenotyp spoluzávisí na účinnosti Se genu. Přirozeně nepravidelné protilátky jsou poměrně časté, často u lidí bez antigenního stimulantu, především u lidí $Le(a-b-)$ až ve 20 %. (2, 3, 7)

3.3.2 MNS systém

Antigeny MNS systému se vyskytují pouze u erytrocytové řady a na renálních endotelových buňkách. Systém MNS je po systému Rh druhým nejvíce polymorfním s celkem 50 antigeny. Základní antigeny se nacházejí na glykoforinech A (GPA) nebo B

(GPB). Antigeny M a N, S a s, patří do skupiny antigenů, které je možné destruovat enzymy. Protilátky anti-M a anti-N jsou převážně klinicky nevýznamné, podobně jako protilátky proti antigenům Lewis patří k takzvaně přirozeným protilátkám, ale protilátky anti-S, -s, -U mohou způsobit závažnou hemolýzu. (1, 2, 8)

3.3.3 P1PK systém

Systém obsahuje 3 antigeny, z toho se antigen P1 vyskytuje pouze na erytrocytech a antigen P^k je kromě erytrocytů i na lymfocytech, trombocytech, dále v plazmě, ledvinách, plicích, srdci, endotelu, placentě, synoviálních a maligních buňkách. Pro antigen P1 (P1PK1) platí, že jeho síla se u různých jedinců liší, většina homozygotů nese silný antigen P1, všichni heterozygoti nesou slabý antigen P1. Při skladování se síla antigenu snižuje, erytrocyty poté mohou být falešně P1 negativní. Je-li přítomen P^k (P1PK3) antigen, pak není přítomen antigen P, pravidelně je při tom přítomna protilátka anti-P. Třetím antigenem je antigen NOR (P1PK4). V praxi se nejčastěji jedinci dělí na P1 pozitivní a P1 negativní. Protilátky anti-P1 jsou obvykle klinicky nevýznamné, zatímco anti-P se uplatňují u paroxysmální chladové hemoglobinurie (PCH) jako IgG autoprotilátky nazývané Donathův-Landsteinerův bifázický hemolyzin. (1, 2)

3.3.4 Lutheran systém

Glykoprotein Lutheran je kromě některých krevních buněk přítomen i v placentě, ve stěnách cév trávicího traktu a kůže, na epitelových buňkách ledvin, v játrech, mozku, plicích a dalších tkáních. Do systému spadá přibližně 27 antigenů, nejznámější jsou vysokofrekvenční antigen Lu^b a málo častý antigen Lu^a. Nejvíce častým fenotypem je tedy Lu(a-b+). Systém Lutheran není příliš klinicky významný, protilátky sice mohou působit potransfuzní reakce, ale většinou pozdní a mírné a kvůli slabé expresi na fetálních krvinkách nejsou spojovány s případy hemolytického onemocnění novorozence (HON). (1, 2, 3)

3.3.5 Kell systém a Kx systém

Tyto dva systémy spolu úzce souvisejí, Kell antigeny jsou nesený glykoproteinem CD239, který je disulfidickou vazbou spojen s Kx proteinem. Změna jednoho z proteinů ovlivňuje expresi druhého. Kell antigen se vyskytuje na buňkách červené řady a pravděpodobně i na myeloidních progenitorových buňkách a možná i na megakaryocytech. Dále pak na některých ostatních buňkách a tkáních. Přibližně 10 % pacientů s K-, kteří jsou vstaveni antigennímu působení, produkují anti-Kell protilátky již po 1 transfuzi erytrocytů, Kell antigeny jsou tedy po antigenu D nejsilnějšími imunogeny. Protilátky proti tomuto systému, patří ke klinicky významným protilátkám, jako první byly objeveny při zavádění

nepřímého antiglobulinového testu. Protilátky mají potenciál výskytu těžkých hemolytických reakcích po transfuzi krve (HTR) a těžkého průběhu hemolytického onemocnění plodu a novorozence (HON). (1, 3, 8)

3.3.6 Duffy systém

Fy^a a Fy^b se nevyskytují na trombocytech a leukocytech. Co se týče ostatních buněk, vyskytují se na endotelových buňkách, v tlustém střevě, plicích a dalších. Jejich frekvence výskytu v kavkazské populaci je Fy^a 68 % a Fy^b 80%. Zatímco asi 70 % Afroameričanů a téměř 100 % Západoafričanů je Fy(a-b-). Receptory Fy^a a Fy^b jsou receptory, které usnadňují celulární invazi, některým typům plasmodií, což jsou původci malárie (*Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*), proto jsou jedinci s erytrocyty Fy(a-b-) vůči nim rezistentní. Protilátky proti antigennímu systému Duffy jsou málo časté, ale mají potenciál působit HTR a HON. (2, 3, 8)

3.3.7 Kidd systém

Antigeny Jk^a a Jk^b jsou produkty kodominantních alel, jejichž frekvence výskytu je v kavkazské populaci podobná a to přibližně 75 %. Raritní nulový fenotyp Jk(a-b-), se relativně často vyskytuje v Polynézii. Antigeny Jk^a a Jk^b se vyskytují například na endotelových buňkách cév zásobujících ledviny. Protilátky proti systému Kidd nebývají časté, ale jsou nebezpečné, jednak pro obtížnou detekovatelnost a jednak pro velkou hemolytickou účinnost. Pro HON nemají příliš velký význam, v případě inkompatibility novorozence a matky, nastává jen vzácně. Oproti tomu může dojít k závažným až fatálním akutním hemolýzám. (2, 3, 8)

4 TRANSFUZNÍ PŘÍPRAVKY

Za transfuzní přípravky se považují lidská krev a její složky zpracované pro podání člověku za účelem léčení nebo předcházení nemoci, pokud nejde o krevní deriváty.

Pro každý typ přípravku jsou stanovena přísná pravidla a požadavky na jeho kvalitu. Tyto požadavky kontrolujeme tak, aby je splňovalo určitý počet nebo procento výrobních přípravků. Při skladování přípravků musíme dát pozor především na teplotu, každý přípravek má stanovenou teplotu nebo rozmezí teplot, při kterých je garantovaná doba použitelnosti. Při výdeji každého transfuzního přípravku musí výrobce poskytnout příbalový leták, ve kterém jsou uvedeny souhrnné informace o přípravku. (9, 10)

Pro transfuzi vybíráme a dáváme přednost podání přípravku shodnému v AB0 a RhD systému. Podání jinoskupinových přípravků je přípustné za předpokladu, že je dodržena kompatibilita a dojde k upozornění klinického pracoviště na AB0 RhD neshodu. (11)

4.1 Plná krev

Odebraná plná krev se nejčastěji využívá jako zdroj pro výrobu jednotlivých transfuzních přípravků (erytrocyty, plazma, trombocyty). Pokud je určena k použití pro transfuzi, lze ji podávat bez dalšího zpracování nebo může být deleukotizována. Před samotnou transfuzí plné krve je nutné provést zkoušku kompatibility, pokud nejde o urgentní podání v život ohrožující situaci. RhD negativním a stejně tak RhD negativním ženám ve fertilním věku a mladým osobám by měly být přednostně podávány přípravky od RhD negativních dárců. Dále musíme dát pozor na tvorbu mikroagregátů, při skladování plné krve, to neplatí pro deleukotizovanou krev. (10)

Plná krev, deleukotizovaná je určena pro univerzální podání, jedná se o přípravek s obsahem významného množství plazmy. (10)

Tabulka 2 AB0 kompatibilita pro plnou deleukotizovanou krev

AB0 kompatibilita	
Příjemce	Lze podat transfuzní přípravek
0	0
A	A, 0 ¹
B	B, 0 ¹
AB	AB, A ¹ , B ¹ , 0 ¹

Převzato: STL2022_16, verze 1

¹pouze v případě, že titr protilátky anti-A a/nebo anti-B ≤ 256 (IgM)

4.2 Erytrocyty

Erytrocytové transfuzní přípravky lze vyrobit dvěma způsoby, z odběrů plné krve centrifugací, nebo odběrem dárce na separátoru při erytrocytaferéze nebo multikomponentním odběru. Přípravky by měli mít nízký obsah plazmy, tento požadavek splňují přípravky z aferézy a přípravky z plné krve, u nichž byla po centrifugaci odstraněna plazma a buffy-coat. Před podáním transfuze erytrocytů je nutné provést zkoušku kompatibility, pokud se nejedná o podání v život ohrožující situaci. (10, 11)

Tabulka 3 ABO kompatibilita

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

Převzato: STL2022_16, verze 1

Tabulka 4 RhD kompatibilita

RhD kompatibilita	
Příjemce	Lze podat transfuzní přípravek
RhD pozitivní	RhD pozitivní; případně RhD negativní ¹
D ^w potvrzený vyšetřením DNA ²	
RhD negativní	RhD negativní ve zvláštních situacích RhD pozitivní ³
D ^{w/v} nevyšetřeno PCR / neuzavřeno / sérologicky susp. Varianta / varianta určená PCR	
Nejasný (diskrepantní) výsledek vyšetření RhD	

Převzato: STL2022_16, verze 1

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

² Jde-li pouze o sérologickou suspekci, potom u žen ve fertilním věku je bezpečnější pro transfuzi použít RhD negativní erytrocyty.

³ V život ohrožujících situacích, nebo při kritickém nedostatku zásob RhD negativních přípravků, lze neimunizovaným (jedinci bez průkazu anti-D) RhD negativním příjemcům podat RhD pozitivní erytrocyty. V takovém případě by se mělo provést vyšetření plazmy/séra pacienta na přítomnost anti-D (s odstupem 2-4 měsíců). V případě pozitivního průkazu by měl mít pacient tuto informaci v dokumentované formě pro případné další transfuze. Pokud je to možné, neměl by se tento postup volit u dívek a žen ve fertilním věku. (10, 11)

V současné době je k dispozici větší množství erytrocytových přípravků, z toho dva nejpožívanější jsou erytrocyty bez buffy-coatu resuspendované (EBR) a erytrocyty resuspendované deleukotizované (ERD). (10)

Erytrocyty mohou být kryokonzervovány s trvanlivostí až 10 let, po rozmražení je však jejich trvanlivost nejvýše 14 – 21 dní. Standardní trvanlivost EBR a ERD, které nejsou kryokonzervovány je 42 dnů po odběru. (10)

4.3 Trombocyty

Trombocytové transfuzní přípravky by neměly obsahovat viditelnou příměs erytrocytů. Při podání trombocytů není nutné shodu AB0 dodržet, přípravek se volí i na základě dalších kritérií. V situaci, kdy je nutné podat jinoskupinové trombocyty nepanuje shoda, zda upřednostnit kompatibilitu antigenů či aglutininů AB0 systému. Podáme-li trombocyty neshodné v AB0 antigenech s příjemcem (s ohledem na AB0 protilátky u příjemce) může to vést ke zkrácenému přežití podaných trombocytů. Pokud podáme trombocyty v plazmě, která obsahuje protilátky proti AB0 antigenům příjemce, může to vést k hemolýze erytrocytů příjemce. Ideální je podat trombocyty shodné v AB0 systému a u RhD negativních žen ve fertilním věku dodržet i RhD shodu. (10, 11)

Zkouška kompatibility se neprovádí.

Transfuzní přípravky trombocytů lze získat dvěma způsoby, odběrem z plné krve centrifugací nebo odběrem dárce na separátoru. Nejběžněji používanými přípravky trombocytů v transfuzní praxi jsou trombocyty z buffy-coatu směsné a trombocyty z aferézy. (10)

4.4 Plazma

Plazma stejně jako trombocyty nemá obsahovat viditelnou příměs erytrocytů. U plazmy se zkouška kompatibility nevyžaduje. Přesto se v AB0 systému dodržuje AB0 kompatibilita. (11)

Tabulka 5 AB0 a RhD slučitelnost u plazmy

AB0 slučitelnost		RhD slučitelnost
Příjemce	Transfuzní přípravek	Není nutné brát v potaz, lze podávat i RhD pozitivní plazmu RhD negativnímu příjemci
0	0, A, B, AB	
A	A, AB	
B	B, AB	
AB	AB	

Převzato: STL2022_16, verze 1

Plazma obsahuje v určitých koncentracích všechny koagulační faktory a jejich přirozené inhibitory. Proto se plazma dá použít buďto přímo, nebo jako surovina na přípravu produktů vyráběných průmyslovou frakcionací. (9, 11)

4.5 Granulocyty

Granulocyty jsou resuspendované v plazmě a naopak od dvou předešlých přípravků, obsahují významnou příměs erytrocytů. Při podání granulocytů se dává přednost podání přípravků shodných v AB0 a RhD systému. Před transfuzí granulocytů se vyžaduje test kompatibility, dále se může vyžadovat slučitelnost v HLA systému a to především u aloimunizovaných pacientů. Granulocytový koncentrát se získává aferézou od jednoho dárce. (4, 11)

4.6 Neonatální transfuze, intrauterinní (intraumbilikální) transfuze (IUT)

Transfuzní přípravky v tomto případě mají být AB0, RhD shodné nebo kompatibilní s novorozencem, vhodné je zároveň přihlédnout i ke krevní skupině matky pokud jde o erytrocytové přípravky. Při intrauterinní transfuzi se používají erytrocytové transfuzní přípravky krevní skupiny AB0 RhD kompatibilní jak s plodem, tak i s matkou. Nastane-li situace, kdy po předchozí IUT došlo ke změně krevní skupiny u plodu, použijí se přípravky skupinově shodné s předchozí IUT. Obvykle se používají erytrocyty 0 RhD negativní. (11)

5 INDIKAČNÍ KRITÉRIA A NALÉHAVOST PODÁNÍ

Podání transfuzního přípravku indikuje a objednává jej lékař. Podání musí být vždy správně odůvodněno. Transfuze je předepsána pouze v případě, kdy má její podání vyšší

přínos než její riziko. Lékař by měl vždy ještě zvážit i jiné možnosti léčby pacienta, s cílem minimalizovat potřebu transfuze. (9)

5.1 Indikační kritéria hemoterapie

Transfuze je v podstatě jen substituční léčba. Chybění nebo nedostatečné množství dané složky krve je potřebné doplnit transfuzním přípravkem s co nejmenší příměsí ostatních složek krve. O tom zda je transfuze nutná a jaký transfuzní přípravek je potřeba podat rozhodují určité faktory. (9)

5.1.1 Plná krev

Podání plné krve je indikováno při akutním krvácení se ztrátou více jak 25 % cirkulujícího objemu krve, při výměnné transfuzi a operaci s mimotělním oběhem. (9)

5.1.2 Erytrocytový koncentrát

Indikace pro podání erytrocytového koncentrátu je v případě:

- Před operací, a pokud je hladina Hb menší jak 80 g/l a nebo Ht menší než 0,26.

Při zvažování podání transfuze erytrocytů se mimo klinický stav a výsledku laboratorního vyšetření hemoglobinu a hematokritu berou v potaz další faktory:

- příčina, doba trvání a hloubka anémie,
- doba krvácení a množství krevních ztrát,
- kapacita kompenzačních mechanismů pacienta,
- přítomnost chorob zhoršující kompenzační mechanismy,
- posouzení volemie u akutní krevní ztráty. (9, 10)

5.1.3 Trombocytový koncentrát

Indikace podání je:

- Při trombocytopenii, kdy počet trombocytů klesne pod množství $50 \times 10^9/l$ s projevy krvácení, v rámci přípravy na chirurgický výkon nebo v pooperačním období.

Před tím než se rozhodne o podání trombocytového transfuzního přípravku, měla by být zjištěna příčina trombocytopenie.

Zda se rozhodne o podání trombocytů, je velmi individuální. Kromě počtu a funkčnosti trombocytů se do úvahy bere:

- velikost krvácení a
- rizikové faktory zvyšující pravděpodobnost krvácení (infekce, horečka nad 38 °C. (9, 10)

5.1.4 Čerstvá zmrazená plazma

Indikace při:

- prodloužení trombinového času o více jak čtyři sekundy a aktivovaného parciálního tromboplastinového času o více jak deset sekund,
- defektu jednoho koagulačního faktoru při nedostupnosti vhodného koncentrátu
- trombotické trombocytopenické purpuře a dalších. (9)

5.1.5 Transfuzní přípravky zbavené leukocytů

Podáváme při:

- prevenci aloimunizace antigeny leukocytů,
- prevenci přenosu CMV infekce (novorozenci, pacienti po transplantaci krvetvorby). (9)

5.1.6 Transfuzní přípravky chudé na leukocyty

Jsou indikovány při:

- prevenci nehemolytických potransfuzních reakcí,
- u pacientů bez dokázaných antileukocytových protilátek s nejméně dvěma nehemolytickými potransfuzními reakcemi v anamnéze,
- snížení rizika aloimunizace antigeny leukocytů. (9)

5.1.7 Ozářené transfuzní přípravky

Podání ozářeného přípravku je indikováno při prevenci reakce štěpu proti hostiteli – u pacientů s vrozenou, nebo získanou imunodeficiencí, při transfuzi od pokrevních příbuzných. (9)

5.2 Stupně naléhavosti požadavku

5.2.1 Vitální indikace

V případě vitální indikace je transfuzní přípravek vydán ihned bez provedení předtransfuzního laboratorního vyšetření.

a) Není známá krevní skupina AB0, RhD: vydává se transfuzní přípravek skupinově univerzální, to znamená

- **erytrocyty: 0 RhD negativní, pokud možno i Kell negativní**

0 RhD pozitivní a Kell pozitivní – v situaci absolutního nedostatku a přímého ohrožení života, je nutno zvážit rizika podání bez provedeného screeningu protilátek

- **plazma:** krevní skupiny AB
- **trombocyty:** můžeme použít přípravek jakékoli krevní skupiny, přednostně resuspendovaný v náhradním roztoku (6)

b) Známá krevní skupina AB0, RhD: po provedení ověření krevní skupiny se vydávají přednostně stejnoskupinové transfuzní přípravky

Za daných okolností nelze vyloučit vznik akutní potransfuzní hemolytické reakce, pacientovy protilátky se zjistí až při standardním předtransfuzním vyšetření!

Standardní předtransfuzní vyšetření je provedeno bezodkladně, ze vzorku dodaného hned jak je to možné. Vzorek krve je nutné odebrat zásadně před podáním transfuzního přípravku, pokud situace dovolí i jiných náhradních roztoků. O výsledku vyšetření je následně informováno klinické pracoviště. Pokud výsledek vyšetření naznačuje, že by předběžně vydané přípravky mohly být inkompatibilní, bez prodlení se informuje klinické pracoviště. Snahou je poté dle možností zastavit transfuzi nevhodných přípravků a dosud nepodané nahradit vhodnými. (6)

5.2.2 Statim

V tomto případě je transfuzní přípravek připraven k vydání co nejdříve po provedení kompletního předtransfuzního vyšetření v závislosti na typu a dostupnosti transfuzního přípravku a na počtu požadovaného množství. Pokud jde o erytrocytové transfuzní přípravky, obvyklá doba vydání je do 60 – 90 minut od převzetí vzorku. Může nastat situace,

kdy získáme komplikovaný imunohematologický nález, například z důvodu kombinace protilátek. V takové situaci se buď transfuze odloží, nebo se vybere nejméně rizikový přípravek, to vše závisí na dohodě s ošetřujícím lékařem a klinické situaci. (6)

5.2.3 Plánovaná transfuze

S takovou transfuzí se počítá, transfuzní přípravek je tedy k dispozici dle data, eventuálně hodiny na žádance. Může nastat situace, kdy nelze garantovat požadovaný termín pro zajištění vhodného přípravku a to při komplikovaném imunohematologickém nálezu. Dále se na základě domluvy s ošetřujícím lékařem a klinické situaci transfuze odloží, nebo se vybere nejméně rizikový přípravek. (6)

5.2.4 Plánovaný erytrocytový transfuzní přípravek do zálohy

V této situaci se neprovádí vlastní test kompatibility. Pouze se provede stanovení AB0, RhD a screening antierytrocytových protilátek pacienta a připraví se vhodný erytrocytový transfuzní přípravek. Ve chvíli kdy je potřeba transfuze, provede se test kompatibility. Tento postup však nemůžeme uplatnit u pacientů s prokázanými nepravidelnými protilátkami, opakovaně transfundovaných a u novorozenců. (6)

5.2.5 Masivní transfuze

Jedná se o náhradu ztráty minimálně jednoho celého objemu krve pacienta transfuzními přípravky (včetně náhradních roztoků) během 24 hodin. Jde tedy o podání ≥ 10 T.U. erytrocytů/24 hodin. T. U., je zkratka pro transfuzní jednotku, každá transfuzní jednotka erytrocytů, připravena z odběru plné krve i z aferézy, obsahuje nejméně 40 g hemoglobinu. Při transfuzi 1 T. U. erytrocytů pacientovi se jeho hladina hemoglobinu zvýší o 7-10 g/l a hematokritu o 0,03-0,04. Masivní transfuze může být definována i jako náhrada 50 % krevního objemu během 2-3 hodin, podáním minimálně 4 T.U. erytrocytů během 1 hodiny, pokračující krevní ztráta přesahující objem 150 ml/min nebo pokračující krevní ztráta 1,5 ml/kg po dobu delší než 20 minut. Masivní transfuze je neodkladná u cca 1-2 % pacientů s traumatem a nese s sebou značná rizika. (6, 10)

6 POTRANSFUZNÍ REAKCE

Každý krevní převod, představuje pro příjemce určité riziko, které musí být zváženo ordinujícím lékařem. Potransfuzní reakce je definována jako nežádoucí účinek podaného transfuzního přípravku. Riziko vzniku některých potransfuzních reakcí lze v dnešní době minimalizovat, a to například správnou výrobní praxí a dále správným postupem

v klinické části procesu podání transfuze – podání vzorku, vyplnění žádanky, zacházení s transfuzním přípravkem na klinickém oddělení včetně jeho aplikace pacientovi. Dále lze potransfuzní reakce ovlivnit preventivním opatřením (deleukotizace, ozáření), některé reakce lze ovlivnit jen tím, že se s jejich možným výskytem počítá a při jejich objevení jsou včas zahájeny vhodně diagnostické a léčebné postupy. Potransfuzní reakce dělíme na časné a pozdní, z klinického hlediska na lehké a těžké a dále i dle jiných kritérií. (12, 13)

6.1 Klasifikace potransfuzních reakcí

Dle příčiny:

1. transfuzí přenosné infekce
2. imunitní komplikace
3. kardiovaskulární a metabolické komplikace
4. neznámé komplikace

Podle časového průběhu:

- a) **Akutní** nežádoucí účinky jsou takové, které se vyskytují nejdéle do 24 hodin po aplikaci transfuze.
- b) **Pozdní** nežádoucí účinky transfuze se projevují s odstupem 24 hodin, několik dnů až týdnů po transfuzi.

Podle klinického průběhu:

- a) **Lehké** potransfuzní reakce odezní po zastavení transfuze a po jednoduché léčbě.
- b) **Závažné** způsobují orgánové poruchy. Následně se vyžaduje monitorování životních funkcí, tyto reakce mohou mít za následek smrt, poškozují zdraví nebo omezují schopnosti pacienta, mohou zapříčinit hospitalizaci, onemocnění nebo jejich prodloužení. (10)

6.1.1 Akutní hemolytická reakce

Jde o nejzávažnější ze všech potransfuzních reakcí, úmrtí nastává cca v 5-10 %. Akutní hemolytická potransfuzní reakce je způsobena převážně intravaskulární destrukcí červených krvinek protilátkami, které tvoří příjemce po podání transfuze. Nejčastější příčinou vzniku je podání krve neslučitelné v AB0 systému, kdy stačí 10-15 ml inkompatibilní

krve k tomu, aby se rozvinula její plná symptomatologie. Reakce se nejčastěji projevuje horečkou, případně se zimnicí a třesavkou, dále pocitem úzkosti, bolestí na hrudníku a v bederní oblasti, dušností, tachykardií a hypotenzí. Tento stav je život ohrožující zejména z důvodu akutního renálního selhání a rozvoje diseminované intravaskulární koagulaci. Důležité je včasné zastavení krevního převodu a zahájení včasné a správné léčby. (5, 14, 15)

6.1.2 Pozdní hemolytická reakce

V případě kdy má pacient aloprotilátky proti antigenům erytrocytů v transfuzním přípravku, vzniká pozdní hemolytická reakce. Jedná se o sekundární imunitní odpověď organismu příjemce. K imunizaci pacienta došlo například při předcházející transfuzi nebo v graviditě. Je zde i možnost, že reakce může vzniknout i po první transfuzi, kdy se mohou vytvořit protilátky proti podaným erytrocytům. Nejčastější příčinou vzniku je inkompatibilita ve skupinových systémech Kell, Kidd, Duffy, ta způsobí extravaskulární hemolýzu, jejíž průběh nebývá zpravidla tak dramatický jako při akutní hemolýze. Příznakem reakce je anémie, případně žloutenka, horečka, dušnost, hypotenze, tachykardie, bolest zad a další. Vyskytují se zpravidla 5-7 dní po transfuzi. (10)

6.1.3 Alergická reakce

Alergické reakce jsou způsobeny reakcí protilátek příjemce proti plazmatickým bílkovinám nebo alergenům, které jsou obsaženy v přípravku. Dochází k nim zejména po podání plazmy nebo trombocytárních transfuzních přípravků. Obvykle se projevuje jako kopřivka, svědění až dušnost, edém, cyanóza. Vzácnou příčinou bývá u příjemců kongenitální deficit IgA s přítomnými anti-IgA protilátkami. Reakce se projevuje hypotenzí se ztrátou vědomí, akutní dušností – anafylaktický šok, kopřivkou, generalizovaným svěděním. (13)

6.1.4 Poškození plic způsobené transfuzí – TRALI (Transfusion Related Acute Lung Injury)

Obecně jde o akutní, závažnou, život ohrožující reakci, která může nastat po podání jakéhokoli transfuzního přípravku. Reakci způsobují specifické anti-HLA nebo antigranulocytové protilátky (obvykle u dárkyň multipar) nebo biologicky aktivní lipidy přítomné v plazmě dárce, které reagují s leukocyty příjemce. Ve vzácných případech mohou reagovat protilátky v plazmě příjemce s leukocyty dárce. Antileukocytové protilátky působí adherenci granulocytů k plicnímu endotelu, následkem je uvolnění proteolytických enzymů a

kyslíkových radikálů. Tyto produkty působí poškození endoteliální výstelky dýchacích cest, obstrukci plicní mikrocirkulace a plicní edém. (10, 13)

Reakce se vyskytuje s frekvencí jeden na 5000 transfuzí a mortalita je 15 %. Mezi příznaky patří horečka, hypotenze a respirační selhání s diagnostickými oboustrannými symetrickými plicními infiltráty a hypoxemií bez přítomnosti srdečního selhávání. Dále pak rentgenový průkaz oboustranných plicních infiltrátů během transfuze nebo do 6 hodin po ní. (10, 13)

6.1.5 Transfuzí indukovaná reakce štěpu proti hostiteli TA-GvHD

Reakce nastává při uchycení alogenních imunokompetentních T-lymfocytů dárce, které proliferují a reagují proti příjemci. Jde o velmi vzácný, závažný život ohrožující stav, který často končí fatálně. Může nastat u transplantovaných pacientů, příjemců příbuzenských transfuzí, popsána byla i u pacientů léčených purinovými analogy nebo novorozenců s kongenitálním imunodeficitem. Projevuje se horečkami, výskytem kožních lézí, jaterní dysfunkcí, cholestatickou hepatitidou, nauzeou, zvracením, masivními průjmy, pancytopenií až aplazií kostní dřeně během 1-6 týdnů po transfuzi bez jiné příčiny. (10, 14)

6.1.6 Potransfuzní trombocytopenická purpura

Jde o velmi vzácnou, i když závažnou potransfuzní komplikaci, jejíž odhadovaný frekvenční výskyt je jeden na 50000 transfuzí. Se stoupajícím podílem de leukotizovaných přípravků v dnešní době, její výskyt dále klesá. Příčinou potransfuzní reakce je reakce antitrombocytových protilátek v krvi příjemce a transfundovaných trombocytů. Jde o sekundární imunitní odpověď, s nástupem 7-10 dní po podání trombocytů. Ke klinickým příznakům dochází během 5-12 dní po transfuzi a jsou jimi krvácení (purpura) a trombocytopenie. (9, 10)

6.1.7 Transfuzí způsobené oběhové přetížení – TACO (Transfusion Associated Circulatory Overload)

Reakce vzniká u velmi rychlých nebo velkoobjemových transfuzí, které vedou k akutní hypervolemii. Reakce může vést až k akutnímu plicnímu edému. Novorozenci, děti a pacienti starší 60 let jsou postiženi nejčastěji. Frekvence výskytu je 1-8 % příjemců transfuzí. Projevuje se kašlem, dušností, cyanózou, bolestí hlavy, tachykardií, srdeční selhání se rozvíjí do 12 hodin po aplikaci transfuze. (10)

6.1.8 Transfuzí přenosné infekce

Podáním krevní transfuze může být přeneseno kterýkoli infekční agens, které se v době odběru vyskytovalo v krevním oběhu dárce, nebo infekční agens, jímž byla krev kontaminována při odběru nebo zpracování. Nejnebezpečnější a z praktického hlediska největší význam mají infekce, které v době odběru nevyvolávají u dárce znatelné příznaky, nejsou rozpoznány. Jedná se o pozdní komplikace transfuze a klinický obraz se neliší od klasického obrazu dané infekce. Výjimkou jsou bakteriální infekce, které mohou probíhat pod obrazem akutní potransfuzní reakce. Potransfuzní infekce lze podle etiologie dělit na bakteriální, virové, parazitární a prionové. (9)

6.1.9 Febrilní nehemolytické potransfuzní reakce

Patří k nejčastějším potransfuzním reakcím. Vyskytuje se u polytransfundovaných pacientů s antileukocytovými protilátkami. Protilátky příjemce (anti-HLA protilátky) reagují s HLA antigeny na povrchu buněčných membrán buněk obsažených v transfuzním přípravku. Může být způsobena i cytokiny, které se uvolňují z leukocytů přítomných v přípravku. Prevencí je deleukotizace přípravků. Příznakem je zvýšení tělesné teploty nad 38°C nebo o ≥ 1 °C a/nebo třesavka, zimnice, nauzea či zvracení během transfuze nebo do 4 hodin po transfuzi bez zjevného důvodu. (1, 9)

7 ZÁKLADNÍ PŘEDTRANSFUZNÍ VYŠETŘENÍ

Základní předtransfuzní vyšetření, které provádíme na základě požadavku klinického pracoviště na transfuzní přípravek, zahrnuje vícero vyšetření: stanovení či ověření krevní skupiny v AB0 Rh(D) systému, screening protilátek proti erytrocytům, test kompatibility, u vybraných skupin pacientů vyšetření Rh-Kell fenotypu a při pozitivitě ve screeningu či testu kompatibility i identifikace protilátky proti erytrocytům. K vyšetření v imunohematologickém analyzátoru IH-500 na krevních skladech TO FN Plzeň se používá nesrážlivá krev (cca 4-6 ml), získaná odebráním do zkumavky obsahující protisrážlivou přísadu EDTA. Při manuálně prováděném vyšetření lze použít i srážlivou krev. Při předtransfuzním vyšetření lze pro screening protilátek a test kompatibility použít krevní vzorek do 3 dnů od jeho odběru. (6)

Při předtransfuzním vyšetření s požadavkem na erytrocytární transfuzní přípravky zásadně vždy z každého nového vzorku stanovíme či ověříme krevní skupinu, vyšetříme screening protilátek a provedeme testy kompatibility. (6)

7.1 Stanovení krevních skupin systému AB0 Rh(D)

Účelem je zjistit skupinové krevní vlastnosti AB0 systému stanovením aglutinogenů (antigenů A a B) na červených krvinkách pomocí diagnostických sér obsahující odpovídající specifické protilátky a stanovením aglutininů (přirozených protilátek anti-A a anti-B) ve vyšetřovaném séru (plazmě) pomocí známých (typových) krvinek. Výsledná skupina AB0 si musí v případě antigenů i protilátek odpovídat. (6)

Zároveň stanovujeme Rh(D) antigen na červených krvinkách, dvojmo různými monoklonálními diagnostickými séry anti-D. Při vyšetření Rh(D) antigenu rozlišujeme 3 kategorie výsledků:

RhD pozitivní = dochází k pozitivní reakci se všemi použitými diagnostickými séry anti-D

RhD negativní = nastává negativní reakce se všemi použitými diagnostickými séry anti-D

D^{w/v} (slabý antigen D/varianta antigenu D) = na slabý antigen D či variantu antigenu D je vhodné myslet například při slabší reakci všech použitých diagnostických sér anti-D nebo při diskrepantních reakcích (pozitivní x negativní).

Vyšetření antigenů a protilátek by mělo být provedeno u každého pacienta staršího 4 měsíců. U dětí do 4 měsíců věku provádíme vyšetření aglutinogenů duplicitně (nemají vyvinuté protilátky) pomocí 2 různých diagnostických sér pro každý antigen. Na TO FN Plzeň u dětí starších 4 měsíců cca až do 1 roku věku vyšetřujeme aglutinogeny duplicitně pokud stále chybí odpovídající protilátky. (6, 17)

Pro pacienta vybíráme transfuzní přípravky kompatibilní s jeho krevní skupinou, u novorozenců s hemolytickým onemocněním kompatibilní i s krevní skupinou matky. (6, 17)

Základní metody:

- **sklíčková metoda** – používá se k orientačnímu stanovení aglutinogenů včetně Rh(D). Slouží tedy k ověření krevní skupiny vzorku při zkoušce kompatibility, je-li skupina již známa z databáze, případně doprovází metodu sloupcové aglutinace či metodu zkumavkovou při prvním vyšetření krevní skupiny.
- **sloupcová aglutinace na ID-kartách** – používáme ji vždy při prvním vyšetření krevní skupiny pacienta. Stanovujeme aglutinogeny včetně Rh(D) a aglutininy.
- **zkumavková metoda** – pokud není použita jiná metoda, používáme ji při prvním vyšetření krevní skupiny pacienta zpravidla v urgentních situacích nebo při nejasných nálezech. Stanovujeme aglutinogeny včetně Rh(D) a aglutininy.

Principem metody je aglutinační technika založená na reakci antigen - protilátka.
(17)

7.1.1 Vyšetření aglutinogenů a Rh(D) antigenu sklíčkovou metodou

Řádně označíme podložní destičky (skla) číslem vyšetření. Na předem označená místa na destičce se nakape po jedné kapce diagnostického séra anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D (určené na sklo) a přidá se po jedné kapce plné krve. Rohem podložního sklíčka (otáčíme, používáme na každé sérum jiný roh) se jednotlivé kapky pečlivě smísí a rozprostřou se do kruhových ploch o průměru cca 2 cm. Reakce se nechá 2 minuty při pokojové

teplotě v klidu proběhnout. Následně se s destičkou kývavě pohybuje a makroskopicky se sleduje tvorba shluků – aglutinace. Reakce se hodnotí jako negativní nebo pozitivní. (17)

7.1.2 Vyšetření aglutinogenů a Rh(D) antigenu včetně aglutininů zkumavkovou metodou

Vyšetření aglutinogenů a Rh(D) antigenu

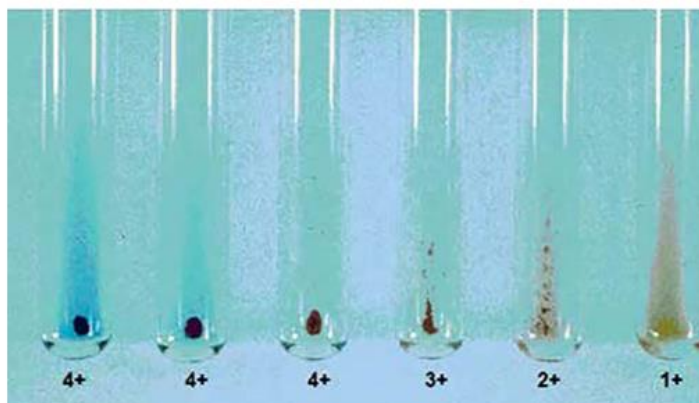
Do připravených a předem popsanych 4 zkumavek se nakape po dvou kapkách diagnostického séra anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D (určené do zkumavky). Přidá se po dvou kapkách 3-5% suspenze vyšetřovaných krvinek ve fyziologickém roztoku (krvinky se jedenkrát promyjí fyziologickým roztokem). Po protřepání zkumavek tak, aby se kapky smísily, se dají zkumavky centrifugovat na 20 sekund při 1000 rcf (záleží na kalibraci centrifugy). Poté se mírným poklepem zvirí sediment a makroskopicky se hodnotí aglutinace. V případě jemné aglutinace kontrola probíhá mikroskopicky. (17)

Vyšetření aglutininů zkumavkovou metodou

Připraví se 3 aglutinační zkumavky a označí se číslem vyšetření. Po dvou kapkách se do nich nakape vyšetřovaná plazma. K plazmě se po dvou kapkách přidá 3-5% suspenze známých krvinek 0, A1 a B. Dle potřeby lze použít i známé typové krvinky A2. Zkumavky se protřepají a dají centrifugovat na 20 sekund při 1000 rcf (záleží na kalibraci centrifugy). Poté se mírným poklepem zvirí sediment a makroskopicky se hodnotí aglutinace. V případě jemné aglutinace kontrola probíhá mikroskopicky. Pokud nastane situace, kdy neočekávaně chybí pozitivní reakce na aglutininy, je nutné vyšetření zopakovat s tím, že po protřepání nastává inkubace 30 minut při + 2 až + 8 °C. Až poté se provádí centrifugace a odečet.

Krevní skupina se určuje po porovnání výsledků vyšetření aglutinogenů a vyšetření aglutininů. (17)

Obrázek 3 Vyhodnocení zkumavkové metody



Zdroj: Praktická imunohematologie - erytrocyty

7.1.3 Stanovení krevních skupin AB0/RhD metodou sloupcové aglutinace

Lze vyšetřovat nesrážlivé vzorky v analyzátoru IH-500 nebo následujícím způsobem z nesrážlivých i srážlivých vzorků manuálně.

Sloupcová/gelová aglutinace umožňuje detekci aglutinačních reakcí červených krvinek. Pokud se na antigeny červených krvinek naváží odpovídající protilátky přítomné v reagentii nebo vzorku séra či plazmy, dochází k viditelné aglutinaci. Do předem označené zkumavky číslem vyšetření se odsaje plazma (sérum) pacienta. Do další stejně označené zkumavky se odsaje část krvinek pacienta. Následujícím způsobem se připraví 5% suspenze erytrocytů pacienta v ID-Diluentu 2, která se připravuje stejným způsobem i pro většinu ostatních popsaných stanovení:

1. Do čisté označené zkumavky se napipetuje 0,5 ml ID-Diluentu 2.
2. Následně se přidá 25 μ l koncentrátu erytrocytů nebo 50 μ l plné krve, zkumavka se poté jemně protřepe.

Stanovení krevní skupiny na kartě DiaClon AB0/D + Reverse Grouping (A, B, DVI-, ctl/A₁, B)

1. ID-Karta se označí číslem vyšetření.
2. Kartu je nutné držet ve vzpřímené pozici a odstranit aluminiovou folii.
3. Do mikrozkušavky 5 (A₁) se napipetuje 50 μ l ID-DiaCell A₁.
4. Do mikrozkušavky 6 (B) se napipetuje 50 μ l ID-DiaCell B.

5. Do obou mikroskopických zkumavek 5 a 6 se přidá 50 µl plazmy nebo séra pacienta. Dále je doporučena inkubace 10 minut při laboratorní teplotě (+18 až +25 °C).
6. Do mikroskopických zkumavek 1 - 4 (A,B,D,ctl.) se následně napipetuje 10 µl nebo 12,5 µl suspenze erytrocytů pacienta.
7. ID-Karta se nechá 10 minut centrifugovat v ID-Centrifuze.
8. Odečtou a zaznamenají se výsledky. (18)

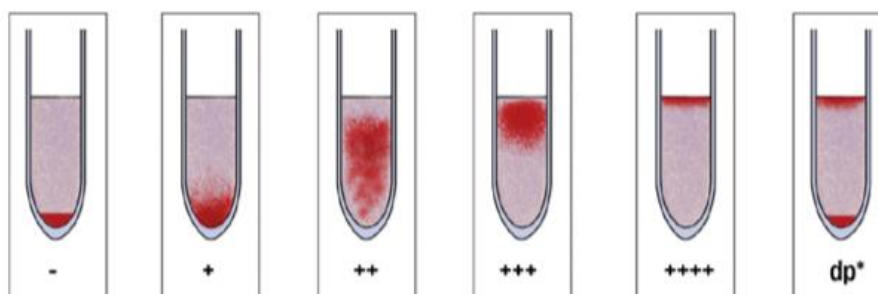
Stanovení 2. Rh(D) na kartě DiaClo Anti-DVI neg.

1. Mikroskopická zkumavka ID karty se označí číslem vyšetření.
2. Kartu je potřeba držet ve vzpřímené pozici a odstranit aluminiovou folii z požadovaných mikroskopických zkumavek.
3. Do příslušné označené mikroskopické zkumavky se napipetuje 10 µl nebo 12,5 µl suspenze erytrocytů pacienta.
4. Centrifugace ID-Karty probíhá 10 minut v ID-Centrifuze.
5. Odečtou a zaznamenají se výsledky.

Pozitivní výsledek – aglutinované erytrocyty vytvářejí na povrchu gelu červenou linku nebo jsou v gelu rozptýleny

Negativní reakce – kompaktní sediment erytrocytů na dně zkumavky (18)

Obrázek 4 Hodnocení sloupcové aglutinace



Zdroj: Praktická imunohematologie – erytrocyty

*dvojitá populace

Tabulka 6 Hodnocení reakcí AB0 krevních skupin při stanovení aglutinogenů

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

Převzato: SOPV/TO/016/04

V mikrozkušavce ctl musí probíhat negativní reakce. Pokud tomu tak není, pak určení AB0 není platné.

Tabulka 7 Hodnocení reakcí při stanovení aglutininů AB

Diagnostikum		Krevní skupina
A ₁	B	
+ až ++++	negativní	B
negativní	+ až ++++	A
+ až ++++	+ až ++++	0
negativní	negativní	AB

Převzato: SOPV/TO/016/04

Tabulka 8 Hodnocení reakcí Rh(D)

+++ až ++++	± až ++*	negativní
Rh(D) pozitivní	Rh(D) slabě pozitivní	Rh(D) negativní

Převzato: SOPV/TO/016/04

* Rh(D) slabě pozitivní by měly být podrobeny dalšímu vyšetření, zda se jedná o slabé Rh(D) nebo parciální typy antigenu D přiměřeně tomu, o jaký testovaný vzorek se jedná. Není-li to možné, pacienta (či těhotnou) uzavřeme jako Rh(D) negativní a podáváme Rh(D) negativní erytrocytární transfuzní přípravky. Použité anti-D nereaguje s DVI variantami.

Veškeré diskrepance nalezené při vyšetření krevních skupin je vždy nutné konzultovat s lékařem TO. (18)

7.2 Vyšetření Rh-Kell fenotypu

Vedle antigenu Rh(D) jsou dalšími významnými antigeny C, c, E, e a Kell jejichž shoda u pacienta a erytrocytárních TP vede k bezpečnější a účelnější hemoterapii.

Odpovídající antigen pozitivní erytrocyty TP mohou stimulovat produkci protilátek u osob negativních na antigen C,c,E,e a Kell. Z tohoto důvodu je stanovení fenotypů Rh-Kell důležité během těhotenství, u dívek a žen ve fertlím věku (do 50 let), pro pacienty již dříve transfundované, pro pacienty se známými nepravidelnými protilátkami, u hematologicky nemocných pacientů s předpokládanou potřebou opakovaných transfuzí (např. chronická lymfatická leukémie, myelodysplastický syndrom, před podáním Daratumumabu (anti-CD 38) při diagnóze myelom...atd.)

Přibližně 9% osob kavkazské rasy je Kell pozitivních. Antigen Kell je silně imunogenní. Je známo, že protilátka anti-Kell může být příčinou akutní i pozdní hemolytické potransfuzní reakce a hemolytického onemocnění novorozenců.

Lze vyšetřovat nesrážlivé vzorky v analyzátoru IH-500 nebo následujícím způsobem z nesrážlivých i srážlivých vzorků manuálně (19)

7.2.1 Stanovení fenotypů Rh a Kell na ID-Kartě DiaClon Rh-Subgroups + K

1. ID-Karta se označí číslem vyšetření.
2. Kartu je potřeba držet ve vzpřímené pozici a odstranit aluminiovou folii ze všech mikrozkušavek.
3. Do všech mikrozkušavek ID-Karty se napipetuje 10 µl nebo 12,5 µl suspenze erytrocytů pacienta.
4. Centrifugace ID-Karty probíhá 10 minut v ID-Centrifuze.
5. Odečtou a zaznamenají se výsledky.

Pozitivní výsledek – aglutinované erytrocyty vytvářejí na povrchu gelu červenou linku nebo jsou v gelu rozptýleny

Negativní reakce – kompaktní sediment erytrocytů na dně zkumavky

Hodnocení reakcí při stanovení fenotypu Rh a Kell:

- pozitivní reakce (+ až +++) indikuje přítomnost odpovídajícího antigenu,
- reakce slabší nebo rovné 2+ mohou indikovat přítomnost slabé nebo variantní formy antigenu,
- negativní reakce indikuje nepřítomnost odpovídajícího antigenu,
- po podání erytrocytárních TP v posledních 3 – 4 měsících, můžeme v mikroskopu zaznamenat dvojí populaci erytrocytů. (19)

7.3 Vyšetření screeningu protilátek proti erytrocytům

Screeningové vyšetření nepravidelných protilátek přítomných v séru (plazmě) pacienta proti erytrocytům dárce má zásadní vliv na bezpečnost transfuze.

Screening protilátek je nutné provést metodou detekující významné protilátky - povinné je použití nepřímého antiglobulinového (NAT,AGH) testu a inkubace při 37 °C. NAT může být doplněn dalšími typy testů (enzymový test – papainem či bromelinem ošetřené diagnostické erytrocyty). Enzymový test krevní sklady používají při diagnózách těhotenství, porod, potrat, šestinedělí, při vyšetření potransfuzních reakcí, u pacientů s protilátkami nebo nespecifickými nálezy v NAT či enzymovém testu při zkouškách kompatibility, u dětí do 1 roku věku (pokud lékař nerozhodne jinak), při pozitivním screeningu provedeném jen v NAT, při vyšetření nejasných imunohematologických nálezů pro externí žadatele. (6, 20)

K detekci protilátek se používají diagnostické erytrocyty jednotlivých dárců skupiny 0, převážně v tříkrvinkových setech. Na základě shody získané reaktivity séra (plazmy) se známými antigeny (reakce antigenu a protilátky) je možné detekovat protilátky. Není-li screening protilátek či test kompatibility negativní, pak je nutné provést identifikaci protilátky. (6, 20)

7.3.1 Screening protilátek nepřímým antiglobulinovým testem (NAT)

NAT je považován za referenční techniku v případě, kdy je ve zkumavkovém provedení s použitím erytrocytů resuspendovaných v roztoku o nízké iontové síle (LISS-NAT). Standardní metodou na TO FN PLzeň je test sloupcové aglutinace LISS-NAT při 37 °C.

Lze vyšetřovat nesrážlivé vzorky v analyzátoru IH-500 nebo následujícím způsobem z nesrážlivých i srážlivých vzorků manuálně. (20)

Příprava suspenze erytrocytů pro screening protilátek, identifikaci protilátek a test kompatibility

Do předem označené zkumavky číslem vyšetření se odsaje plazma (sérum) pacienta. Následně se do další označené zkumavky odsaje část erytrocytů pacienta a na promývací centrifuze se 1x properou ve fyziologickém roztoku. Do další zkumavky se nadávkuje 0,5 ml ID Diluentu 2 a 5 μ l propraných erytrocytů pacienta. Jemným protřepáním se připraví suspenze erytrocytů.

Postup screeningu protilátek NAT:

Použijí se diagnostické erytrocyty ID-DiaCell I-II-III připravené k přímému použití.

1. Příslušné mikrozkušavky ID karty LISS/Coombs se označí číslem vyšetření.
2. ID-Kartu je nutné držet ve vzpřímené pozici a z požadovaných mikrozkušavek se odstraní aluminiová fólie.
3. Do příslušných mikrozkušavek se napipetuje 50 μ l jednotlivých diagnostických erytrocytů.
4. V případě, že je ve vyšetření zahrnuta autokontrola, napipetuje se 50 μ l suspenze vlastních erytrocytů vzorku do příslušné mikrozkušavky označené jako VL.
5. Následně se do každé mikrozkušavky přidá 25 μ l plazmy/séra pacienta.
6. Inkubace ID-Karty probíhá 15 minut při 37 °C v inkubátoru.
7. Dále se ID-Karta centrifuguje 10 minut v ID-Centrifuze.
8. Odečtou se a zaznamenají výsledky.

7.3.2 Screening protilátek enzymovým testem s papainizovanými krvinkami

Enzymový test (ET), je používán jako doplňková technika, pouze vzácně je citlivější než NAT. Provedení ET může být jednostupňové (v reakci erytrocyty + enzym/bromelin, papain + sérum/plazma), nebo citlivější **dvoustupňové** (v reakci pouze enzymaticky, papain/ upravené erytrocyty + sérum plazma). Na TO FN Plzeň provádíme citlivější dvoustupňové provedení.

Postup enzymového testu:

Použijí se diagnostické erythrocyty ID-DiaCell I-II-III P.

1. Příslušné mikrozkušavky ID karty NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins se označí číslem vyšetření.
2. ID-Kartu je nutné držet ve vzpřímené pozici a z požadovaných mikrozkušavek se odstraní aluminiová fólie.
3. Do příslušných mikrozkušavek se napipetuje 50 μ l jednotlivých diagnostických erythrocytů.
4. V případě, že je ve vyšetření zahrnuta autokontrola, napipetuje se 50 μ l suspenze vlastních erythrocytů vzorku do příslušné mikrozkušavky označené jako VL.
5. Následně se do každé mikrozkušavky přidá 25 μ l plazmy/séra pacienta.
6. Do mikrozkušavky určené pro autokontrolu se napipetuje 25 μ l ID-Papainu.
7. Inkubace ID-Karty probíhá 15 minut při 37 °C v inkubátoru.
8. Dále se ID-Karta centrifuguje 10 minut v ID-Centrifuze.
9. Odečtou se a zaznamenají výsledky.

Z každého nového vzorku vždy provádíme screening protilátek v NAT. Enzymovým testem s papainizovanými krvinkami u vybraných skupin viz kapitola 7.3. (20)

7.4 Identifikace protilátek proti erythrocytům

Identifikace protilátek se provádí po vyhodnocení pozitivních reakcí při screeningu nebo zkoušce kompatibility. Ke stanovení specifity protilátky je nutné použít diagnostické erythrocyty, které mají větší počet různých známých antigenních kombinací a tím umožňují identifikovat danou protilátku. Každé šarži diagnostických erythrocytů je přidělen rozpis (panel) analyzující jednotlivé antigeny. Podle shody získané reaktivity séra (plazmy) se známými antigeny je možné identifikovat protilátku. Identifikaci provádíme technikou nepřímého antiglobulinového testu (NAT,AGH) a enzymovou technikou (papainem ošetřené diagnostické erythrocyty) a inkubaci při 37 °C. (16, 20)

Identifikovaná protilátka se potvrdí jako aloprotilátka chyběním antigenu na pacientových erythrocytech. Oproti tomu autoprottilátka je namířena proti antigenu, který je na pacientových erythrocytech přítomen. Identifikované protilátky hodnotíme z hlediska kli-

nické významnosti. Klinicky významná protilátka je taková, která může způsobit zrychlenou destrukci signifikantního množství transfundovaných erytrocytů, s daným antigenem. Provedení autologní kontroly při rutinním předtransfuzním vyšetření není povinné. Stanovení protilátek proti erytrocytům se provádí manuálně. Možno provádět z nesrážlivých (EDTA) i srážlivých vzorků. (16, 20)

Po identifikaci aloprotilátky vybíráme pro pacienta erytrocytární TP tak, aby byl negativní pro daný antigen, proti kterému je protilátka namířena, a měl negativní test kompatibility. Totéž platí i v případě klinicky významné autoprotilátky (např. autoanti-e) u klinicky významné hemolýzy (hemoglobin ≤ 70 g/l, event. laboratorní průkaz hemolýzy nebo průkaz klinické významnosti přímého antiglobulinového testu). V ostatních případech autoprotilátek podáváme erytrocytové přípravky fenotypově shodné s příjemcem. (16, 20)

7.4.1 Identifikace protilátek NAT

Použijí se diagnostické erytrocyty ID-DiaPanel připravené k přímému použití.

1. Dvě ID-Karty LISS/Coombs se označí číslem vyšetření a nápisem PANEL.
2. ID-Kartu je nutné držet ve vzpřímené pozici a z požadovaných mikrozkušavek se odstraní aluminiová fólie.
3. Do příslušných mikrozkušavek označených 1 -11 se napipetuje 50 μ l jednotlivých diagnostických erytrocytů 1 – 11.
4. V případě, že je ve vyšetření zahrnuta autokontrola, napipetuje se 50 μ l suspenze vlastních erytrocytů vzorku do 12 mikrozkušavky označené jako VL.
5. Následně se do každé mikrozkušavky přidá 25 μ l plazmy/séra pacienta.
6. Inkubace ID-Karty probíhá 15 minut při 37 °C v inkubátoru.
7. Dále se ID-Karta centrifuguje 10 minut v ID-Centrifuze.
8. Odečtou se a zaznamenají výsledky.

7.4.2 Identifikace protilátek enzymovým testem s papainizovanými krvinkami

Použijí se diagnostické erytrocyty ID-DiaPanel P.

1. Dvě ID-karty NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins se označí číslem vyšetření a nápisem PANEL.

2. ID-Kartu je nutné držet ve vzpřímené pozici a z požadovaných mikroskopavek se odstraní aluminiová fólie.
3. Do příslušných mikroskopavek označených 1 -11 se napipetuje 50 µl jednotlivých diagnostických erytrocytů 1 – 11.
4. V případě, že je ve vyšetření zahrnuta autokontrola, napipetuje se 50 µl suspenze vlastních erytrocytů vzorku do 12 mikroskopavky označené jako VL.
5. Následně se do každé mikroskopavky přidá 25 µl plazmy/séra pacienta.
6. Do mikroskopavky určené pro autokontrolu se napipetuje 25 µl ID-Papainu.
7. Inkubace ID-Karty probíhá 15 minut při 37 °C v inkubátoru.
8. Dále se ID-Karta centrifuguje 10 minut v ID-Centrifuze.
9. Odečtou se a zaznamenají výsledky. (20)

7.5 Test kompatibility

Cílem testu kompatibility je zjištění přítomnosti či nepřítomnosti nepravidelných protilátek v krvi pacienta, které jsou specificky namířené proti antigenům červených krvinek dárce (erytrocytárního TP). U plánovaných příjemců transfuze je na pracovišti TO FN Plzeň platnost testu kompatibility omezena na **72 hodin** od data a času odběru vzorku. V případě, že daný pacient potřebuje transfuzi po uplynutí této lhůty, je nutno provést test kompatibility z nového vzorku odebrané krve a na základě nové žádanky. Standardně se test kompatibility provádí metodou s citlivostí odpovídající LISS-NAT při 37 °C. Test kompatibility enzymovým papainovým jednostupňovým testem se provádí výjimečně (např. u pacientů po podání anti-CD 38).

Lze vyšetřovat nesrážlivé vzorky v analyzátoru IH-500 nebo následujícím způsobem z nesrážlivých i srážlivých vzorků manuálně. (16, 20)

7.5.1 Test kompatibility NAT

Zkumavky pro vzorky krevních konzerv (vybrány dle krevní skupiny pacienta) se označí číslem vyšetření, číslem odběru krevní konzervy a pořadovým číslem dle počtu konzerv (1,2,3,4...atd.). Obsah segmentu vybraných krevních konzerv se vypustí do předem připravených zkumavek.

Do další předem připravené zkumavky se nadávkuje 0,5 ml ID-Diluentu 2 a 5 μ l krvinek daného segmentu. Jemným poklepáním na zkumavku se vytvoří suspenze erytrocytů, která se dále využívá k vlastnímu testu kompatibility.

1. Příslušné mikrozkušavky ID karty LISS/Coombs se označí číslem vyšetření.
2. Jednotlivé mikrozkušavky se označí pořadovým číslem konzervy nebo jejich odběrovým číslem.
3. ID-Kartu je nutné držet ve vzpřímené pozici a z požadovaných mikrozkušavek se odstraní aluminiová fólie.
4. Do příslušných mikrozkušavek se napipetuje 50 μ l erytrocytů krevní konzervy.
5. Následně se do každé mikrozkušavky přidá 25 μ l plazmy/séra pacienta.
6. Inkubace ID-Karty probíhá 15 minut při 37 °C v inkubátoru.
7. Dále se ID-Karta centrifuguje 10 minut v ID-Centrifuze.
8. Odečtou se a zaznamenají výsledky.

Provedení testu kompatibility v NAT je povinné, provádíme jej vždy.

7.5.2 Test kompatibility enzymovým papainovým testem (jednostupňový test)

Na TO FN Plzeň se standardně nepoužívá. Provádí se výjimečně z rozhodnutí lékaře TO.

1. Příslušné mikrozkušavky ID-karty NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins se označí číslem vyšetření.
2. Jednotlivé mikrozkušavky se označí pořadovým číslem konzervy nebo jejich odběrovým číslem.
3. ID-Kartu je nutné držet ve vzpřímené pozici a z požadovaných mikrozkušavek se odstraní aluminiová fólie.
4. Do příslušné mikrozkušavky se napipetuje 50 μ l suspenze erytrocytů krevní konzervy.
5. Následně se do každé mikrozkušavky přidá 25 μ l plazmy/séra pacienta.
6. Do každé mikrozkušavky se dále napipetuje 25 μ l ID-Papainu.
7. Inkubace ID-Karty probíhá 15 minut při 37 °C v inkubátoru.

8. Dále se ID-Karta centrifuguje 10 minut v ID-Centrifuze.

9. Odečtou se a zaznamenají výsledky.(20)

Zhodnocení testu kompatibility:

- **negativní reakce** – kompatibilní
- **pozitivní reakce** – inkompatibilní (20)

Tabulka 9 Makroskopické zhodnocení reakcí při screeningu, identifikaci protilátky, testu kompatibility

Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Slabě pozitivní	Negativní
++++	+++	++	+	+/-	-

Převzato: SOPV/TO/015/04

PRAKTICKÁ ČÁST

8 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

8.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem mé bakalářské práce je zhodnotit četnost výskytu aloprotilátek proti erytrocytům u transfundovaných pacientů na krevních skladech TO FN Plzeň. Zjistit, zda výběr erytrocytárních transfuzních přípravků dle Rh-Kell fenotypu pro konkrétní pacienty vede ke snížení četnosti výskytu protilátek.

8.2 Dílčí cíle

1. Zhodnotit počty nově nalezených erytrocytárních aloprotilátek v období roku 2015-2022.
2. Zhodnotit počty jednotlivých nově nalezených erytrocytárních aloprotilátek mezi sebou.
3. Zjistit, zda se v nalezených erytrocytárních aloprotilátkách nacházejí protilátky s četnějším výskytem a jak se jejich počty mění v průběhu let 2015 - 2022.
4. Zhodnotit zda výběr erytrocytárních transfuzních přípravků pro konkrétního pacienta dle Rh-Kell fenotypu vede ke snížení četnosti výskytu aloprotilátek.

9 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

- Vyskytl se v průběhu let 2015 – 2022 nějaký faktor, který by ovlivnil počty pozitivních vzorků na erytrocytární aloprotilátky?
- Objevují se v jednotlivých letech erytrocytární aloprotilátky s čtenějším výskytem?
- Mění se množství pozitivních vzorků na danou aloprotilátku v průběhu let?
- Ovlivňuje výběr erytrocytárních transfuzních přípravků dle Rh-Kell fenotypu pro konkrétního pacienta četnost výskytu aloprotilátek?

10 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

K dispozici jsem měla počty vyšetřených vzorků na obou krevních skladech Transfuzního oddělení ve Fakultní nemocnici v Plzni. Konkrétně šlo o přehled provedených laboratorních metod od 1. 1. 2015 do 31. 12. 2022 z krevního skladu na Lochotíně a krevního skladu na Borech. V případě pozitivního nálezu erytrocytární aloprotilátky se musí tento nález vždy zaznamenat. Dále jsem tedy měla k dispozici seznam nalezených protilátek v období od 1. 1. 2015 do 31. 12. 2022.

11 METODIKA PRÁCE

Z dokumentu obsahujícího počty provedených laboratorních metod na krevních skladech Transfuzního oddělení ve Fakultní nemocnici v Plzni jsem vyhledala informaci o celkovém počtu vyšetřených vzorků za jednotlivý rok 2015 – 2022. Za jednotlivý rok jsem vždy stanovila počet negativních vzorků a počet pozitivních vzorků na erytrocytární aloprotilátku. Jednotlivé roky jsem mezi sebou dále porovnávala a zhodnotila výsledky. Zaměřila jsem se na okolnosti, které mohly ovlivnit nálezy protilátek.

Dále jsem měla k dispozici počty nalezených konkrétních erytrocytárních aloprotilátek za jednotlivé roky 2015 – 2022. Počty nalezených protilátek jsem mezi sebou porovnávala a pozorovala četnost jejich výskytu. U protilátek Rh systému (anti-D, anti-C, anti-c, anti-E, anti-e) a systému Kell jsem provedla porovnání četnosti výskytu za období 2015 – 2022. Zjišťovala jsem rok, kdy byla jejich četnost výskytu nejvyšší a okolnosti, které k tomu vedly.

Analyzovaná data jsem zpracovala do tabulek a grafů, které jsou součástí praktické části a přílohy A, C a D.

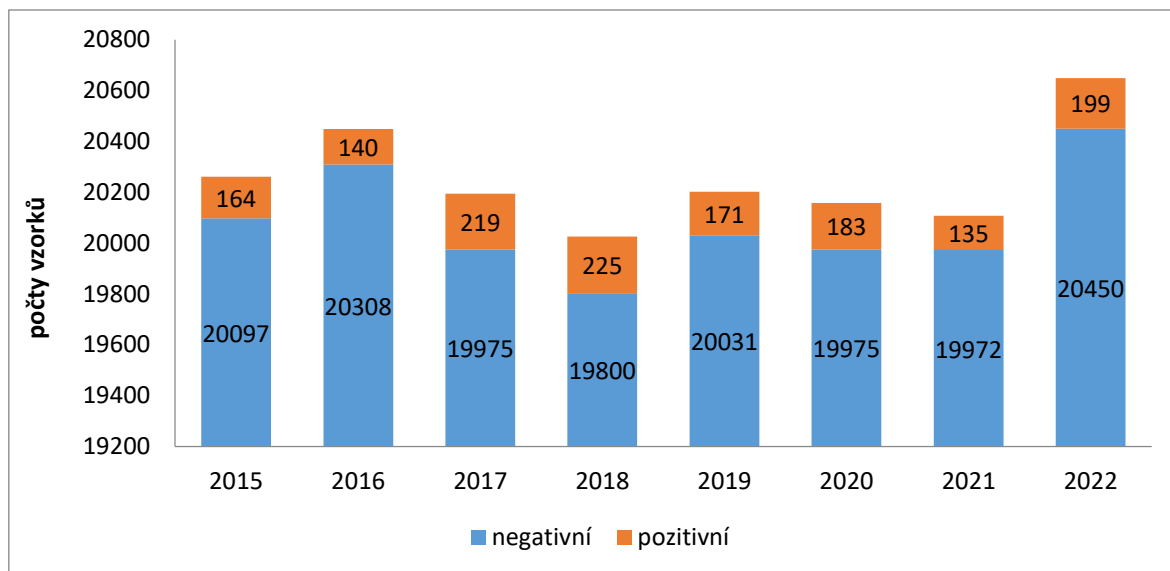
12 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

12.1 Analýza pozitivních a negativních vzorků

V průběhu sledovaného období se pozměňovala metodika práce, což mělo vliv na počet vzorků pozitivních na erytrocytární aloprotilátku. Počty pozitivních vzorků jsou dále ovlivněny celkovým počtem vyšetřovaných vzorků, který se ve sledovaném období také měnil. Výkyvy v počtu pacientů s protilátkami pravděpodobně ovlivnilo i covidové období, kdy došlo k útlumu plánované operativy a tedy i k menšímu záchytu pacientů s protilátkami.

V přiloženém grafu vidíme počty negativních a pozitivních vzorků na erytrocytární aloprotilátku a zároveň celkové počty vyšetřovaných vzorků. Graf vychází z tabulky, která je součástí přílohy C.

Graf 1 Počet pozitivních a negativních vzorků z celkového počtu vyšetřovaných vzorků pro jednotlivé roky 2015-2022



Zdroj vlastní

Do roku 2016 včetně byla na TO Fakultní nemocnice Plzeň ke screeningu protilátek používána metoda sloupcové aglutinace - NAT současně s enzymovým bromelinovým testem v jednostupňovém méně citlivém provedení (v reakci erytrocyty + enzym bromelin + sérum/plazma). Screenings a identifikace protilátky byly prováděny (kapány) manuálně.

Od roku 2017 se do provozu krevních skladů zavedl imuno hematologický analyzátor IH-500. Na obou krevních skladech se screening protilátek začal vyšetřovat metodou sloupcové

vé aglutinace a byl prováděn v NAT současně s enzymovým papainovým testem v dvoustupňovém více citlivém provedení (v reakci pouze enzymaticky papainem upravené erythrocyty + sérum/plazma). Screening se od tohoto roku testoval v analyzátoru, při pozitivním záchytu ve screeningu protilátek se identifikace protilátky ze vzorku dále vyšetřovala manuálně. Zavedení citlivější enzymové metody mělo za následek nárůst záchytu protilátek zejména v enzymovém testu (anti-E, klinicky nevýznamná anti-Le(a)) a bohužel i nespecifických reakcí, které v urgentních situacích zbytečně prodlužovaly předtransfuzní vyšetření.

Proto se od 4. čtvrtletí roku 2018 screening protilátek začal vyšetřovat metodou sloupcové aglutinace NAT testem vždy, enzymovým papainovým testem v dvoustupňovém provedení jen u vybraných skupin pacientů (u diagnóz těhotenství, porod, potrat, šestinedělí, potransfuzní reakce, pacienti s protilátkami a nejasnými imunohematologickými nálezy, děti do jednoho roku věku). Zároveň bylo od počátku roku 2018 zahájeno rutinní vyšetřování Rh-Kell (C,c,E,e,Kell) fenotypu u žen ve fertilním věku (do 50 let), u pacientů se známými nepravidelnými protilátkami, u nemocných s předpokládanou potřebou opakovaných transfuzí (pacienti s hematologickými diagnózami). Erythrocytární transfuzní přípravky jsou vybírány pro výše uvedené skupiny dle Rh-Kell fenotypu a optimálně i Cw negativní.

Od roku 2019 jsem zaznamenala pokles záchytu protilátek, který je způsobený prováděním screeningu převážně jen v NAT. Tento pokles záchytu protilátek ve srovnání s roky 2015 a 2016, kdy byl prováděn NAT a méně citlivá enzymová metoda, není výrazný.

V letech 2020 – 2021 se záchyty protilátek nijak výrazně nezvyšovaly, pravděpodobným důvodem je již zmiňované covidové období, kdy prakticky všude ve Fakultní nemocnici byli hospitalizováni pacienti s onemocněním COVID-19 (staří, oslabení, pacienti s onkologickými a hematoonkologickými chorobami, atd.)

V posledním analyzovaném roce 2022 jsem zaznamenala nárůst počtu vyšetřovaných pacientů a s tím patrně i související nárůst záchytu protilátek. Zvýšení počtu v tomto roce je pravděpodobně způsobené nárůstem operativy, který nastal v závislosti na končícím covidovém období.

Následující tabulka vychází z tabulky, která je součástí přílohy C.

Tabulka 10 Poměrové zastoupení pozitivních pacientů s aloprotilátkou z celkového počtu vyšetřovaných za jednotlivé roky

2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%

Zdroj vlastní

V tabulce vidíme poměr pacientů s aloprotilátkou z celkového počtu vyšetřovaných vzorků. Vidíme, že poměr je ve sledovaném období konstantní, nemění se.

12.2 Četnost výskytu jednotlivých protilátek

V následující tabulce je zaznamenán záchyt jednotlivých erytrocytárních protilátek v průběhu analyzovaného období společně s uvedeným celkovým počtem zachycených protilátek za daný rok.

Z vytvořené tabulky vycházejí grafy znázorňující záchyt jednotlivých protilátek za jednotlivé roky, které jsou součástí přílohy A.

Tabulka 11 Počty pacientů s danou protilátkou za jednotlivé roky

Protilátky	Rok								Počet pacientů s protilátkou
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	
anti - D	20	14	21	29	26	24	18	22	174
anti - C	16	10	21	22	17	15	16	30	147
anti - c	6	9	7	10	10	11	5	4	62
anti - E	43	35	68	64	37	51	33	45	376
anti - e	1	2	-	2	2	4	2	3	16
anti - C ^w	10	7	14	19	12	15	7	15	99
anti - K	23	22	25	21	32	28	19	29	199
anti - k	-	-	-	-	-	2	1	-	3
anti - Kp(a)	-	2	2	1	1	-	-	-	6
anti - Fy(a)	11	6	10	3	1	7	4	5	47
anti - Fy(b)	-	-	-	-	-	-	2	1	3
anti - Jk(a)	5	3	9	5	5	5	6	13	51
anti - Jk(b)	-	1	2	1	1	1	1	-	7
anti - Le(a)	15	8	19	23	8	8	6	7	94
anti - Le(b)	2	4	6	4	3	3	3	2	27
anti - P(1)	-	1	-	1	-	-	-	-	2
anti - M	6	9	12	7	11	7	5	10	67
anti - N	-	-	-	-	1	-	-	-	1
anti - S	4	5	2	7	3	-	1	4	26
anti - s	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti - Lu(a)	2	2	1	5	1	2	6	9	28
anti - Lu(b)	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Celkový počet	164	140	219	225	171	183	135	199	

*Pomlčka (-) znamená, že daná protilátka nebyla v konkrétním roce zachycena

Zdroj vlastní

Z tabulky je patrné, že nejmenší záchyt byl u protilátek anti-k, anti-Fy(b), anti-P(1), anti-N, anti-s, anti-Lu(b). Tato čísla odpovídají i faktu, že jde o méně časté protilátky. Naopak protilátky Rh-Kell systému jsou častější, což můžeme opět potvrdit daty v tabulce s výjimkou protilátky anti-c, anti-e. Po nich co se týče četnosti dle analyzovaných dat, následují protilátky anti-C^w, anti-Le(a), anti-M, anti-Jk(a), anti-Fy(a), anti-Lu(a), anti-Le(b), anti-S, anti-Jk(b), anti-Kp(a). Protilátka s největší četností záchytu za sledované období je protilátka anti-E, následuje anti-Kell a anti-D.

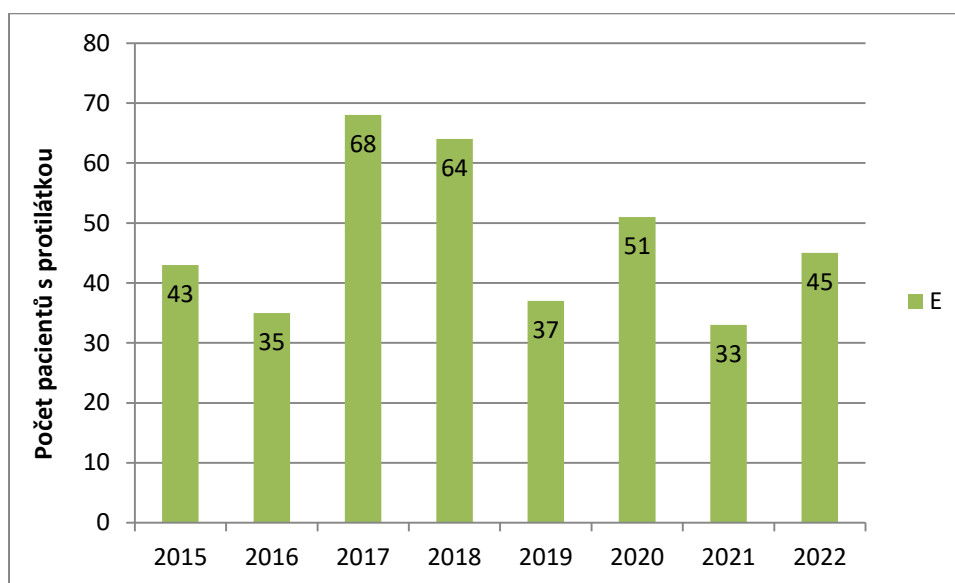
12.3 Vývoj výskytu protilátek Rh-Kell systému za sledované období

Rh protilátky, což jsou protilátky anti-D, anti-C, anti-c, anti-E, anti-e (reagující v NAT) jsou klinicky závažné.

12.3.1 Analýza výskytu protilátky anti-E ve sledovaném období

Výskyt protilátky anti-E na TO FN Plzeň, za období 2015 - 2022 jsem pro lepší vysvětlení zpracovala v následujícím grafu a tabulce, která zobrazuje poměr protilátky anti-E ze všech zachycených protilátek v daném roce. V každém roce byl celkový počet zaznamenaných protilátek jiný, z tohoto důvodu, pro lepší orientaci jsem použila poměr (procentuální zastoupení).

Graf 2 Počet pacientů s protilátkou anti-E za jednotlivé roky



Zdroj vlastní

Tabulka 12 Poměr protilátky anti-E ze všech zachycených protilátek za jednotlivé roky

protilátka	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
E	26%	25%	31%	28%	22%	28%	24%	23%

Zdroj vlastní

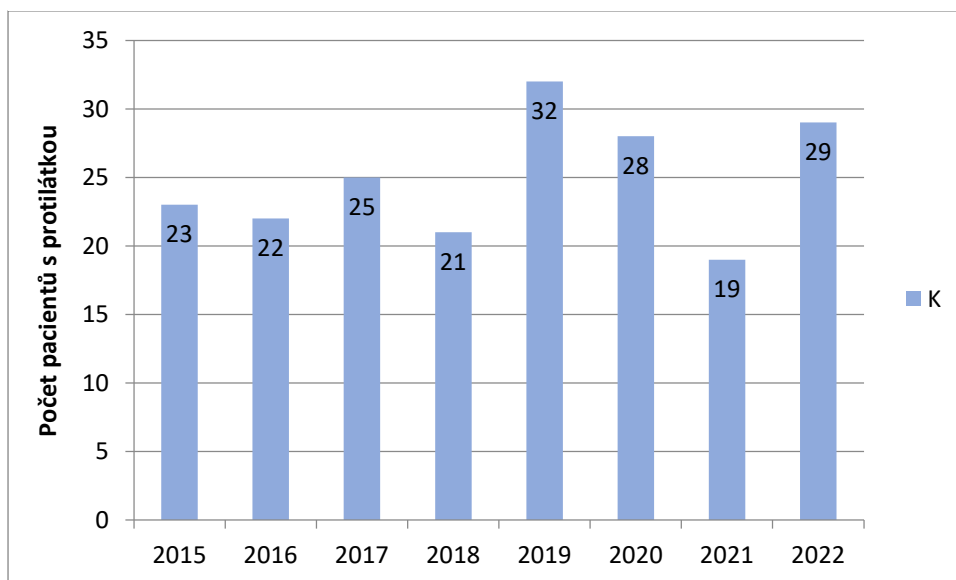
V grafu vidíme nárůst počtu zachycené protilátky anti-E, v tabulce poměr z celkového počtu zachycených protilátek, v letech 2017 – 2018. Ten je způsobený používáním citlivějšího enzymatického testu a patrně i záchytem přirozené protilátky. Od roku 2019 počet zachycení klesá v důsledku provádění testu pouze v NAT, pokles ovšem není nijak výrazný v porovnání s obdobím do roku 2016.

Anti-E je jedna z nejčastějších protilátek (frekvence antigenu E v kavkazské populaci jen 25-30 %), obvykle imunního původu po jednorázové nebo opakované aloimunizaci v těhotenství nebo po transfuzi. Reaguje-li v NAT testu, jedná se o klinicky závažnou protilátku imunního původu. Pokud reaguje pouze v enzymovém testu, není z pravidla klinicky významná a jde většinou pouze o protilátku přirozenou. V obou případech podáváme erytrocytární transfuzní přípravky E negativní.

12.3.2 Analýza výskytu protilátky anti-Kell ve sledovaném období

Analýzovaná data výskytu protilátky anti-Kell jsem pro lepší vysvětlení zpracovala stejným způsobem, jako v kapitole 12.3.1 Analýza výskytu protilátky anti-E ve sledovaném období. Bližší popis výskytu této protilátky jsem vybrala z důvodu, že jde druhou protilátku s největší četností výskytu a zároveň patří do Rh-Kell systému. Frekvence antigenu Kell v kavkazské populaci je jen 9 %.

Graf 3 Počet pacientů s protilátkou anti-Kell za jednotlivé roky



Zdroj vlastní

Tabulka 13 Poměr protilátky anti-Kell ze všech zachycených protilátek za jednotlivé roky

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
K	14%	16%	11%	9%	19%	15%	14%	15%

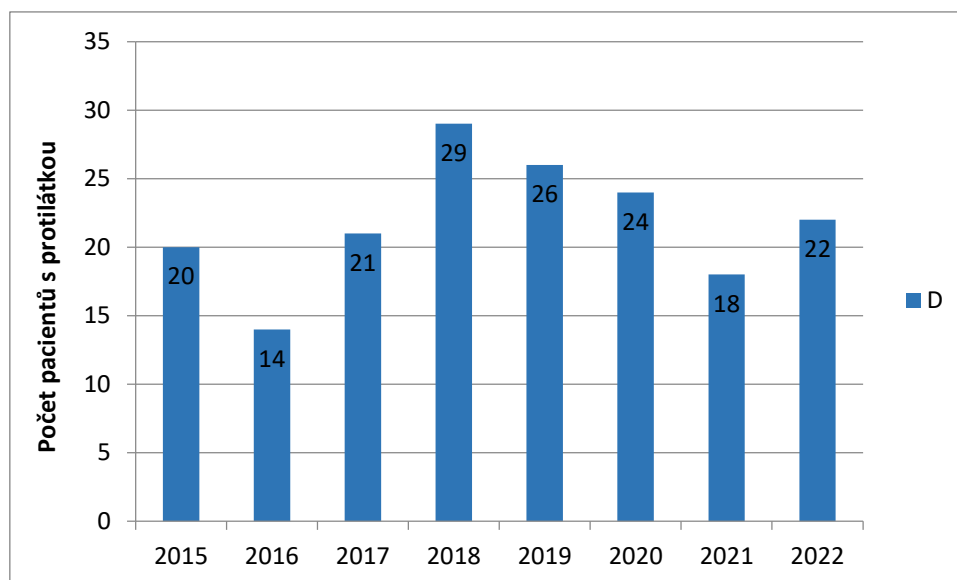
Zdroj vlastní

V grafu vidíme nárůst počtu zachycené protilátky anti-Kell, v tabulce poměr z celkového počtu zachycených protilátek, v roce 2019. Anti-Kell je imunní aloprotilátka, typicky po transfuzi Kell pozitivní krve, protože většina populace je Kell negativní. Řešením by bylo podávat krve Kell pozitivní jen Kell pozitivním příjemcům.

12.3.3 Analýza výskytu protilátky anti-D ve sledovaném období

Analyzovaná data výskytu protilátky anti-D jsem pro lepší vysvětlení zpracovala stejným způsobem, jako 12.3.1 Analýza výskytu protilátky anti-E ve sledovaném období. Protilátka anti-D je třetí s největším záchytem za sledované období a spadá do Rh-Kell systému.

Graf 4 Počet pacientů s protilátkou anti-D za jednotlivé roky



Zdroj vlastní

Tabulka 14 Poměr protilátky anti-D ze všech zachycených protilátek za jednotlivé roky

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
D	12%	10%	10%	13%	15%	13%	13%	11%

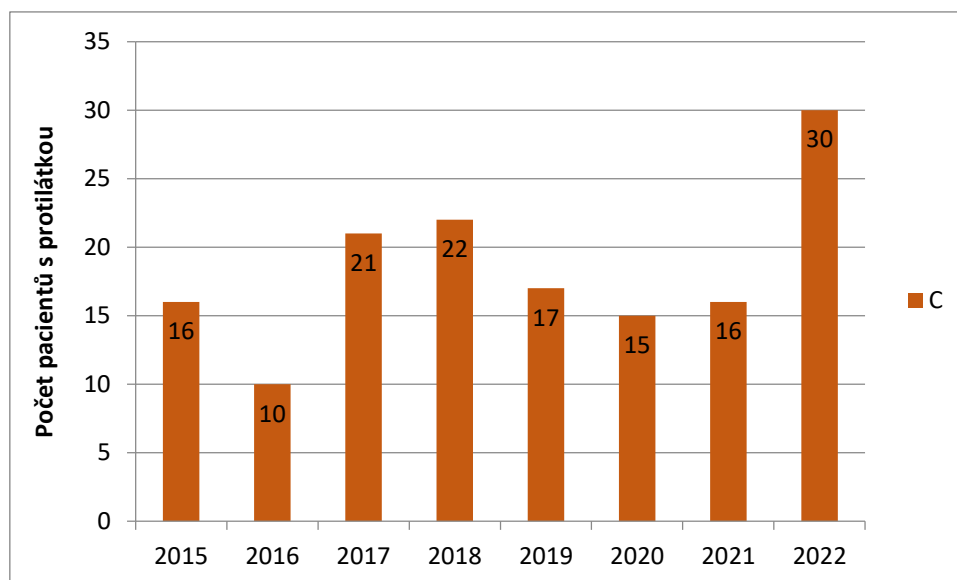
Zdroj vlastní

V grafu vidíme nárůst počtu zachycené protilátky anti-D v roce 2018. Zvýšení poměru z celkového počtu zachycených protilátek, a tedy přesnější údaj, však nastalo v roce 2019. Protilátka anti-D se stále vyskytuje, dle analyzovaných dat ze sledovaného období, vychází jako třetí s nejčastějším výskytem, ačkoliv je frekvence antigenu D v kavkazské populaci 82-88%. Můžeme o ní říci, že se typicky vyskytuje u starších Rh(D) negativních žen, imunizovaných těhotenstvím a porodem z dob, kdy se nepodával anti-D imunoglobulin po porodu Rh(D) pozitivního dítěte. Anti-D imunoglobulin se stal běžně dostupným v 70. letech minulého století.

12.3.4 Analýza výskytu protilátky anti-C ve sledovaném období

Analýzovaná data výskytu protilátky anti-C jsem pro lepší vysvětlení zpracovala stejným způsobem, jako 12.3.1 Analýza výskytu protilátky anti-E ve sledovaném období. Na protilátku anti-C jsem se zaměřila z důvodu, že spadá do Rh-Kell systému a zároveň jde o čtvrtou protilátku s největším zachytem za sledované období. Frekvence antigenu C v kavkazské populaci je sice 65-70 %, ale protilátka se často vyskytuje ve směsi s anti-D.

Graf 5 Počet pacientů s protilátkou anti-C za jednotlivé roky



Zdroj vlastní

Tabulka 15 Poměr protilátky anti-C ze všech zachycených protilátek za jednotlivé roky

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
C	10%	7%	10%	10%	10%	8%	12%	15%

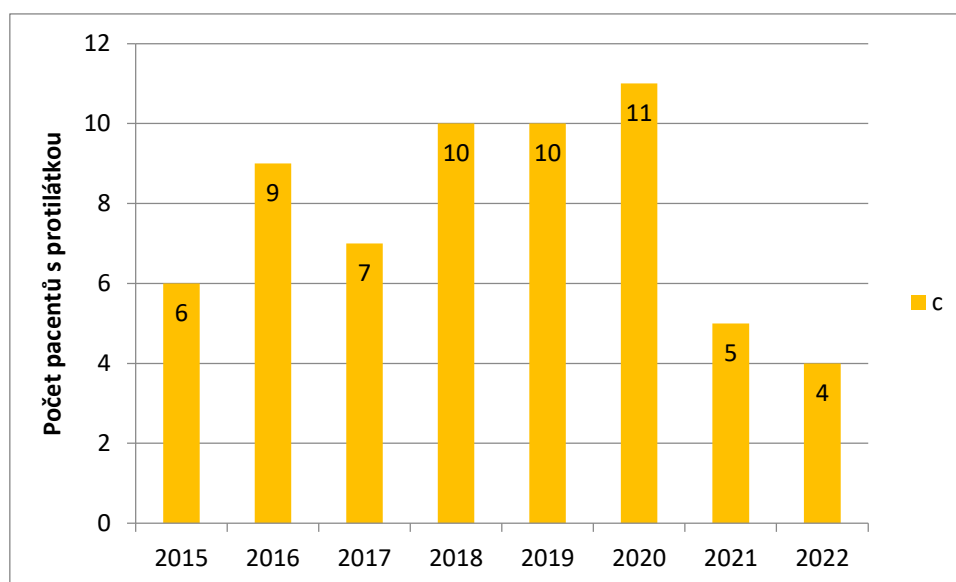
Zdroj vlastní

V grafu vidíme nárůst počtu zachycené protilátky anti-C, v tabulce poměr z celkového počtu zachycených protilátek, v roce 2022.

12.3.5 Analýza výskytu protilátky anti-c ve sledovaném období

Analýzovaná data výskytu protilátky anti-c jsem pro lepší vysvětlení zpracovala stejným způsobem, jako 12.3.1 Analýza výskytu protilátky anti-E ve sledovaném období. Protilátka anti-c patří do Rh-Kell systému a zařadila bych ji mezi protilátky se střední četností výskytu. Frekvence antigenu c je 80-85 % v kavkazské populaci.

Graf 6 Počet pacientů s protilátkou anti-c za jednotlivé roky



Zdroj vlastní

Tabulka 16 Poměr protilátky anti-c ze všech zachycených protilátek za jednotlivé roky

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
c	4%	6%	3%	4%	6%	6%	4%	2%

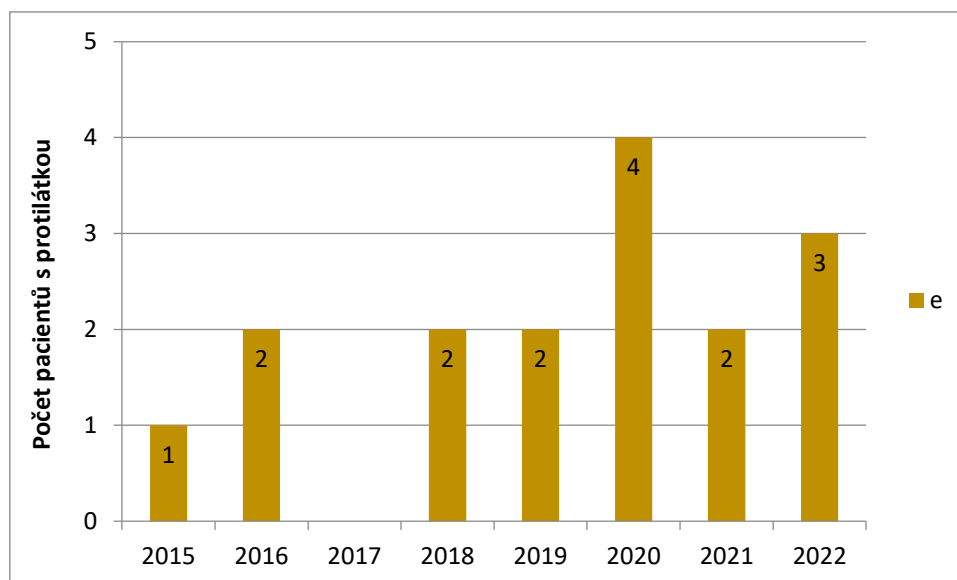
Zdroj vlastní

V grafu vidíme mírný nárůst počtu zachycené protilátky v roce 2020. Zatím co poměr z celkového počtu zachycených protilátek je stejný jako v roce 2016 a 2019. Menší počet a zároveň i menší poměr z celku se objevil v roce 2022. Obvykle se sdružuje s anti-E. Její nižší záchyt bude dán vysokou frekvencí výskytu antigenu v patientské populaci. Od roku 2021 pokles, nelze vyloučit pozitivní efekt podávaných erytrocytárních transfuzních přípravků CCee příjemcům s fenotypem CCee.

12.3.6 Analýza výskytu protilátky anti-e ve sledovaném období

Analýzovaná data výskytu protilátky anti-e jsem pro lepší vysvětlení zpracovala stejným způsobem, jako 12.3.1 Analýza výskytu protilátky anti-E ve sledovaném období. Protilátka anti-e není častá, ale zaměřila jsem se na její výskyt z důvodu, že patří mezi protilátky Rh-Kell systému. Frekvence antigenu e je 98% v kavkazské populaci, proto výskyt protilátky není častý.

Graf 7 Počet pacientů s protilátkou anti-e za jednotlivé roky



Zdroj vlastní

Tabulka 17 Poměr protilátky anti-e ze všech zachycených protilátek za jednotlivé roky

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
e	1%	1%	-	1%	1%	2%	1%	2%

Zdroj vlastní

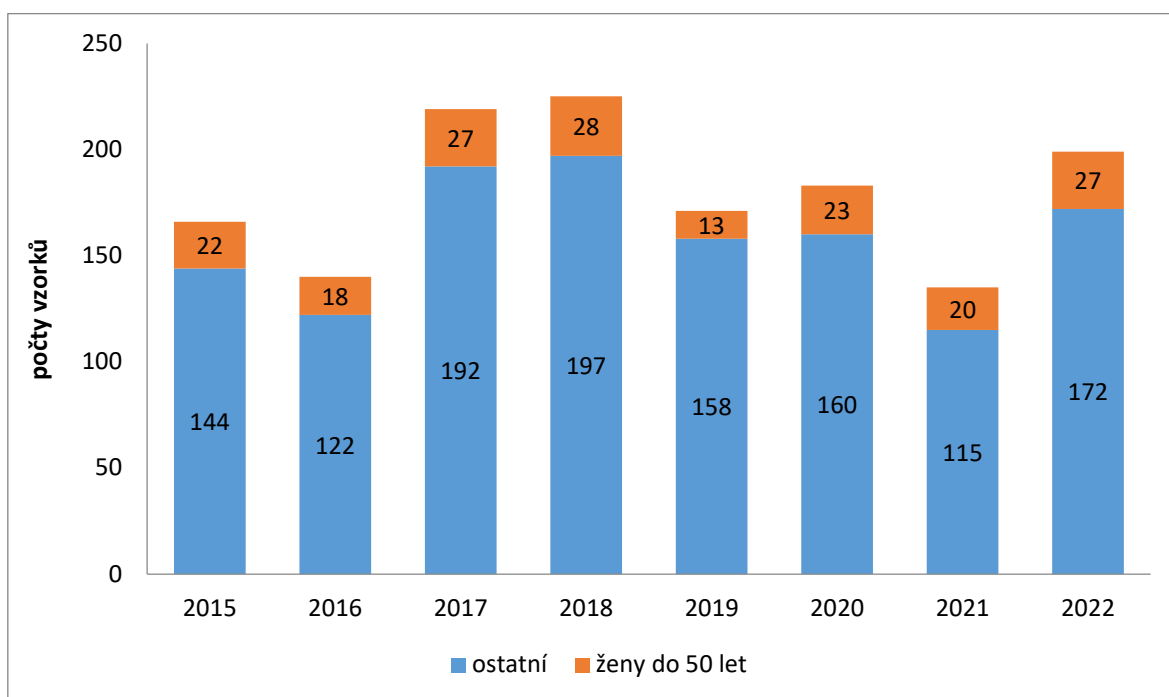
V grafu a následně i tabulce můžeme vidět nízký záchyt protilátky anti-e. Její výskyt je tedy vzácný. V roce 2017 nebyla protilátka anti-e zachycena u žádného z vyšetřovaných pacientů. Nejvyšší záchyt této protilátky byl v roce 2020 a 2022.

12.4 Vývoj výskytu aloprotilátek u žen ve fertilním věku ve sledovaném období

Od počátku roku 2018 bylo zahájeno rutinní vyšetřování Rh-Kell (C,c,E,e,Kell) fenotypu u žen ve fertilním věku (do 50 let). Na základě vyšetření se jim dále vybírají erytrocytární transfuzní přípravky dle Rh-Kell fenotypu a optimálně i Cw negativní. Důvodem je zamezení tvorby aloprotilátek, které by mohly škodit v případném nastávajícím těhotenství.

V příloženém grafu je porovnán počet pozitivních vzorků na erytrocytární aloprotilátku a počet žen ve fertilním věku s aloprotilátkou vyšetřovaných na TO FN Plzeň ve sledovaném období, graf vychází z tabulky, která je součástí přílohy D. Dále je přiložena tabulka, kde je sledován poměr žen s aloprotilátkou z celkového počtu pacientů s aloprotilátkou.

Graf 8 Porovnání počtu pozitivních vzorků na aloprotilátku a počet žen ve fertilním věku s aloprotilátkou



Zdroj vlastní

Tabulka 18 Poměr žen ve fertilním věku s aloprotilátkou z celkového počtu pacientů s aloprotilátkou

2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
13%	13%	12%	12%	8%	13%	15%	14%

Zdroj vlastní

Z grafu i tabulky je patrné, že v některých letech došlo k nepatrným výkyvům v počtu imunizovaných žen ve fertilním věku, jako například v roce 2019, můžeme tedy říci, že počet je téměř konstantní. Cílem rutinního vyšetřování Rh-Kell fenotypu u žen ve fertilním věku (zavedeném od roku 2018) je počet imunizovaných snížit. Doposud nebyl zaznamenán výrazný pokles nálezu protilátek, u pacientek z naší oblasti se však tento jev projevuje až s odstupem času.

DISKUZE

Souhrnným cílem praktické části v mé bakalářské práci je zhodnotit výskyt erytrocytárních aloprotilátek za období 2015 – 2022 u pacientů vyšetřovaných na TO FN Plzeň. Předpokladem bylo, že se počty pacientů s aloprotilátkami budou s každým následujícím rokem měnit v závislosti na metodice a okolnostech.

Z analyzovaných dat vyplývá, že poměr pozitivních pacientů s erytrocytární protilátkou z celkového počtu vyšetřovaných vzorků se v průběhu sledovaného období neliší. V každém roce poměr pozitivních z celku tvoří 1 %. I přesto, podíváme-li se na konkrétní čísla, vidíme změny v počtu pozitivních pacientů. V roce 2017 – 2018 došlo k menšímu nárůstu počtu pozitivních nálezů v důsledku zavedení imunohematologického provozu analyzátoru IH-500 do provozu. Zároveň na obou krevních skladech TO FN Plzeň probíhal screening protilátek metodou sloupcové aglutinace prováděný NAT testem současně s enzymovým papainovým testem v dvoustupňovém více citlivém provedení. Od 4. čtvrtletí roku 2018 už se enzymovým papainovým testem v dvoustupňovém provedení vyšetřovali jen vybrané skupiny pacientů (u diagnóz těhotenství, porod, potrat, šestinedělí, potransfuzní reakce, pacienti s protilátkami a nejasnými imunologickými nálezy, děti do jednoho roku věku). V roce 2018 jsem zaznamenala lehce snížený celkový počet vyšetřovaných vzorků způsobený okolnostmi, které nelze blíže specifikovat. Naopak stagnace počtu vyšetřovaných vzorků v roce 2020 – 2021 a následný zvýšený počet vyšetřovaných vzorků v roce 2022, můžeme pravděpodobně připsat covidovému období. Kdy v roce 2020 – 2021 došlo k útlumu plánované operativy související s počtem vyšetřovaných pacientů a pak následná obnova operativy v roce 2022 způsobila i vyšší počet vyšetření.

Z analyzovaných dat jsem potvrdila skutečnost, že protilátka anti-E je jednou z nejčastějších protilátek. Z mé analýzy vyplývá, že ze sledovaných protilátek za dané období je nejčastější. Spolu s ní jsou dále čteně zaznamenávány protilátky Rh-Kell systému, které jsou klinicky závažné a to konkrétně protilátky anti-D, anti-C, anti-c, anti-K a společně s nimi anti-C^w. Protilátka anti-e je součástí Rh-Kell systému, ale její výskyt je vzácnější.

Počty pacientů s jednotlivými protilátkami se za sledované období měnily v důsledku změn metodiky uvedených u hodnocení celkového počtu pozitivních vzorků a v závislosti na celkovém počtu pozitivních vzorků. Nelze tedy určit jednotou definici, která by vysvětlovala, proč se počty v jednotlivých letech měnily.

Dále jsem z dat analyzovala, zda se v průběhu sledovaného období měnil počet imunizovaných žen ve fertilním věku (do 50 let). Ačkoliv se od roku 2018 zahájilo rutinní vyšetřování Rh-Kell (C,c,E,e,Kell) fenotypu u výše vybrané skupiny pacientů (a dále i dalších skupin) a jsou jim vybírány erytrocytární transfuzní přípravky s ohledem na tento fenotyp, nezaznamenala jsme zatím výrazný pokles protilátek a tedy ani protilátek v Rh a Kell systému. Je to patrně způsobeno skladbou pacientů TO FN Plzeň, kteří jsou z různých lokalit Plzeňského kraje i mimo tuto oblast, a pokud jejich stav vyžaduje transfuzi, pak není v možnostech okolních menších transfuzních oddělení či krevních bank vybírat optimální transfuzní přípravky vzhledem k jejich menším skladovým zásobám. U jiných pacientů z užší oblasti se případný profit projeví až s odstupem, neboť u nich nedochází k opakovanému podání krve a je jim podána pouze jednorázově (např. při operačním zákroku, komplikovaném porodu). V neposlední řadě hraje roli i fakt, že ženám nad 50 let věku a mužům nevybíráme erytrocytární transfuzní přípravky s ohledem na Rh-Kell fenotyp, pokud nemají pozitivní imunohematologickou anamnézu (tj. např. protilátky zjištěné v minulosti, hematologické onemocnění apod.) a tudíž u této skupiny nelze vyloučit tvorbu protilátek anti-C, anti-c, anti-E, anti-e a anti-Kell.

Co se naopak podařilo prokázat je fakt, že ačkoliv je většina screeningů protilátek proti erytrocytům prováděna pouze v NAT (od 4. čtvrtletí 2018), nedochází ve srovnání s lety 2015 – 2016 (kdy byl používán screening v NAT a méně citlivý jedноступňový enzymový test s bromelinem) k poklesu záchytu protilátek, zejména těch klinicky významných. Což je žádoucí pro zachování správné hemoterapie.

ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce jsem se zaměřila na jednotlivé obory spadající do problematiky, jako je imunologie, imunohematologie a transfuzní lékařství. Zabývala jsem se účelem předtransfuzního vyšetření, problematikou krevních skupin, jednotlivých transfuzních přípravků a indikačními kritérii současně s naléhavostí podání, dále pak úskalím posttransfuzních reakcí a představila jsem základní předtransfuzní vyšetření, která se provádějí na transfuzním oddělení Fakultní nemocnice v Plzni.

V praktické části jsem analyzovala zaznamenaná data o pacientech se zachycenou erytrocytární aloprotilátkou. Hodnotila jsem, zda se celkové počty zaznamenaných protilátek v průběhu let měnily a z jakého důvodu. Dále jsem hodnotila nález jednotlivých protilátek vzhledem k jejich četnosti výskytu. Konkrétněji jsem se zaměřila na protilátky Rh systému a zároveň i na nejčastěji zaznamenané protilátky. Na závěr jsem hodnotila, zda výběr erytrocytárních transfuzních přípravků dle Rh-Kell fenotypu u vybraných skupin snižuje počty imunizovaných pacientů. Výsledky vyšly dle očekávání v závislosti na prováděné metodice a vlastnostech protilátek.

Zásadní je potvrzení, že i přesto že je screening protilátek proti erytrocytům prováděn převážně základní metodou v NAT, nedochází k významnému poklesu zachytu klinicky významných protilátek. A díky rutinnímu vyšetření antigenů v Rh-Kell systému by se situace do budoucna mohla ještě zlepšit. Dalším významem vyšetření screeningu protilátek je, že každému pacientovi s pozitivním výsledkem je předáno hlášení o nalezených aloprotilátkách v písemné podobě, které při případné hospitalizaci v jiném zdravotnickém zařízení předá svému ošetřujícímu lékaři. Ten pak zjištěnou protilátku uvede na žádanku o transfuzní přípravek.

Domnívám se, že cíl mé bakalářské práce byl splněn a výsledky potvrdili bezpečnost podávání transfuzních přípravků ve Fakultní nemocnici v Plzni.

SEZNAM LITERATURY

1. PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. Hematologie a transfuzní lékařství II: Transfuzní lékařství. 1. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3460-6.
2. MASOPUST, Jiří a Martin PÍSAČKA. Praktická imunohematologie - erytrocyty. 2. Praha: Grada, 2022. ISBN 9788027133772.
3. PÍSAČKA, M., P. KOŘÍNKOVÁ, E. MATĚJKOVÁ a H. T. BOLCKOVÁ. Imunohematologie – historie, současný stav poznání a role ÚHKT. 2012, 2012(58), 103-114. 2S103–2S114.
4. FÁBRYOVÁ, Viera. Imunohematológia a transfúzna medicína pre prax. 1. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-4391-2.
5. PÍSAČKA, M., H. T. BOLCKOVÁ, J. KRÁLOVÁ, E. MATĚJKOVÁ a E. MIARKOVÁ. Transfuze a imunohematologie v ÚHKT. Transfuze a hematologie dnes [online]. 2017, 2017(1), 87-93 [cit. 2023-03-26]. ISSN 12135763. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/transfuze-hematologie-dnes/2017-supplementum1/transfuze-a-imunohematologie-v-uhkt-62390>
6. MASOPUST, J., M. BOHONĚK, D. GALUSZKOVÁ, Z. GAŠOVÁ, M. PÍSAČKA, R. PROCHÁZKOVÁ, V. ŘEHÁČEK, P. TUREK. Předtransfuzní laboratorní vyšetření. Doporučení společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_08, verze 4 (2022_05_01)
7. COOLING, Laura. Blood Groups in Infection and Host Susceptibility [online]. 2015 [cit. 2023-03-26]. ISSN edsair.
8. ROBERTS, David J., Michael F. MURPHY a Mark H. YAZER. Practical transfusion medicine / edited by Michael F. Murphy, David J. Robert, Mark H. Yazer. 2017. ISBN 9781119129417.
9. DOBROTOVÁ, Miroslava a Peter KUBISZ. Hematológia a transfuziológia: učebnica. 1. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1779-4.
10. ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST. Transfuzní lékařství. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4534-3.

11. PÍSAČKA, M., H. T. BOLCKOVÁ, J. KRÁLOVÁ, E. MATĚJKOVÁ a E. MIARKOVÁ. Transfuze AB0 systém a antigen D. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2022_16, verze 1 (2022_06_01)
12. INDRÁK, Karel, ed. Hematologie a transfuzní lékařství. V Praze: Triton, 2014. Lékařské repetitorium. ISBN 978-80-7387-722-4.
13. MAREK, Josef. Farmakoterapie vnitřních nemocí. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2639-7.
14. NAVRÁTIL, Leoš. Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory. 1. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2319-8.
15. PENKA, Miroslav a Alena BULIKOVÁ. Neonkologická hematologie. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2299-3.
16. MASOPUST, J., PÍSAČKA M., TUREK P. Základní imunohematologická laboratorní vyšetření červené řady – obecné zásady a technické postupy. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL_07, verze 4 (2019_09)
17. FN Plzeň, 2022. Standardní postup, Stanovení krevních skupin systému AB0 Rh(D), Metoda sklíčková a zkumavková dle SOPV/TO/001/08
18. FN Plzeň, 2022. Standardní postup, Stanovení krevních skupin AB0/Rh kombinované se stanovením aglutininů na kartě DiaClon AB0/D + Reverse Grouping a stanovení 2.Rh(D) na kartě DiaClon Anti-DVI neg. (systém DiaMed/BIO-RAD) dle SOPV/TO/016/04
19. FN Plzeň, 2021. Standardní postup, Stanovení fenotypů Rh a Kell na ID-Kartě DiaClon Rh-Subgroups + K (systém DiaMed/BIO-RAD) dle SOPV/TO/018/03
20. FN Plzeň, 2022. Standardní postup, Screenink a indentifikace protilátek proti erytrocytům při 37 °C. Test kompatibility. (systém DiaMed/BIO-RAD, enzym papain) dle SOPV/TO/015/04

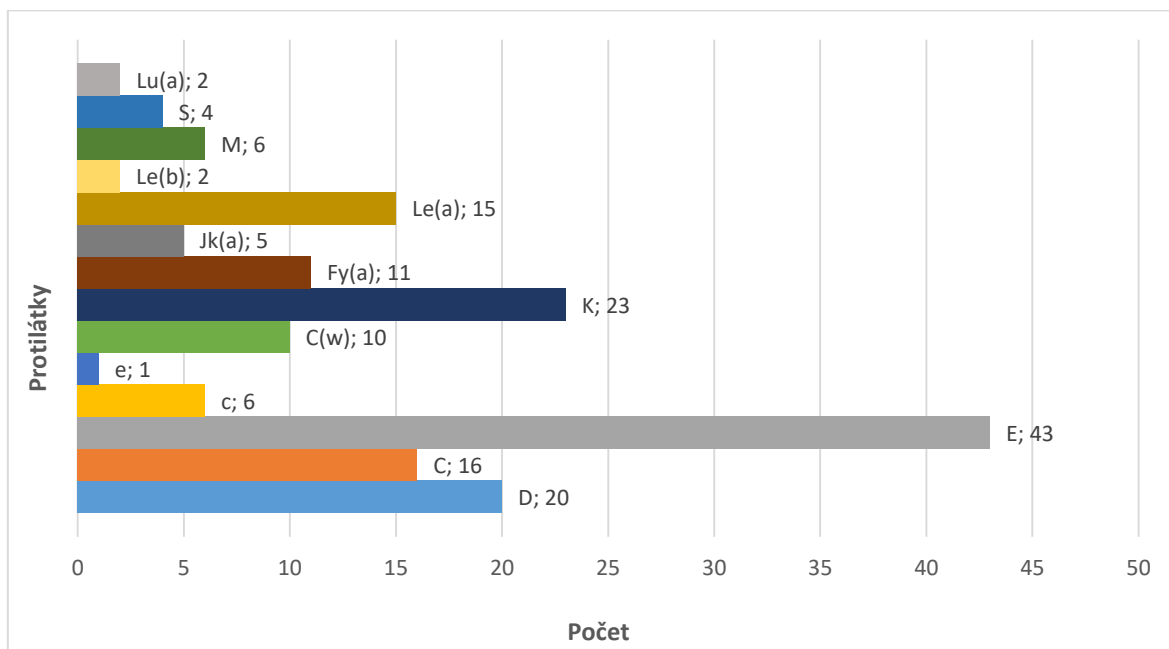
SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Grafy zobrazující záchyt jednotlivých protilátek za jednotlivé roky ve sledovaném období 2015 -2022
- Příloha B – Obrázek příkladu tabulek antigenů erytrocytů
- Příloha C – Tabulka zobrazující počet negativních a pozitivních vzorků
- Příloha D – Tabulka zobrazující počet pozitivních ostatních pacientů a počet pozitivních žen ve fertilním věku na aloprotilátku

PŘÍLOHY

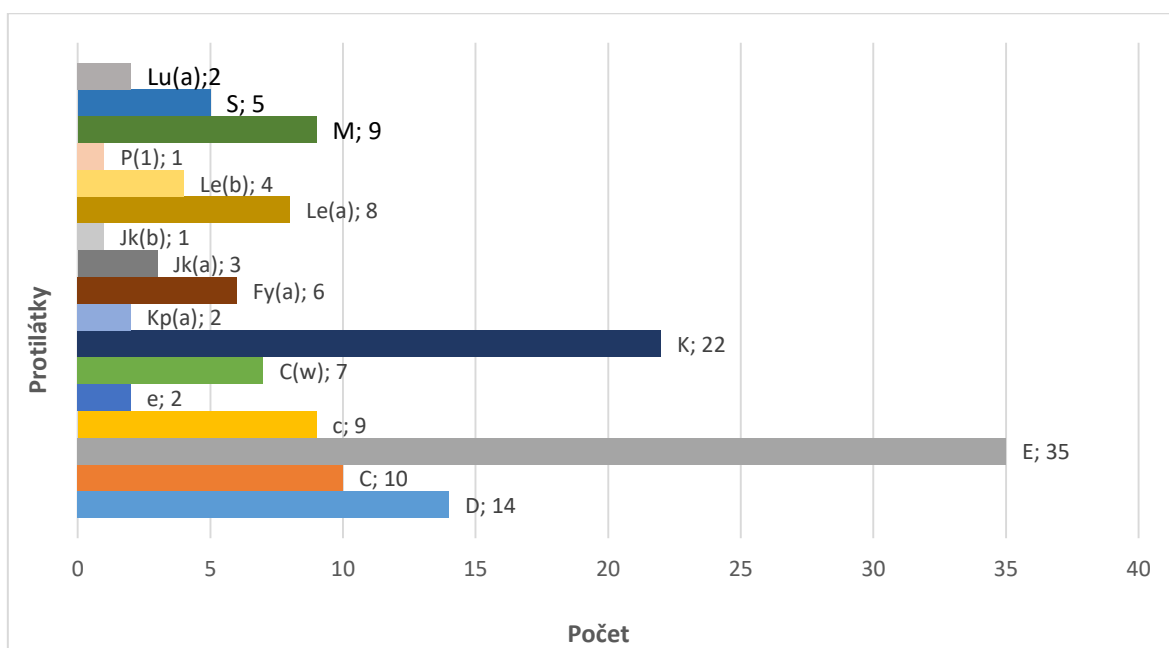
Příloha A – Grafy zobrazující záchyt jednotlivých protilátek za jednotlivé roky ve sledovaném období 2015 – 2022

Graf 9 Počty zachycených protilátek za rok 2015



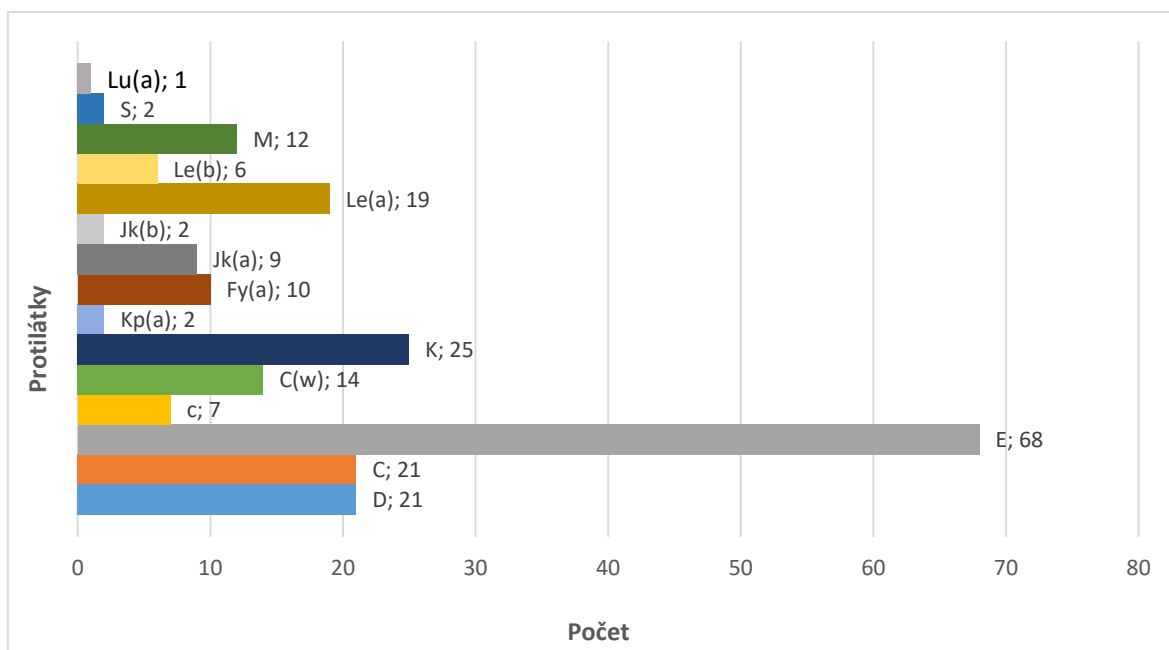
Zdroj vlastní

Graf 10 Počty zachycených protilátek za rok 2016



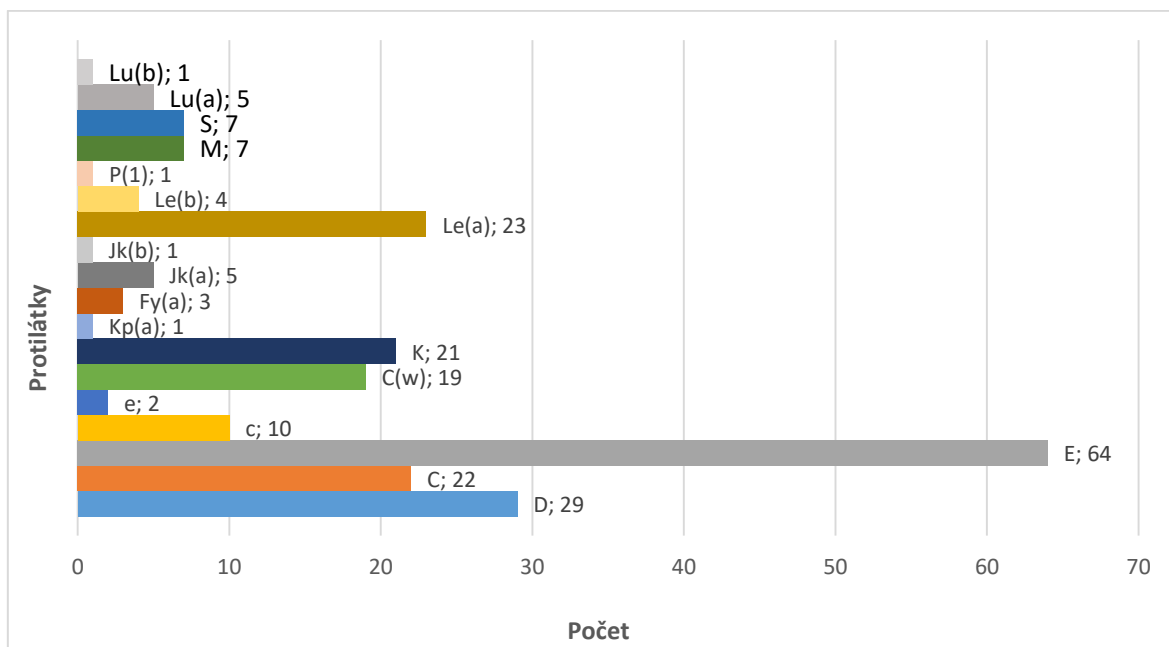
Zdroj vlastní

Graf 11 Počty zachycených protilátek za rok 2017



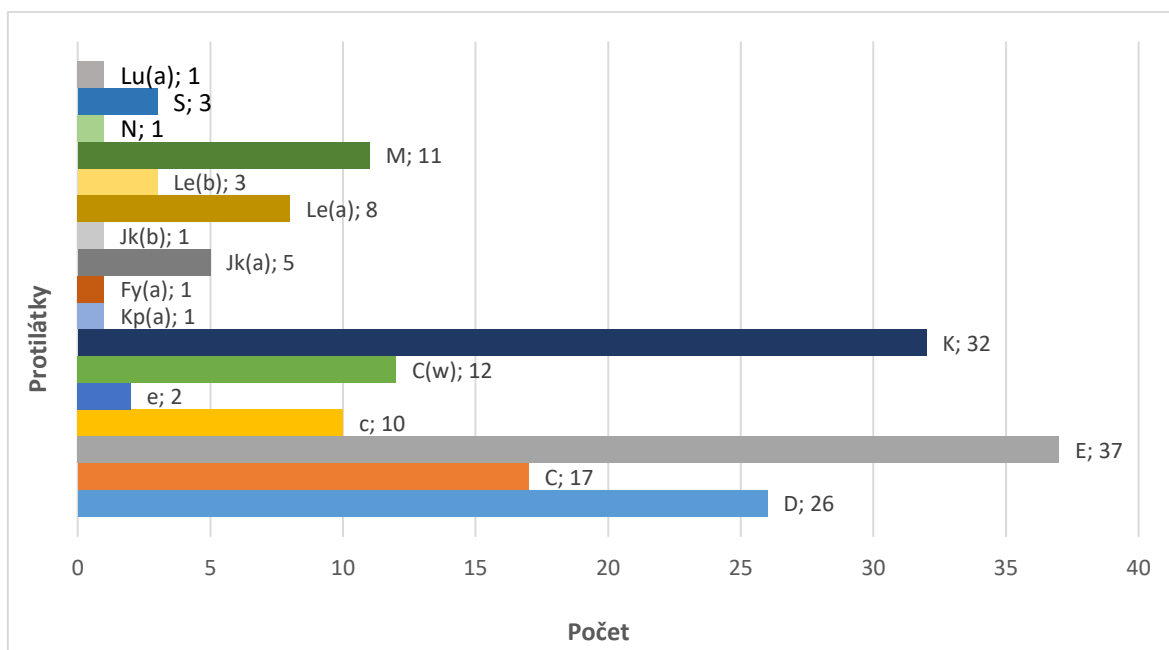
Zdroj vlastní

Graf 12 Počty zachycených protilátek za rok 2018



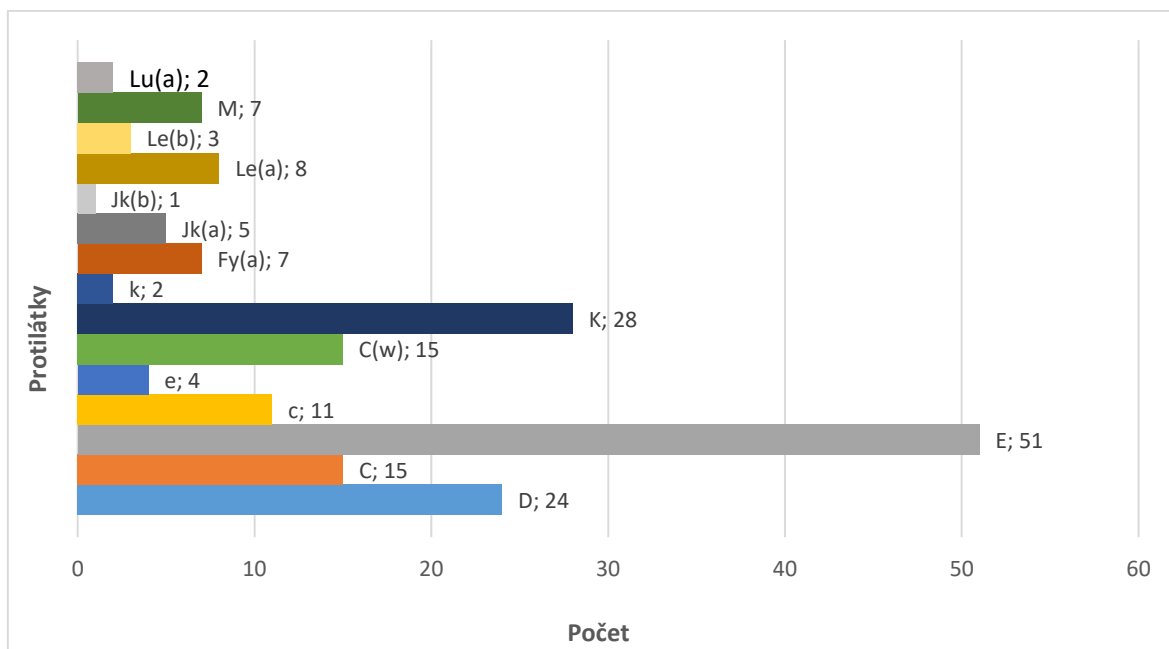
Zdroj vlastní

Graf 13 Počty zachycených protilátek za rok 2019



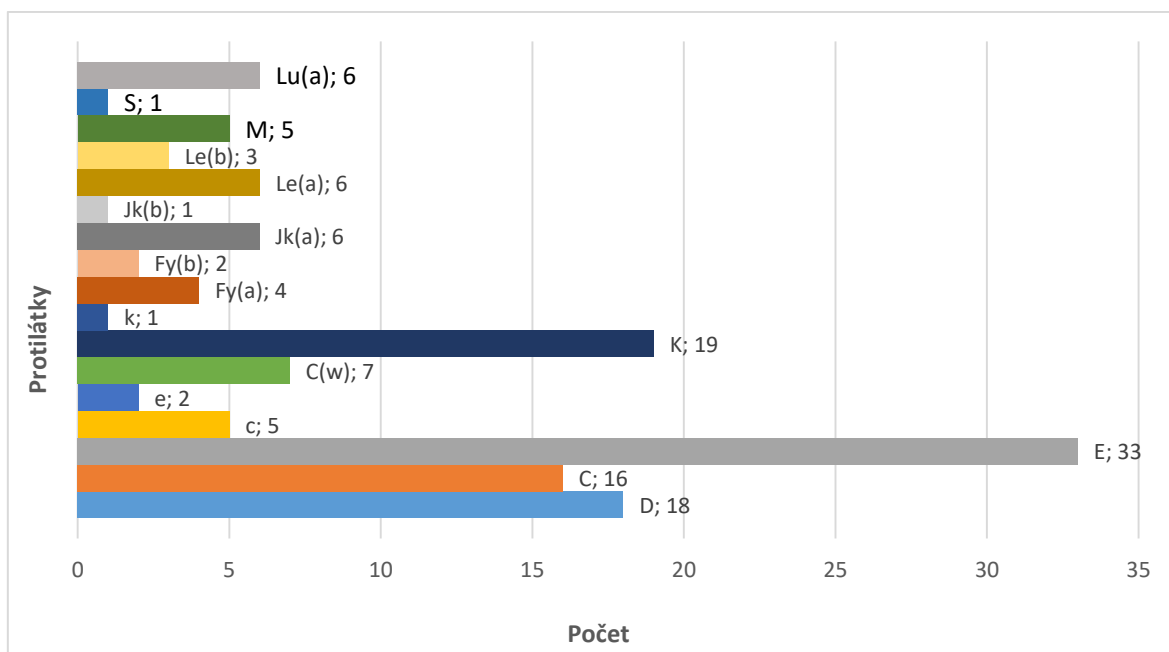
Zdroj vlastní

Graf 14 Počty zachycených protilátek za rok 2020



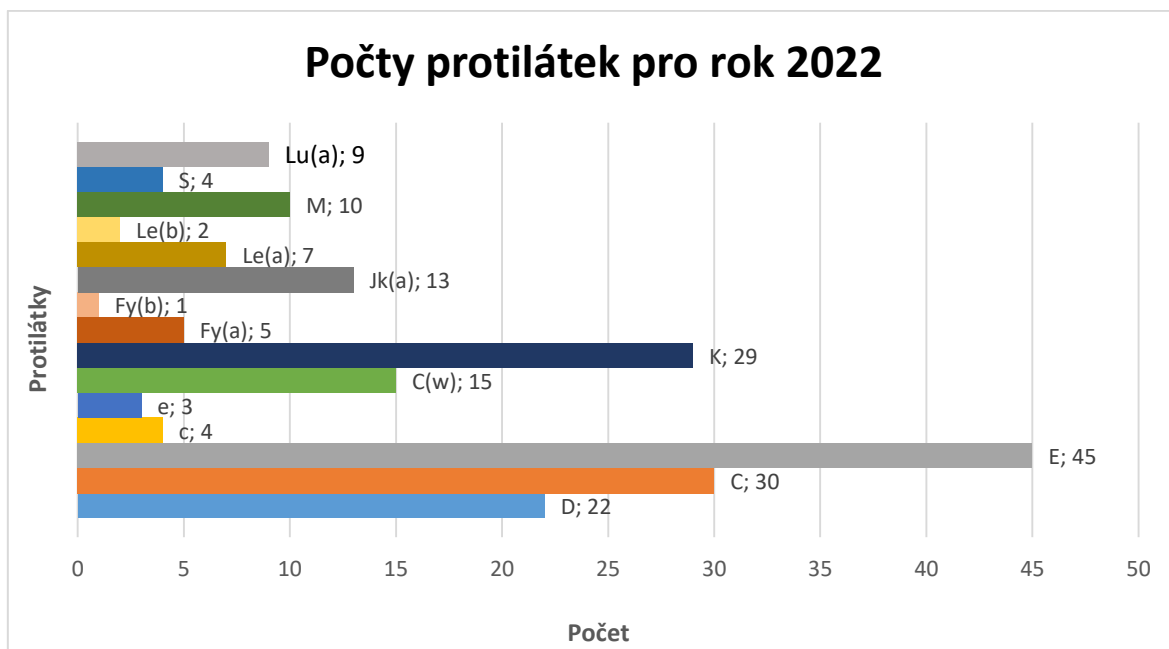
Zdroj vlastní

Graf 15 Počty zachycených protilátek za rok 2021



Zdroj vlastní

Graf 16 Počty zachycených protilátek za rok 2022



Zdroj vlastní

Příloha B – Obrázek příkladu tabulek antigenů erytrocytů

Obrázek 5 Příklady tabulek antigenů erytrocytů

I	Rh-rr	Dárcce		Rh-rr			Kell			Duffy			Lewis			MNS			Luth			Xg			Speciální antigeny		Výsledek									
		R ₁ W ₁ R ₁	R ₁ W ₁ R ₁	521745	D	C	E	c	e	C ⁺	K	k	K ⁺	K ⁻	J ^s	J ^s	Fy ^a	Fy ^b	Fy ³	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	M	N	S	s	L ^u	L ^v	Xg ^a	Xg ^b	Xg ^c	NAT	Enzym 4° C	
CCCWD.ee	R ₁ W ₁ R ₁	521745	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
ccD.EE	R ₂ R ₂	998639	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
ccddeee	rr	000678	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Autokontrola																																				

Obr. 3.30 Příklad tabulky antigenů erytrocytů pro screening protilátek

1	Rh-rr	Dárcce		Rh-rr			Kell			Duffy			Lewis			MNS			Luth			Xg			Speciální antigeny		Výsledek		Poznámky									
		R ₁ W ₁ R ₁	R ₁ W ₁ R ₁	129048 <th>D</th> <th>C</th> <th>E</th> <th>c</th> <th>e</th> <th>C⁺</th> <th>K</th> <th>k</th> <th>K⁺</th> <th>K⁻</th> <th>J^s</th> <th>J^s</th> <th>Fy^a</th> <th>Fy^b</th> <th>Fy³</th> <th>Jk^a</th> <th>Jk^b</th> <th>Le^a</th> <th>Le^b</th> <th>P₁</th> <th>M</th> <th>N</th> <th>S</th> <th>s</th> <th>L^u</th> <th>L^v</th> <th>Xg^a</th> <th>Xg^b</th> <th>Xg^c</th> <th>NAT</th> <th>Enzym 4° C</th>	D	C	E	c	e	C ⁺	K	k	K ⁺	K ⁻	J ^s	J ^s	Fy ^a	Fy ^b	Fy ³	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	M	N	S	s		L ^u	L ^v	Xg ^a	Xg ^b	Xg ^c	NAT	Enzym 4° C		
CCCWD.ee	R ₁ W ₁ R ₁	129048	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
CCD.ee	R ₁ R ₁	378453	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
ccD.EE	R ₂ R ₂	587277	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Ccddde	r ₁ r ₁	408247	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
ccddEe	r ₁ r ₁	428008	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
ccddde	rr	641733	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
ccddde	rr	393156	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
ccD.ee	R ₁ R ₁	763766	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
ccddde	rr	212533	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
ccddde	rr	663528	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
ccddde	rr	484461	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Autokontrola																																						
Pacient																																						

Obr. 3.31 Příklad tabulky antigenů erytrocytů pro identifikaci protilátek

Příloha C- Tabulka zobrazující počet negativních a pozitivních vzorků

Tabulka 19 Počty negativních a pozitivních vzorků na aloprotilátku za jednotlivé roky

rok	negativní	pozitivní
2015	20097	164
2016	20308	140
2017	19975	219
2018	19800	225
2019	20031	171
2020	19975	183
2021	19972	135
2022	20450	199

Zdroj vlastní

Příloha D - Tabulka zobrazující počet pozitivních ostatních pacientů a počet pozitivních žen ve fertilním věku na aloprotilátku

Tabulka 20 Počty pozitivních ostatních pacientů a pozitivních žen ve fertilním věku

rok	ostatní	ženy do 50 let
2015	144	22
2016	122	18
2017	192	27
2018	197	28
2019	158	13
2020	160	23
2021	115	20
2022	172	27

Zdroj vlastní