

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Detekce a identifikace erytrocytových protilátek u pacientů
v souvislosti s transfuzí krve**

Bc. Alena Klazarová

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Gabriela Červená, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Eliška Rýznarová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé školitelce RNDr. Gabriele Červené, Ph.D. za pomoc a vedení při zpracování mé diplomové práce. Vážím si času a ochoty, kterou věnovala opravám a kontrolám. Dále bych chtěla moc poděkovat RNDr. Elišce Rýznarové za konzultace a cenné informace, kterými přispěla do mé práce. Čeho si vážím nejvíce je trpělivost a pochopení ze strany mé rodiny a pracovního kolektivu, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem čerpala, řádně cituji. Rovněž tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 12. 05. 2023

Bc. Alena Klazarová

Obsah

Abstrakt	8
Abstract	9
Úvod	10
Zadání – cíl práce	11
Teoretická část.....	12
1.1. Základní pojmy.....	12
1.1.1. Antigen	12
1.1.1.1. Antigeny krevně skupinových systémů	12
1.1.2. Protilátka	13
1.1.2.1. Přehled jednotlivých tříd imunoglobulinů	14
1.1.2.2. Imunizace	16
1.1.2.3. Protilátky proti antigenům krevně skupinových systémů erytrocytů	16
1.1.2.4. Autoprotilátky a aloprotilátky	19
1.1.3. Komplementový systém.....	19
1.1.3.1. Mechanismy aktivace komplementu.....	19
1.1.4. Reakce antigen-protilátka.....	21
1.2. Systémy krevních skupin.....	22
1.2.1. AB0 systém	23
1.2.1.1. Geny AB0 systému	24
1.2.1.2. Antigeny AB0 systému	24
1.2.1.3. Podskupiny AB0 systému	25
1.2.1.4. Protilátky AB0 systému	26
1.2.2. Rh systém	26
1.2.2.1. Geny Rh systému	27
1.2.2.2. Antigeny Rh systému	27
1.2.2.3. Protilátky Rh systému	31

1.2.3.	Kell systém.....	33
1.2.3.1.	Antigeny Kell systému.....	33
1.2.3.2.	Protilátky Kell systému.....	34
1.2.4.	Lewis systém.....	35
1.2.4.1.	Protilátky Lewis systému.....	35
1.2.5.	Kidd systém.....	36
1.2.5.1.	Protilátky Kidd systému.....	36
1.2.6.	Duffy systém.....	37
1.2.6.1.	Protilátky Duffy systému.....	37
1.2.7.	MNS systém.....	38
1.2.7.1.	Protilátky MNS systému.....	38
1.2.8.	Lutheran systém.....	39
1.2.8.1.	Protilátky Lutheran systému.....	40
1.2.9.	P1PK systém.....	40
1.2.9.1.	Protilátky P1PK systému.....	41
1.2.10.	Diego systém.....	42
1.2.11.	Chido/Rodgers systém.....	42
1.3.	Imunohematologická sérologická vyšetření.....	43
1.3.1.	Principy vyšetření.....	43
1.3.1.1.	Přímá aglutinace (Solný test).....	43
1.3.1.2.	Nepřímá aglutinace (Antiglobulinové (Coombsovy) testy).....	43
1.3.1.3.	Enzymový test.....	44
1.3.2.	Metody vyšetření.....	44
1.3.2.1.	Skličkový test.....	44
1.3.2.2.	Zkumavkový test.....	45
1.3.2.3.	Agglutinace na mikrotitračních deskách.....	45
1.3.2.4.	Sloupcová aglutinace.....	46

1.3.2.5.	System pevné fáze.....	46
1.4.	Předtransfuzní vyšetření	47
1.4.1.	Vyšetření krevní skupiny	47
1.4.2.	Screening nepravidelných antierytrocytových protilátek.....	48
1.4.3.	Test kompatibility	49
1.4.3.1.	Elektronický test kompatibility.....	49
1.4.4.	Identifikace protilátek	49
1.4.5.	Časový požadavek na přípravu transfuze.....	50
1.4.5.1.	Vitální indikace	50
1.4.5.2.	Statim	51
1.4.5.3.	Rutina.....	51
1.5.	Molekulárně genetická vyšetření.....	52
1.5.1.	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	52
1.5.2.	Microarray metody	53
1.5.3.	PCR SSP.....	54
1.5.3.1.	Vyšetření slabého a variantního antigenu D	54
1.6.	Transfuzní přípravky	55
1.6.1.	Erytrocyty.....	55
1.6.2.	Trombocyty	56
1.6.3.	Plazma	57
1.6.4.	Granulocyty z aferézy	58
1.6.5.	Ozáření transfuzních přípravků	58
1.7.	Výběr vhodného transfuzního přípravku.....	59
1.7.1.	Novorozenci a děti	59
1.7.2.	Ženy ve fertilním věku	59
1.7.3.	Imunizovaní pacienti	60
1.7.4.	Pacienti s hematologickou/hematoonkologickou diagnózou a s AIHA.....	60

1.7.5. Pacienti po transplantaci.....	60
1.7.5.1. AB0 a RhD inkompatibilní transplantace krvevorných buněk	60
1.7.5.2. AB0 a RhD inkompatibilní orgánová transplantace	61
2. Experimentální část	64
2.1. Charakteristika souboru	64
2.2. Metodika	64
2.2.1. Screening protilátek a identifikace antierytrocytových protilátek	64
2.3. Kazuistika	68
Výsledky.....	69
Diskuse	88
Závěr.....	93
Použité zkratky	94
Seznam tabulek	96
Seznam obrázků	97
Seznam grafů.....	98
Použitá literatura	99

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Autor: Bc. Alena Klazarová

Školitel: RNDr. Gabriela Červená, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Eliška Rýznarová

Název diplomové práce: Detekce a identifikace erytrocytových protilátek u pacientů v souvislosti s transfuzí krve.

Cíl práce: Cílem práce je zhodnocení záchytu antierytrocytových protilátek u pacientů a gravidních žen na Transfuzním oddělení v Chebu a Transfuzním oddělení v Karlových Varech v letech 2021 až 2022. Zaměřuji se na četnost výskytu, typ i klinický význam protilátek, sleduji imunizaci respondentů v těhotenství, po podané transfuzi a hodnotím význam enzymového testu.

Metody: V práci jsou popsány metodiky používané na TO v Chebu při screeningovém vyšetření nepravidelných protilátek proti erytrocytům (nepřímý antiglobulinový test a enzymový test), kterými se zjišťuje jejich přítomnost ve vyšetřované plazmě.

Výsledky: Ve sledovaném souboru byly nejpočetněji zastoupeny protilátky z Rh systému a vyšší frekvence výskytu protilátky anti-Wr^a. Nejvíce protilátek bylo zachyceno ve věkové skupině 60-79 let, mírně dominovaly ženy. U některých respondentů (22,6 %) byla zjištěna kombinace specifických antierytrocytových protilátek. Imunizace po podání transfuzního přípravku (TP) byla potvrzena u 15,2 % pacientů z celkového počtu pozitivních nálezů. U 14 podaných TP došlo k potransfuzní reakci. Nespecifické reakce v enzymovém testu se vyskytovaly ve 14 % z celkového počtu pozitivních nálezů.

Závěr: Riziko imunizace lze snížit preventivním křížením dle Rh, Kell, eventuálně Jk fenotypu. Naše výsledky potvrdily proces aloimunizace v průběhu těhotenství. Rutinní použití enzymového testu na našem pracovišti není vhodné. Vzhledem k deleukotizaci TP při výrobě je výskyt potransfuzních reakcí nízký.

Klíčová slova: Imunohematologie, krevní skupiny, transfuze, antierytrocytové protilátky, imunizace, předtransfuzní vyšetření

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Author: Bc. Alena Klazarová

Supervisor: RNDr. Gabriela Červená, Ph.D.

Consultant: RNDr. Eliška Rýznarová

Title of thesis: Detection and identification of red blood cell antibodies in transfused patients

Background: The aim of the work is a statistical evaluation of the detection of anti-erythrocyte antibodies in patients and pregnant women at the Transfusion Department in Cheb and the Transfusion Department in Karlovy Vary in the years 2021 to 2022. I focus on the frequency, type and clinical significance of antibodies, followed by the occurrence of immunization of respondents after administration transfusion and I evaluate the significance of the enzyme test.

Methods: The work describes the methodologies used at the TO in Cheb during the screening examination of irregular antibodies against erythrocytes, which detect their presence in the examined plasma.

Main findings: Tasks from the Rh system and a higher frequency of occurrence of the anti-Wr^a region were the most represented in the monitored group. The most antibodies were detected in the 60-79 age group, slightly dominated by women. A combination of specific anti-erythrocyte antibodies was detected in some respondents (22.6%). Immunization after administration of transfusion preparation (TP) was confirmed in 15.2% of patients from the total number of positive findings. A post-transfusion reaction occurred in 14 administered TPs. Non-specific reactions in the enzyme test occurred in 14% of the total number of positive findings.

Conclusion: The risk of immunization can be reduced by preventive crossing according to Rh, Kell, possibly Jk phenotype. Our results confirmed the process of alloimmunization during pregnancy. The routine use of the enzyme test in our workplace is not appropriate. Due to the deleukotization of TP during production, the incidence of post-transfusion reactions is low.

Keywords: Immunohematology, blood groups, transfusion, antierythrocyte antibodies, immunization, pretransfusion testing

Úvod

Detekce a identifikace antierytrocytových protilátek jsou klíčové pro výběr správného transfuzního přípravku pacientům, kterým jsou indikovány transfuze.

V počátcích transfuzního lékařství postačovala k provedení transfuze shoda krevní skupiny v AB0 a Rh systému mezi dárce a příjemcem. Tento obor se v průběhu pár desítek let velmi posunoval. Současným trendem transfuzního lékařství je snaha o tzv. účelnou hemoterapii, což znamená, že pacientovi by měl být aplikován pouze transfuzní přípravek, který obsahuje takovou složku krve, která je pro něj v daném klinickém stavu přínosná. Je kladen důraz na maximální bezpečnost podávaných transfuzních přípravků.

Při výběru transfuzního přípravku se dodržuje kompatibilita v AB0 systému a RhD antigenu. Dále je pak u určitých skupin pacientů vhodná eventuálně širší shoda v ostatních systémech krevních skupin a podávají se transfuze dle individuálních potřeb (polytransfundovaní pacienti, děti, ženy ve fertilním věku). Velký význam shody antigenů dárce a příjemce je také při transplantacích krvetvorných buněk či orgánových transplantacích, kdy co nejvyšší shoda antigenů příjemce a dárce výrazně ovlivňuje úspěch procesu transplantace.

V průběhu let došlo k výraznému vývoji zejména v možnostech metod vyšetření. Nejstarší technikou imunohematologických vyšetření je zkumavkový test, pomocí kterého se prováděla veškerá vyšetření. Dnes je samozřejmostí provádět základní sérologické metody technikou sloupcové aglutinace, která postupně nahradila zkumavkové testy, i když menší laboratoře je stále využívají. Nyní jsou k dispozici již robustní laboratorní systémy i analyzátory a postupně se přistupuje i k automatizaci metod.

Sérologické metody patří mezi nejvíce rutinně využívané, ale v některých komplikovanějších případech nejsou vhodné a je nutno přistoupit např. k molekulárně genetickému vyšetření.

Zadání – cíl práce

Cílem teoretické části práce bylo popsat základní imunohematologické pojmy a děje důležité pro přiblížení problematiky krevně skupinových systémů, které hrají klíčovou roli při předtransfuzním vyšetření a při výběru kompatibilního transfuzního přípravku. Práce je dále zaměřena na výskyt a klinický význam nepravidelných antierytrocytových protilátek, včetně uvedení možných rizik.

Cílem experimentální části práce bylo zhodnocení zachytu antierytrocytových protilátek na Transfuzním oddělení v Chebu a Transfuzním oddělení v Karlových Varech v roce 2021 a 2022. Sledovaný soubor tvořila skupina pacientů (příjemci krevní transfuze) a gravidních žen (prenatální poradny), protože v průběhu těhotenství je žena vystavena zvýšenému riziku imunizace erytrocyty plodu. Nejdříve jsem uvedla použité techniky, metody a postupy, kterými byla testování prováděna. Ve vyšetření figuruje nejpoužívanější technika, kterou je sloupcová aglutinace (nepřímý antiglobulinový test v prostředí s nízkou iontovou silou, LISS-NAT). Součástí je i zajímavá kazuistika zachytu raritní protilátky anti-Wr^a. Ve výsledcích jsem se věnovala detekci klinicky významných i nespecifických antierytrocytových protilátek ve sledovaném období na Transfuzním oddělení v Chebu a Karlových Varech. Zaměřila jsem se na četnost výskytu protilátek v Rh systému a v ostatních erytrocytových systémech a výskyt směsí protilátek proti erytrocytům. Předmětem zkoumání byla také imunizace pacientů, jejich predispozice k tvorbě dalších aloprotilátek, snažila jsem se objasnit, zda lze imunizaci alespoň částečně zamezit. Věnovala jsem se nespecifickým nálezům v enzymovém testu a významem tohoto vyšetření u všech prováděných screeningů antierytrocytových protilátek na našem pracovišti. V závěru jsem uvedla počty příjemců transfuzí, podaných TP a hlášený výskyt potransfuzních reakcí po podané transfuzi z klinických oddělení.

Teoretická část

1.1. Základní pojmy

1.1.1. Antigen

Antigen (Ag), někdy také imunogen, je velká organická molekula složité struktury, která je schopna vyvolat tvorbu protilátek. Antigen může být rozpustný v tělních tekutinách nebo se vyskytuje na povrchu buněk, pro vyvolání tvorby protilátek musí být dostatečně velký. Na antigenu se nacházejí tzv. epitopy neboli antigenní determinanty, což jsou malá vazebná místa pro protilátku. Antigeny se skládají většinou z aminokyselin spojených do polypeptidu, jsou tedy bílkovinné povahy, nebo mohou být složeny z jednoduchých cukrů spojených do polysacharidů (*Hrubíško, 1983*).

Mezi antigeny patří i tzv. hapteny. Hapteny jsou malé molekuly, které samy o sobě nedokážou vyvolat protilátkovou odpověď, ale za určitých podmínek může i takto malá molekula tvorbu protilátek vyvolat. K tomuto ději může dojít v případě, že se tato nízkomolekulární látka naváže na tělu vlastní makromolekulu, například albumin. Takto vzniklý komplex je dostatečně velký a malá makromolekula funguje jako antigenní determinanta (*Jílek, 2008*).

Antigeny vlastního těla (autoantigeny) jsou za fyziologických podmínek tolerovány (*Navrátil a spol., 2008*).

1.1.1.1. Antigeny krevně skupinových systémů

Antigeny krevně skupinových systémů jsou uloženy na povrchu krevních buněk a to erytrocytů, leukocytů a trombocytů, ale také ve tkáních. Mohou být jedinečné pro určitý typ buňky nebo se nacházejí společně na více typech krevních buněk nebo tkání. Tyto antigeny jsou funkční součástí buněčné membrány. Strukturně se jedná nejčastěji o proteiny či glykoproteiny a nacházejí se na vnější straně membrány (*Jilková, 2009*).

V současné době rozeznáváme přes 330 erytrocytových antigenů, z nichž je necelých 300 řazeno do 36 systémů erytrocytových krevních skupin, dále do kolekcí a sérií antigenů s nízkou (LFA), respektive vysokou frekvencí výskytu (HFA) (*Řeháček a spol., 2013; Drunecká, 2017*).

- a) **Systémy krevních skupin** – označovány jako soubor fenotypů, definovaných lidských protilátek se společnými vlastnosti jako je biochemická struktura, definovaná lokace na chromozomu s identifikovaným a sekvenovaným genem.
- b) **Kolekce** – označována jako soubor dvou a více antigenů se sérologickou, biochemickou, ale případně i genetickou podobností, ale nesplňující potřebná kritéria systému.
- c) **Série** – do této skupiny jsou zařazeny antigeny, které neodpovídají definovaným systémům ani kolekcím.
- Antigeny s nízkou frekvencí výskytu (LFA), incidence je nižší než 1 % výskytu v populaci.
 - Antigeny s vysokou frekvencí výskytu (HFA), incidence je vyšší než 90 % výskytu v populaci (*Řeháček a spol., 2013*).

1.1.2. Protilátka

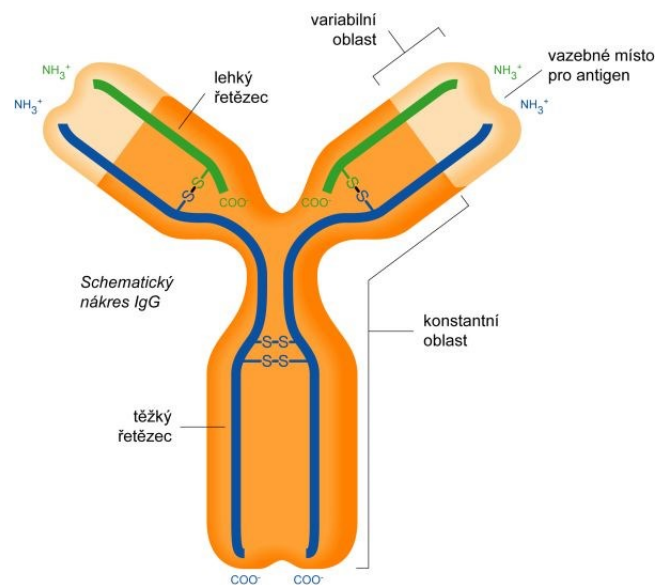
Protilátky (Ab) jsou jedny z mnoha bílkovin nacházející se v krevní plazmě. Těchto protilátek je v krevní plazmě nespočet a jsou namířené proti obrovskému množství různých antigenů (*Hrubíško, 1983*).

Strukturně patří mezi globuliny, přesněji mezi gama-globuliny, a protože jejich funkce spočívá v zajištění tvorby specifických protilátek proti příslušnému antigenu (humorální obrana), nazýváme je jako tzv. imunoglobuliny (Ig). Základní jednotkou je tedy imunoglobulin, který je tvořen čtyřmi řetězci, 2 těžké H a 2 lehké L, které jsou vzájemně spojeny disulfidickými můstky. Poměr lehkých řetězců kappa (κ): lambda (λ) ve všech molekulách Ig v organismu nezávisle na třídě Ig je u člověka 65:35. Vzájemný poměr je pro jednotlivé živočišné druhy charakteristický.

Jejich názvy jsou odvozeny od řeckých písmen, znázorněno viz obrázek č. 1. Každý z řetězců obsahuje na N-zakončení variabilní oblast, která je odpovědná za specifitu protilátky. Variabilní místo, kde se specificky váže antigen, se nazývá paratop (*Hrubíško, 1983; Jilková, 2009*).

Dvě horní variabilní části molekuly Ig jsou místem vazby se specifickým antigenem a nazývají se Fab konce řetězce Ig. Jsou tvořeny lehkými řetězci kappa (κ) nebo lambda (λ) a částí těžkých řetězců podle toho o jakou třídu Ig se jedná. Spodní část molekuly Ig je tvořena pouze dvěma těžkými řetězci a označuje se jako Fc konec molekuly Ig. Horní a dolní části molekuly jsou spojeny v pantové oblasti, která umožňuje rozevření molekuly a snadnou vazbu s antigenem. V tomto místě lze molekulu Ig štěpit proteolytickým enzymem.

Obrázek č. 1 – Struktura protilátky



Zdroj: *Web e-learning VŠCHT*

1.1.2.1. Přehled jednotlivých tříd imunoglobulinů

Třídy Ig rozlišujeme dle aminokyselin v těžkých řetězcích, na IgG (těžké řetězce γ), IgM (těžké řetězce μ), IgA (těžké řetězce α), IgD (těžké řetězce δ), IgE (těžké řetězce ϵ). V imunologii erytrocytů se uplatňují zejména protilátky typu IgG a IgM, zřídka IgA.

IgG

- Přibližně 70-80 % ze všech imunoglobulinů
- Strukturně se jedná o monomer, inkompletní protilátku
- IgG tvoří podtřídy IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4
- Podtřídy IgG1 a IgG3 aktivují komplement a jsou klinicky významné
- Nacházejí se v tělních tekutinách a ve tkáních
- Biologický poločas je 21 dní

- Procházejí přes placentu
- Jsou typické pro sekundární imunitní odpověď

IgM

- Přibližně 5-10 % ze všech imunoglobulinů
- Strukturně se jedná o pentamer spojený J řetězcem, kompletní protilátka
- Biologický poločas je 6 dní
- Neprocházejí placentou
- Silně aktivují komplement, po kontaktu s antigenem jsou tvořeny jako první

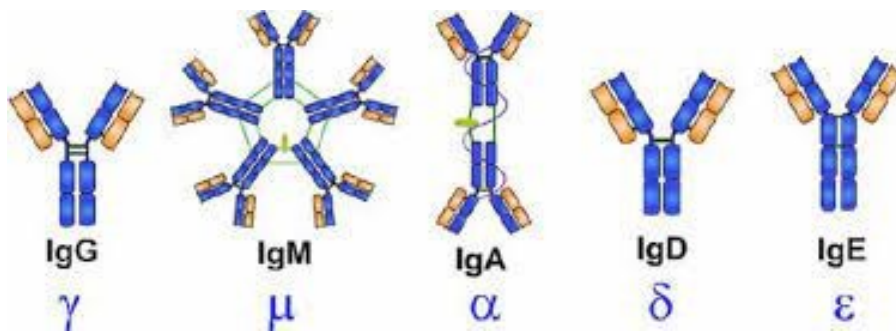
IgA

- Přibližně 5-15% ze všech imunoglobulinů
- Strukturně se jedná o čtyř-řetězcovou jednotku spojenou J řetězcem do dimeru
- IgA tvoří podtřídy IgA1 a IgA2
- Nacházejí se ve slizničních sekretech
- Biologický poločas je 6 dní
- Slabě aktivují komplement

IgD a IgE

- Obsah těchto imunoglobulinů je v séru velmi nízký
- Jejich biologický poločas je přibližně 3 dny
- IgD je vázán na povrchu lymfocytů a je zvýšen při chronických infekcích
- Funkce IgE spočívá v ochraně proti parazitům, při patologických stavech je příčinou alergických reakcí (*Jilková, 2009; Jílek, 2008*)

Obrázek č. 2 – Struktura jednotlivých imunoglobulinů



Zdroj: Holubová, 2017

Z hlediska klinické významnosti protilátek v imunohematologii se budeme nejvíce zabývat protilátkami třídy IgG a IgM, vzácně se mohou uplatňovat i IgA.

1.1.2.2. Imunizace

Imunizace je proces, při kterém dochází k tvorbě specifických protilátek po kontaktu s cizorodým antigenem. V našem případě může typicky docházet k imunizaci po transfuzi, kde cizorodý antigen představují dárcovské erytrocyty. Dalším příkladem je transplantace orgánů, kdy orgán představuje obrovský komplex cizích antigenů, nebo také imunizace během těhotenství, kdy cizorodý antigen mohou představovat krvinky plodu (Řeháček a spol., 2013).

Primární imunizace – organismus se s daným antigenem setkal poprvé.

Sekundární imunizace – organismus byl již daným antigenem imunizován a došlo k opětovné aktivaci protilátkové odpovědi po kontaktu s tím samým antigenem (Masopust a Písačka, 2016).

1.1.2.3. Protilátky proti antigenům krevně skupinových systémů erytrocytů

Klinický význam se odvíjí od typu protilátky, je dán imunogenitou daného antigenu, který tvorbu protilátek vyvolal.

Dělení podle teplotního charakteru:

- Tepelné – optimum reakce je 37 °C
- Chladové – optimum reakce je 4°C nebo 20 °C

- Bifázické – navazují se na erythrocyty za chladu (většinou při 4 °C), aktivují komplement a k hemolýze dochází až při vyšších teplotách (37 °C) (*Nathan and Oski's, 2009*)

Dělení podle původu vzniku:

- Přirozené pravidelné protilátky
- Přirozené nepravidelné protilátky
- Imunní nepravidelné protilátky
- Pasivně přenesené protilátky

Přirozené pravidelné protilátky

Mezi přirozené pravidelné protilátky řadíme protilátky krevního systému AB0, které se v organismu vyskytují fyziologicky. Na rozdíl od tvorby bílkovin je tvorba protilátek vždy odpovědí na přítomnost antigenu, který v organismu přítomen není. Tvorba protilátek AB0 systému (anti-A a anti-B) je po narození podmíněna osídlením střev bakteriemi, v jejichž buněčné stěně jsou přítomny antigeny, podobné antigenům A a B na erythrocytech člověka. Ke tvorbě pravidelných přirozených protilátek anti-A nebo anti-B dochází podle toho jakou krevní skupinu novorozenec má. Tyto protilátky jsou většinou třídy IgM, určitou část tvoří protilátky IgG, jejichž titr po imunizaci narůstá, například po inkompatibilní AB0 transfuzi krve nebo při graviditě (*Rýznarová, 2022*).

Přirozené nepravidelné protilátky

Výjimečně se mohou vyskytovat protilátky přirozené nepravidelné. Lze sem řadit protilátky proti antigenům jiných systémů, například protilátku anti-E, která se může ojediněle vyskytovat při některých infekcích (*Řeháček a spol., 2013*).

Imunní nepravidelné protilátky

Protilátky, které se vytvořily až po imunizaci, tedy po kontaktu s cizorodým antigenem, označujeme jako nepravidelné imunní protilátky a bývají většinou třídy IgG. V časně fázi primární imunitní odpovědi převládají IgM, později převažují IgG, stejně jako po sekundární imunizaci (*Řeháček a spol., 2013*).

Pasivně přenesené protilátky

Tyto protilátky mohou být přítomny po podání imunoglobulinů. Typickým příkladem je anti-D profylaxe v těhotenství u RhD negativních matek. Dále mohou být přítomny po podání klinické plazmy, lymfocytů z transplantovaného orgánu nebo hematopoetických buněk (*Masopust a Písačka, 2016*).

Protilátky třídy IgG, na rozdíl od IgM, mají schopnost díky své malé molekule procházet placentou, tím mohou senzibilizovat fetální erythrocyty plodu a následně způsobit jejich destrukci (*Řeháček a spol., 2013*).

Tři mechanismy působení protilátek:

a) Aktivace komplementové kaskády

- Uplatňují se spíše protilátky IgM, díky své velké molekule jsou v reakci účinnější.
- Při AB0 inkompatibilitě je aktivace masivní, dochází k překonání regulačních mechanismů a následně k ruptuře membrány erythrocytů, způsobuje akutní hemolytickou potransfuzní reakci (HTR).
- Non-AB0 inkompatibilita nebo autoimunitní hemolytické anémie (AIHA) mají mírnější průběh a následky než při AB0 inkompatibilitě.
- Vede k intravaskulární i extravaskulární hemolýze.

b) Fagocytóza senzibilizovaných erythrocytů

- Erythrocyty jsou označeny protilátkou IgG nebo C3d složkou komplementu, toto označení rozpoznávají monocyty a makrofágy, které takto označené buňky fagocytují.
- Vede k extravaskulární hemolýze.

c) Přímé ovlivnění stability membrány způsobené vazbou protilátek

- Záleží na mnoha faktorech, velkou roli hraje například kvantita, specifita a třída protilátek, dále také vlastnosti antigenu, například jeho imunogenita, specifita nebo exprese.
- Klinické projevy mohou být mírné (někdy také bezpříznakové) až fatální (*Řeháček a spol., 2013*).

1.1.2.4. Autoprotilátky a aloprotilátky

V imunohematologii se běžně setkáváme s pojmem autoprotilátka a aloprotilátka. Jak bylo již výše zmíněno, za fyziologických podmínek jsou antigeny vlastního těla tolerovány. Za patologických stavů může docházet k narušení tolerance, což má za následek vznik autoprotilátek – tedy protilátek proti tělu vlastním antigenům.

Aloprotilátka je protilátka, která vznikla po kontaktu s cizím antigenem (antigeny dárcovských erytrocytů, plodu atd.), který organismus nezná a je mu cizí, proces se tedy nazývá aloimunizace.

Ačkoliv jsou autoprotilátky méně závažné než aloprotilátky, mohou nepříjemně komplikovat širokou škálu vyšetření. Jejich přítomnost může způsobit falešně pozitivní reakce nebo mohou překrývat paralelní výskyt specifické aloprotilátky, kterou skrze autoprotilátky nevidíme.

1.1.3. Komplementový systém

Do komplementového systému patří asi 30 plazmatických a membránových proteinů, které vzájemně kooperují mezi sebou i dalšími složkami účastnících se imunitních procesů.

Hlavní funkce komplementu:

- Opsonizace
- Chemotaxe
- Lýza buňky

Principiálně dochází ke kaskádovité aktivaci neaktivních forem enzymů na jejich aktivní formy, které dále působí na další složky. Konečným produktem celého procesu je komplex proteinů, který perforuje membránu příslušné buňky, v našem případě erytrocytu (*Hořejší a Bartůňková, 2005*).

1.1.3.1. Mechanismy aktivace komplementu

Dnes známe 3 způsoby aktivace komplementu, které se od sebe liší počáteční fází procesu, a to spuštěním aktivace komplementové kaskády. Postupně se cesty sbíhají u složky C3 a výsledek aktivace je u všech totožný (*Jilek, 2008*).

Klasická cesta aktivace

Iniciačním podnětem je kontakt s protilátkou. Na začátku klasické aktivace je komplex antigenu a protilátky (IgG nebo IgM). Na tento komplex se váže složka C1. Aktivovaná složka C1 štěpí C4 na fragmenty C4a a C4b a dále C2 složku na fragmenty C2a a C2b, čímž se zahajuje komplex na sebe navazujících dějů. C4b se váže na buněčnou membránu, C4a je uvolněn do prostředí, zatímco C2a a C4b spolu tvoří komplex (C4bC2a) navázaný na membránu označován jako C3 konvertáza. C3 konvertáza dále štěpí C3 na fragmenty C3a a C3b. Poté složky C3b, C4b a C2a tvoří komplex (C4bC2aC3b) nazývaný jako C5 konvertáza, což je konečný krok klasické cesty, dále je cesta společná s ostatními cestami aktivace komplementu (*Penka a spol., 2012*).

Alternativní cesta aktivace

Iniciačním podnětem je chemická látka – endotoxin bakterií. Začíná aktivací C3 složky komplementu a vyžaduje faktory B a D a hořčnaté kationty, které jsou obsaženy v krevním séru. Při této cestě vzniká komplex C3bBb, který zde funguje jako C3 konvertáza. V této aktivaci se neuplatňují protilátky (*Penka a spol., 2012*).

Lektinová cesta aktivace

Iniciačním podnětem je sérový lektin. Tato cesta také nevyžaduje přítomnost protilátky, ale využívá lektinu, který je podobný jedné ze C3 složek. Aktivace se navozuje vazbou bílkoviny lektinu (MBL – lektin vázající manózu) na povrchy obsahující polysacharidy (manany). Dále vznikají další proteázy (MASP-1 a MASP-2 – mannose associated serine proteases), které spolu s lektinem vytváří komplex následně štěpící složky komplementu (*Penka a spol., 2012*).

Dokončení aktivace komplementu – společná závěrečná cesta lytická

Zde se zapojuje C5 konvertáza, vede k připojení složek C6, C7, C8 a následně C9. Konečným produktem je komplex C5bC6C7C8C9 označován jako MAC (komplex atakující membránu), který způsobuje poškození membrány a následnou lýzu buňky (*Penka a spol., 2012; Jílek, 2008*).

1.1.4. Reakce antigen-protilátka

Vazba antigen-protilátka je zprostředkována nekovalentními vazbami, mezi které patří vodíkové síly, elektrostatické síly, Van der Waalsovy síly a hydrofobní interakce. Vazba je reverzibilní, slabá a funguje pouze na malou vzdálenost. Čím je množství vazeb větší, a čím vyšší je vzájemná komplementarita mezi antigenem a protilátkou, tím pevnější je jejich vazba (*Penka a spol., 2012*).

Reakci antigenu a protilátky ovlivňuje mnoho faktorů, mezi nejdůležitější patří kvalita a kvantita antigenu a protilátky, pH, teplota nebo doba inkubace (*Penka a spol., 2012*).

1.2. Systémy krevních skupin

Dnes je známo 36 krevně skupinových systémů, přehled je zpracován v následující tabulce.

Tabulka č. 1 – Přehled skupinových systémů

Pořadí	Název systému	Zkratka systému	Název genu	Lokace na chromozomu
1	AB0	AB0	AB0	9q34.2
2	MNSs	MNS	GYPA, GYPB, GYPE	4q31.21
3	P1PK	P1PK	A4GALT	22q11.2-qter.
4	Rh	RH	RHD, RHCE	1p36.11
5	Lutheran	LU	LU	19q13.32
6	Kell	K	KELL	7q34
7	Lewis	LE	FUT3	19p13.3
8	Duffy	FY	DARC	1q23.2
9	Kidd	JK	SLC14A1	18q12.3
10	Diego	DI	SLC4A1	17q21.31
11	Yt	YT	ACHE	7q22.1
12	Xg	XG	XG, MIC2	Xp22.33
13	Scianna	SC	ERMAP	1p34.2
14	Dombrock	DO	ART4	12p12.3
15	Colton	CO	AQP1	7p14.3
16	Landsteiner-Wiener	LW	ICAM4	19p13.2
17	Chido/Rodgers	CH/RG	C4A, C4B	6p21.3
18	H	H	FUT1	19q13.33
19	Kx	XK	XK	Xp21.1
20	Gerbich	G	GYPE	2q14.3
21	Cromer	CROM	CD55	CD55 1q32.2
22	Knops	KN	CR1	1q32.2
23	Indian	IN	CD44	11p13
24	Ok	OK	BSG	19p13.3
25	Raph	RAPH	CD151	11p15.5
26	John Milton Hagen	JMH	SEMA7A	15q24.1
27	I	I	GCNT2	6p24.2
28	Globoside	GLOB	B3GALT3	3q26.1
29	Gill	GILL	AQP3	9p13.3
30	RHAG	RHAG	RHAG	6p21-qter
31	FORS	FORS	GBGT1	9q34.13-q34.3
32	JR	JR	ABCG2	4q22.1
33	LAN	LAN	ABCB6	2q36
34	Vel	VEL	SMIM1	1p36.32
35	CD59	CD59	CD59	11p13
36	Augustine	AUG	SLC29A1	6p21.1

Zdroj: Řeháček, 2013; Drunecká, 2017

1.2.1. AB0 systém

Objevení AB0 systému bylo zlomovým obdobím pro transfuzní lékařství, kdy se pochopily základní principy a výrazně se zvýšila bezpečnost transfuzí a s tím spojené snížení morbidit. V roce 1901 byly popsány tři krevní skupiny, tehdy označované jako A, B a C (krevní skupina C se později pojmenovala jako krevní skupina 0). O rok později byla popsána i poslední krevní skupina AB (Farhud, 2013).

AB0 systém je nejdůležitějším krevním systémem ze všech krevních systémů. Jako jediný totiž disponuje jedinečnou vlastností, a to existencí přirozených protilátek proti antigenům, které na vlastních erythrocytech nejsou přítomny. Tyto protilátky jsou velmi účinné, vyskytují se ve vysokém titru a mají vysoký hemolytický potenciál, kdy je hemolýza způsobená aktivací komplementového systému. Inkompatibilní transfuze v AB0 systému vede k rozvoji akutní hemolytické potransfuzní reakce, která má velmi závažné až fatální následky – rozvoj šokového stavu, diseminované intravaskulární koagulace (DIC) a renálního selhání. Je tedy nutné dodržovat AB0 kompatibilitu dárce s příjemcem transfuze (Řeháček a spol., 2013).

Fetomaternální inkompatibilita není v AB0 systému tak nebezpečná, protože se na fetálních erythrocytech vyskytuje nižší počet antigenů A a B. Těžké fetální anémie jsou vzácné a týkají se většinou matek krevní skupiny 0, kde bývají i vyšší titry protilátek oproti ostatním krevním skupinám (Řeháček a spol., 2013).

Tabulka č. 2 – Frekvence výskytu krevních skupin v populaci

Krevní skupina	ČR	Evropa
0	30-34 %	30-56 %
A	40-44 %	32-53 %
B	15-18 %	7-24 %
AB	8-9 %	1-8 %

Zdroj: Masopust a Písačka, 2016

Tabulka č. 3 – Přehled základních vlastností AB0 systému

Krevní skupina	Antigeny	Aglutininy	Genotyp
0	žádné	anti-A, anti-B	00
A	A	anti-B	AA nebo A0
B	B	anti-A	BB nebo B0
AB	A, B	žádné	AB

Zdroj: Masopust a Písačka, 2016

1.2.1.1. Geny AB0 systému

Gen AB0 je lokalizován na 9. chromozomu a má tři základní alely, dvě kodominantní alely A a B a jednu recesivní alelu 0. Tyto alely kódují glykosyltransferázy, které jsou zodpovědné za syntézu antigenu A a B. Pokud ke glykosylaci nedojde, vzniká krevní skupina 0 (*Řeháček a spol., 2013*). „Konečné formy antigenů tohoto systému jsou také ovlivňovány produkty genů kódujících fukosyltransferázy podílející se na výstavbě prekurzorového H řetězce: H (FUT1), Secretor (FUT2) a Lewis (FUT3)“ (*Masopust a Písačka, 2016*).

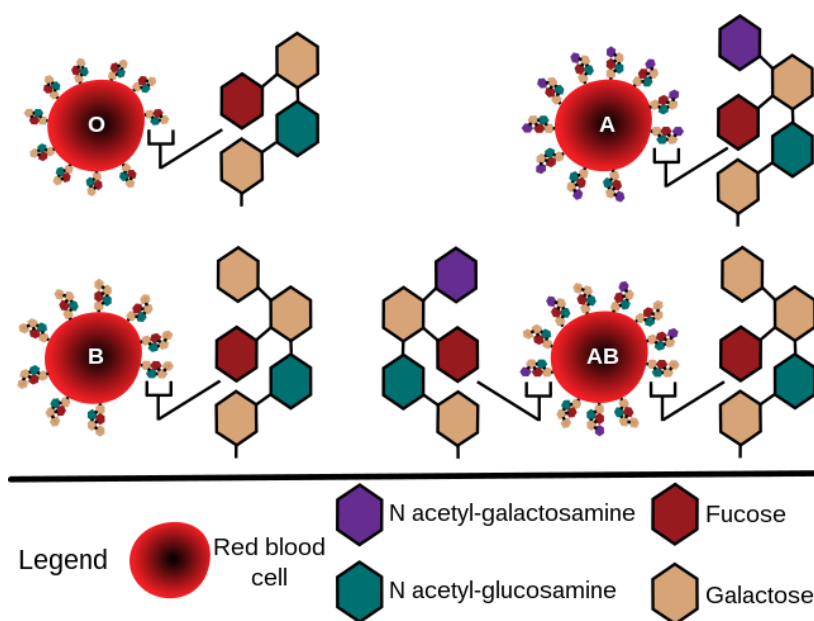
S AB0 systémem úzce souvisí systém H, který je lokalizován na 19. chromozomu a obsahuje antigeny H a h. Dále existuje vzájemný vztah genů Se a se, které jsou taktéž lokalizovány na 19. chromozomu. Jedinci, kteří jsou nosiči kombinace genů SeSe nebo Sese se nazývají jako tzv. sekretoři, vylučují AB0 substance do tělních tekutin (přibližně 80 % populace), zatímco nosiči kombinace sese tyto substance nevylučují a nazývají se jako tzv. nonsekretoři (přibližně 20 % populace) (*Eckstein, 1994*).

1.2.1.2. Antigeny AB0 systému

Antigeny krevního systému AB0 jsou terminální oligosacharidy složené z jednoduchých cukrů, typ navázaného cukru definuje příslušnou krevní skupinu. Antigeny jsou součástí membrány erytrocytu a jejich rozpustná forma je obsažena v tělních sekretech, nacházejí se ale i na dalších krevních buňkách a většině tkáňových buněk (*Řeháček a spol., 2013*).

Základem je prekurzorový H řetězec, který vzniká připojením monosacharidu L-fukózy. Pokud zůstane řetězec dále nepokrytý, jedná se o krevní skupinu 0 a je označován jako antigen H. U krevní skupiny A se na prekurzorový řetězec H připojuje pomocí glykosyltransferáz imunodominantní monosacharid N-acetyl-D-galaktosamin, u krevní skupiny B je to D-galaktóza (*Dean, 2005a*).

Obrázek č. 3 – Přehled navázaných monosacharidů u jednotlivých krevních skupin



Zdroj: Web LibreTexts CHEMISTRY, 2021

Zvláštním případem je vzácný Bombay fenotyp (O_h), u kterého nedochází k tvorbě antigenu A, B ani H. Důsledkem chybní prekurzorového řetězce H nemůže dojít k navázání imunodominantních monosacharidů. V plazmě je přítomna protilátka anti-A, anti-B a anti-H. Případné podání transfuze je velice komplikované vzhledem k přítomným protilátkám, protože sérum/plazma příjemce poskytuje pozitivní reakci se všemi typy erytrocytů A, B, AB i včetně univerzální krve krevní skupiny 0 (H). U nosičů tohoto vzácného fenotypu se doporučuje zvážit možnost autologních odběrů nebo vyhledání dárce taktéž s Bombay fenotypem (bez antigenu H) (*Shrivastava a spol., 2015; Rýznarová, 2022*). Pro takovéto případy je zaveden registr dárců vzácných krevních skupin, kde se vyhledává vhodný dárce.

1.2.1.3. Podskupiny AB0 systému

Nejčastější podskupiny jsou A_1 a A_2 (80 % A_1 a 20% A_2), ostatní podskupiny u fenotypů A i B se vyskytují zřídka a mají slabou expresi antigenů. Jednotlivé podskupiny se liší kvantitativním i kvalitativním zastoupením příslušných antigenů, se zvyšujícím se číslem označení podskupiny klesá postupně od A_1 počet antigenních míst. Rozdíly mezi nimi jsou způsobeny mutacemi a rozdílnou aktivitou transferáz (*Řeháček a spol., 2013; Masopust a Písačka, 2016*).

Transferáza A₁ je neúčinnější, dokáže zpracovat všechny typy prekurzorových řetězců H, zatímco transferáza A₂ je méně účinná a dokáže využít jen prekurzorový řetězec s určitým typem struktury, zbylé nepřeměněné řetězce zůstávají ve formě antigenu H (*Masopust a Písačka, 2016*).

1.2.1.4. Protilátky AB0 systému

Přítomnost těchto protilátek má obrovský význam z hlediska transfuze krve a její kompatibility, která se musí dodržet vždy, jak bylo psáno již v úvodu této kapitoly.

Přirozené pravidelné protilátky AB0 systému jsou označovány jako tzv. aglutininy. Mezi ně patří protilátky anti-A a anti-B, které jsou chladového charakteru a třídy IgM (mohou být ale i třídy IgG a IgA). Typ protilátky je tvořen podle chybějícího (cizího) antigenu, který vlastní erythrocyty nenesou. Vytvářejí se v průběhu prvních měsíců života, od 6 měsíců po narození jsou již dobře prokazatelné (*Masopust a Písačka, 2016*).

Mohou se zde vyskytovat přirozené nepravidelné protilátky, často bývají chladového charakteru, obvykle IgM, při zvýšení teploty na 37 °C ztrácejí účinnost. Protilátka anti-A₁ se vyskytuje jako pravidelná přirozená protilátka pouze u krevní skupiny B a 0. Protilátka anti-A₁ se může vyskytovat také jako nepravidelná přirozená protilátka u slabých podskupin krevní skupiny A (A₂ nebo A₂B). Klinicky významná může být pouze v případech, že reaguje při 37°C (*Masopust a Písačka, 2016*). Další možnou přirozenou nepravidelnou protilátkou je protilátka anti-H (0), reagující při vyšetření aglutininů nečekaně s diagnostickými erythrocyty A₂ a 0. V tomto případě nelze podávat krev krevní skupiny 0 z vitální indikace (*Rýznarová, 2022*).

1.2.2. Rh systém

Rh systém je druhým nejvýznamnějším a zároveň nejpolymorfnějším skupinovým systémem vyskytujícím se pouze na erythrocytech. Byl objeven v roce 1939, u ženy, která dostala transfuzi krve od svého manžela a následně porodila mrtvý plod. Ženě byly poté nalezeny protilátky v séru reagující s erythrocyty 85 % jedinců, které však byly AB0 kompatibilní. Byla prokázána souvislost mezi úmrtím plodu a nalezenými protilátkami, které byly namířeny proti v té době neznámému antigenu. V roce 1940 bylo poprvé použito označení Rh, které vzniklo na základě experimentu, kdy pomocí erythrocytů opice *Macacus rhesus* došlo k imunizaci králíků a v jejich séru byla následně zjištěna přítomnost protilátky (*Penka a spol., 2012; Jilková, 2009*).

1.2.2.1. Geny Rh systému

Geny Rh systému jsou lokalizovány na 1. chromozomu ve třech lokusech uložených velmi blízko sebe. Rh systém je kódován dvěma geny, RHD gen pro expresi RhD proteinů, které tvoří antigen D a RHC gen pro expresi RhCcEe proteinů, které tvoří antigeny C, c, E, e (*Penka a spol., 2012; Eckstein, 1994*).

Lokusy:

- Lokus 1 – alela C a c
- Lokus 2 – alela D a d
- Lokus 3 – alela E a e

Alely se mohou v lokusech vzájemně zastoupit. Na určitém lokusu můžou být vždy jen 2 ze 6 alel, tím pádem je počet možných genových kombinací omezen na následujících 8 možností: cde, Cde, cDe, cdE, CDE, cDE, CdE, CDE (*Eckstein, 1994*).

U RhD negativních jedinců chybí celý RhD protein, což je způsobeno delecí genu RHD, a proto nedochází k expresi antigenu D. U černošské populace je gen přítomen, ale je inaktivován a tím pádem se antigen D také neexprimuje (*Penka a spol., 2012*). Na lokusu je u RhD negativních jedinců kombinace alel dd, kdy alela d je němá a nezpůsobuje expresi žádného antigenu (antigen d neexistuje) (*Jilková, 2009*).

1.2.2.2. Antigeny Rh systému

Rh systém obsahuje 56 antigenů polypeptidové struktury, mezi nejdůležitější patří antigeny D, C, c, E, e, C^w (*Masopust a Písačka, 2016*).

Antigen D

V naší populaci se vyskytuje přibližně u 85 % jedinců a jsou označovány jako RhD pozitivní, zbylých 15 % tento antigen nemá a jsou označovány jako RhD negativní.

Antigen D je velmi imunogenní, až u 80% RhD negativních jedinců, tedy bez antigenu D, dojde po podání transfuze s RhD pozitivními erytrocyty k vytvoření protilátky anti-D. Je tedy žádoucí dodržet RhD kompatibilitu, a to zvláště u žen ve fertilním věku (*Penka a spol., 2012*).

U RhD negativních žen se během těhotenství preventivně podává polyklonální imunoglobulin anti-D. Do 72 hodin po porodu se v případě, že je dítě RhD pozitivní, podává znovu anti-D profylaxe. Imunoglobulin anti-D vyváže velmi rychle RhD pozitivní erythrocyty dítěte a zabrání tak imunizaci matky krvinkami dítěte, které se mohou při porodu dostat do oběhu matky (*Roubalová, 2020*).

Slabý D antigen (D^w, D weak)

Vlivem bodových mutací genu RHD dochází ke změně intramembranózní části RhD proteinu, ale extramembranózní část proteinu je beze změny. Toto má za následek kvantitativní změny, které jsou způsobeny menším množstvím kopií antigenu D, ale sérologické a imunologické vlastnosti jsou totožné s antigenem D. Jedinci nesoucí slabý antigen D mohou dostávat RhD pozitivní erythrocyty a nevytvářejí protilátku anti-D (*Jilková, 2009*).

Variantní D antigeny

Zde se změny na rozdíl od D^w antigenu promítají do extramembranózní části RhD proteinu, což má za následek vytvoření strukturně odlišného antigenu D. Takto pozměněný antigen může způsobit tvorbu imunní protilátky anti-D. Jsou označovány římskými číslicemi D^I, D^{II}, D^{III}, D^{IV}, D^V, D^{VI} atd. Je známo více než 50 variant, z nichž klinicky nejvýznamnější je varianta D^{VI} (*Jilková, 2009; Masopust a Písačka, 2016*).

Antigeny C, c, E, e

Za tyto antigeny je zodpovědný gen RHC, na proteinu RhCcEe se exprimují dané antigeny, které jsou vzájemně kodominantní (*Penka a spol., 2012*).

Antigen C^w

Antigen C^w vzniká při změnách proteinu RhCcEe, vyskytuje se téměř vždy společně s antigenem C. V přítomnosti antigenu C^w je exprese antigenu C snížena. Dnes je již rutinně vyšetřován v rámci vyšetření Rh fenotypu, protože se zjistilo, že je v ČR relativně častý výskyt, vyšší než v ostatních zemích (*Penka a spol., 2012*).

Antigen G

Vyskytuje se téměř vždy současně s antigenem C nebo D, pravděpodobně jde o entitu společnou pro oba antigeny a nejspíše proto mohou RhD negativní jedinci tvořit protilátky anti-D+C po imunizaci pouze D pozitivními nebo C pozitivními erytrocyty. Pak se ve skutečnosti jedná o protilátku anti-D+G, anti-C+G, případně anti-G. Velmi vzácně se vyskytuje u jedinců s antigeny C negativní a D negativní (*Masopust a Písačka, 2016*).

Složené antigeny

Tyto antigeny vyvolávají imunizaci a vedou k tvorbě protilátek jen v případě, pokud jsou antigeny pouze na jednom společném autozomu (poloha cis), pokud jsou antigeny na protilehlém autozomu (poloha trans), k tvorbě protilátek nedochází. Tyto antigeny pak označujeme jako antigen ce (antigen f), antigen Ce, antigen CE, antigen cE (*Masopust a Písačka, 2016*).

Tabulka č. 4 – Frekvence výskytu významných Rh antigenů v populaci

Antigen		Frekvence výskytu
D	D pozitivní	82-88 %
	D negativní	12-18 %
C		65-70 %
c		80-85 %
E		25-30 %
e		98 %
C^w		1-2 %
G		85 %

Zdroj: *Masopust a Písačka, 2016*

Tabulka č. 5 – Přehled Rh fenotypů a genotypů, frekvence výskytu u RhD pozitivních

Fenotyp	Genotyp	Frekvence výskytu*
CCee	DcE/DcE	17,7 %
	DcE/dcE	0,8 %
ccEE	DcE/DcE	2,0 %
	DcE/dcE	0,3 %
ccee	Dce/Dce	0,1 %
	Dce/dce	2,0 %
CCEE	DCE/DCE	< 0,01 %
	DCE/dCE	< 0,01 %
Ccee	DcE/Dce	2,2 %
	DcE/dce	32,7 %
	Dce/dcE	0,05 %
ccEe	DcE/Dce	0,7 %
	DcE/dce	11,0 %
	Dce/dcE	0,06 %
CCee	DcE/DCE	0,2 %
	DCE/dcE	< 0,01 %
	DcE/dCE	< 0,01 %
CcEE	DcE/DCE	11,9 %
	DCE/dcE	1,0 %
	DcE/dCE	0,3 %
CcEe	DcE/DcE	11,9 %
	DcE/dcE	1,0 %
	DcE/dcE	0,3 %
	DCE/dce	0,2 %
	Dce/DCE	0,01 %
	Dce/dCE	< 0,01 %

Zdroj: *Masopust a Písačka, 2016*

*Frekvence výskytu je uváděna RhD pozitivních a RhD negativních jedinců dohromady

Tabulka č. 6 – Přehled Rh fenotypů a genotypů, frekvence výskytu u RhD negativních

Fenotyp	Genotyp	Frekvence výskytu*
CCee	dCe/dCe	0,01 %
ccEE	dcE/dcE	0,01 %
ccee	dce/dce	15,1 %
CCEE	dCE/dCE	< 0,01 %
Ccee	dCe/dce	0,8 %
CCee	dCe/dCE	< 0,01 %
ccEe	dcE/dce	0,9 %
CcEE	dcE/dCE	< 0,01 %
CcEe	dcE/dCe	0,02 %
	dCE/dce	< 0,01 %

Zdroj: *Masopust a Písačka, 2016*

*Frekvence výskytu je uváděna RhD pozitivních a RhD negativních jedinců dohromady

Legenda:

< Velmi nízký až vzácný výskyt

1.2.2.3. Protilátky Rh systému

Protilátky Rh systému patří ke klinicky významným protilátkám. Můžou způsobovat hemolytické potransfuzní reakce (HTR) nebo hemolytické onemocnění novorozence (HON). Vznikají imunizací po transfuzi krve, nebo během těhotenství imunizací Rh antigeny dítěte. Nejčastěji jsou třídy IgG, někdy také IgM, optimálně reagují při 37 °C v nepřímém antiglobulinovém testu (NAT), po přidání enzymu reakce zesilují (*Dean, 2005b*). Je znám také efekt dávky, kdy s homozygotními erytrocyty vykazují silnější reakce. Protilátky Rh systému až na výjimky neaktivují komplement (*Penka a spol., 2012*).

Vzácně se mohou vyskytovat jako přirozené nepravidelné protilátky, tedy bez prokazatelné imunizace (po transfuzi, těhotenství). Mezi ně patří protilátky anti-E a anti-D, které bývají třídy IgG a reagují optimálně při 20 °C. Dále protilátka anti-C nebo anti-C^w, které bývají třídy IgM a taktéž reagují při 20 °C. Tyto protilátky nezpůsobují HTR ani HON (*Masopust a Písačka, 2016*).

Přehled klinicky nejvýznamnějších protilátek Rh systému

- **Protilátka anti-D**

Protilátka anti-D je klinicky nejvýznamnější po AB0 inkompatibilitě. Často se vyskytuje v kombinaci s protilátkou anti-C.

- **Protilátka anti-C**

Bývá v kombinaci s dalšími Rh protilátkami (s anti-D, anti-e nebo anti-C^w) a obvykle způsobuje pozdní HTR a jen slabou hemolýzu.

- **Protilátka anti-E**

Často v kombinaci s anti-c.

- **Protilátka anti-e**

Nejčastější autoprottilátka, označována jako auto-anti-e, jako aloprottilátka se vyskytuje zřídka. Často se vyskytuje spolu s anti-Ce nebo anti-ce. Způsobuje pouze slabé HTR.

- **Protilátka anti-G**

Bývá v kombinaci s anti-D a/nebo anti-C. Obvykle se vyskytuje u fenotypu ccddee.

V případě nálezu během těhotenství jako samostatné protilátky anti-G nebo anti-C+G je třeba provést Rh profylaxi.

- **Protilátka anti-C^w**

V poslední době relativně častá, způsobuje pouze slabší HON a HTR na rozdíl od výše uvedených protilátek.

- **Protilátka anti-f (anti-ce)**

Velmi vzácně se vyskytuje samostatně, většinou v kombinaci s anti-c nebo anti-e. Způsobuje pozdní HTR a HON pouze v některých případech (*Masopust a Písačka, 2016*).

1.2.3. Kell systém

Kell systém se vyskytuje z krevních buněk pouze na erytrocytech. Patří mezi klinicky významné systémy, protože relativně často způsobuje závažné HTR a HON.

Za expresi antigenů Kell systému je zodpovědný gen KELL, který je umístěn na 7. chromozomu.

Základní alelické páry:

- KEL1 (K) a KEL2 (k)
- KEL3 (Kp^a) a KEL4 (Kp^b)
- KEL6 (Js^a) a KEL7 (Js^b)

První v pořadí je vždy antigen s nízkou a druhý vysokou frekvencí výskytu. Kp^c je třetí alelou k Kp^a/Kp^b, u ostatních nejsou známy alelické protějšky. (*Masopust a Písačka, 2016*)

1.2.3.1. Antigeny Kell systému

Kell systém obsahuje celkem 35 antigenů, z nichž mezi nejdůležitější patří antigen K (Kell), k (Cellano), Kp^a (Penny), Kp^b (Rautenberg), Ku, Js^a (Sutter), Js^b (Matthews). Po antigenu D patří mezi nejsilnější imunogeny.

Antigen K (Kell)

Antigen K, označovaný jako Kell nebo KEL1, jeho zastoupení v populaci je přibližně 9 % (*Penka a spol., 2012*).

Antigen k (Cellano)

Antigen k, označován jako Cellano nebo KEL2, patří mezi antigeny HFA, přítomnost antigenu je asi u 99,8 % populace (*Penka a spol., 2012*).

K₀ fenotyp

K₀ je označení pro vzácný nulový Kell fenotyp, jde o chybění celého Kell systému. Tito jedinci mohou tvořit protilátku anti-K_u, která reaguje se všemi erytrocyty kromě K₀ erytrocytů. Z hlediska podávání transfuzí je tedy nutné podávat pouze K₀ erytrocyty, což je z hlediska vzácnosti fenotypu obtížné (*Masopust a Písačka, 2016*).

Tabulka č. 7 – Přehled frekvence výskytu fenotypů Kell systému

Název		Fenotyp	Frekvence výskytu
KEL1	K	KK	9,0 %
KEL2		Kk	8,8 %
	k	kk	91,0 %
KEL3	Kp ^a	Kp(a+b-)	vzácně
KEL4		Kp(a+b+)	2,3 %
	Kp ^b	Kp(a-b+)	97,7 %
KEL5	K _u		> 99,9 %
KEL6	Js ^a	Js(a+b-)	0
KEL7		Js(a+b+)	vzácně
	Js ^b	Js(a-b+)	100%

Zdroj: *Masopust a Písačka, 2016*

1.2.3.2. Protilátky Kell systému

Protilátky proti antigenům v Kell systému patří ke klinicky významným. Jsou převážně třídy IgG, ale často viděny i jako IgM, neaktivují komplement. Optimálně reagují při 37 °C v NAT (nepřímém antiglobulinovém (Coombsově) testu), někdy jsou detekovatelné i v enzymových testech. Způsobují HTR a těžké HON. U HON nedochází k výrazné hyperbilirubinémii a anémii následkem hemolýzy (jako například u anti-D), ale dochází k potlačení erythropoézy v kostní dřeni, kde protilátky Kell systému destruuji erytroidní progenitory (*Penka a spol., 2012*).

Přehled klinicky nejvýznamnějších protilátek Kell systému

- **Protilátka anti-K**

Nejčastější protilátka po protilátkách v Rh systému. Bývá třídy IgM, dále IgG, kdy mohou přetrvávat současně. Způsobuje akutní i pozdní HTR a těžké HON.

- **Protilátka anti-k**

Vyskytuje se vzácně z důvodu vysoké frekvence výskytu antigenu k. V případě protilátky anti-k je obtížné najít kompatibilní erythrocyty, v populaci je přibližně pouze 0,2 % jedinců s fenotypem KK (*Masopust a Písačka, 2016*).

Protilátky anti-Kp^a, anti-Kp^b, anti-Js^a, anti-Js^b a anti-K_u jsou velmi vzácné, přesto nejsou zanedbatelné z hlediska jejich klinické významnosti (*Masopust a Písačka, 2016*).

1.2.4. Lewis systém

Lewis systém se vyskytuje téměř na všech krevních buňkách (není přítomen na granulocytech a monocytech), ve tkáních a tělních tekutinách. Do tohoto systému patří 6 antigenů, z nichž nejvýznamnější je Le^a a Le^b. Jejich exprese je ovlivněna Lewis geny FUT3 a FUT2. Označení antigenů Le^a a Le^b je matoucí. Antigeny nejsou alelické. Existuje pouze jeden gen Lewis (LE) a ten je zodpovědný za vznik antigenu Le^a ale pouze za předpokladu nepřítomnosti sekretorského genu Se, tedy když jedinec je se/se. Vzniká fenotyp Le(a+b-). V případě přítomnosti sekretorského genu Se (Se/Se, Se/se) dojde ke změně antigenu Le^a na antigen Le^b a jedinec má fenotyp Le(a-b+). Fenotypy Le(a+b+) a Le(a-b-) jsou vzácné. Fenotyp Le(a-b-) se vyskytuje v případě přítomnosti inaktivních alel genu (le/le). Na erythrocytech novorozence nejsou antigeny Lewis systému přítomny. Adsorbují se na povrch erythrocytů během jednoho roku života. Z tohoto důvodu nemá tento systém na graviditu žádný význam (Masopust a Písačka, 2016).

Tabulka č. 8 – Frekvence fenotypů systému Lewis

Fenotyp	Frekvence výskytu
Le(a+b-)	19-22 %
Le(a-b+)	70-72 %
Le(a-b-)	4-11 %
Le(a+b+)	raritní

Zdroj: Masopust a Písačka, 2016

1.2.4.1. Protilátky Lewis systému

Protilátky systému Lewis obvykle nepůsobí klinicky závažné problémy, ojediněle lehké HTR. V souvislosti s HON nejsou nebezpečné, protože jsou většinou třídy IgM (neprostupují placentou) a antigeny Le se adsorbují na erythrocyty dítěte až po jeho narození, novorozenci mají tedy obvykle fenotyp Le(a-b-) (Masopust a Písačka, 2016).

Imunní nepravidelné protilátky vznikají po transfuzích, bývají třídy IgM, někdy IgG. Mohou reagovat i při 37 °C v NAT, v tomto případě mohou být potenciálně nebezpečné. Poměrně často se vyskytují jako přirozené nepravidelné protilátky, a to především u jedinců s fenotypem Le(a-b-). Bývají chladového charakteru, třídy IgM, výjimečně třídy IgG nebo IgA (Masopust a Písačka, 2016).

Přehled protilátek Lewis systému

- **Protilátka anti-Le^a**

Vyskytuje se poměrně často, a tou jedinců s fenotypem Le(a-b-), často bývá v kombinaci se slabou anti-Le^b, může vázat komplement.

- **Protilátka anti-Le^b**

Vyskytuje se vzácně, bez závažných klinických projevů (*Masopust a Písačka, 2016*).

1.2.5. Kidd systém

Kidd systém se vyskytuje na erythrocytech a na endoteliálních buňkách. Gen zodpovědný za tvorbu antigenů se nazývá SLC14A1 (JK) a je lokalizován na 18. chromozomu. Systém obsahuje 3 antigeny, mezi nejdůležitější patří antigen Jk^a a Jk^b. Fenotyp Jk(a-b-) je výsledkem nefunkčního genu (*Masopust a Písačka, 2016*).

Tabulka č. 9 – Frekvence fenotypů systému Kidd

Fenotyp	Frekvence výskytu
Jk(a+b-)	26-30 %
Jk(a-b+)	23-26 %
Jk(a+b+)	49-50 %

Zdroj: *Masopust a Písačka, 2016*

1.2.5.1. Protilátky Kidd systému

Protilátky Kidd systému se nevyskytují příliš často. Nacházejí se pouze jako nepravidelné imunní protilátky, většinou třídy IgG, někdy ve směsi s IgM. Patří mezi protilátky, které až u 50 % případů aktivují komplement a způsobují pozdní HTR s těžkým průběhem. HON bývá málo častý a s mírnými klinickými projevy. Protilátky mohou být obtížně detekovatelné a vykazují výrazný efekt dávky, někdy reagují pouze s homozygotními erythrocyty. Reagují při 37 °C v NAT a v enzymových testech reakce zesilují. Po inkompatibilní transfuzi dosahují relativně vysokých hladin. Velmi vzácně se mohou vyskytovat jako autoprottilátky a způsobovat těžké AIHA (*Penka a spol., 2012; Masopust a Písačka, 2016*).

1.2.6. Duffy systém

Duffy systém se vyskytuje na erythrocytech, na endoteliálních buňkách a dalších buňkách tkání. Do systému patří celkem 5 antigenů, jejichž tvorba je podmíněná genem DARC lokalizovaným na 1. chromozomu. Nejdůležitějšími antigeny jsou Fy^a a Fy^b , slabá forma antigenu Fy^b se označuje jako Fy^x (Masopust a Písačka, 2016). Fy_{null} je označení pro fenotyp $Fy(a-b-)$, který vzniká mutací genu a tím zabraňuje expresi antigenů. V malarických oblastech je tento fenotyp rozšířený a funguje jako přirozený obranný mechanismus, který chrání erythrocyty před malárií (Penka a spol., 2012; Masopust a Písačka, 2016).

Tabulka č. 10 – Frekvence fenotypů systému Duffy

Fenotyp	Frekvence výskytu
$Fy(a+b-)$	20-21 %
$Fy(a-b+)$	32-34 %
$Fy(a+b+)$	40-48 %

Zdroj: Masopust a Písačka, 2016

1.2.6.1. Protilátky Duffy systému

Protilátky Duffy systému jsou méně časté a většinou se vyskytují v kombinaci s dalšími erythrocytovými protilátkami. Mohou způsobovat akutní a pozdní HTR. Klinicky významné jsou protilátky třídy IgG, reagující při 37 °C v NAT, uplatňuje se efekt dávky a může vázat komplement. Nereagují v enzymových testech, protože jsou enzymem destruovány. Velmi vzácně se mohou vyskytovat i jako autoprottilátky (Masopust a Písačka, 2016).

Přehled protilátek Duffy systému

- **Protilátka anti- Fy^a**

Může způsobovat i těžké HON.

Vzácně se může vyskytovat jako přirozená nepravidelná protilátka třídy IgM, reagující při 20°C, bez klinického významu.

- **Protilátka anti- Fy^b**

Méně častá a mnohem slabší než anti- Fy^a , HTR a HON s mírnými projevy (Masopust a Písačka, 2016).

1.2.7. MNS systém

MNS systém se vyskytuje pouze na erytrocytech a dále na renálních endoteliálních buňkách a je druhým nejpolymorfnějším systémem. Za tvorbu antigenů jsou zodpovědné tři geny GYPA, GYPB a GYPE, které jsou lokalizovány na 4. chromozomu. Tento systém obsahuje celkem 48 antigenů, z nichž nejdůležitější jsou M, N, S, s a U. Antigen U patří mezi HFA antigeny a je přítomen u 99% populace. Pokud antigen U není přítomen je vždy doprovázen fenotypem S-s-. (Masopust a Písačka, 2016)

Tabulka č. 11 – Frekvence fenotypů MNS systému

Fenotyp	Genotyp	Frekvence výskytu
M+N-	MM	28-30 %
M-N+	NN	22 %
M+N+	MN	50 %
S+s-	SS	11 %
S-s+	ss	45 %
S+s+	Ss	44 %

Zdroj: Masopust a Písačka, 2016

1.2.7.1. Protilátky MNS systému

Protilátky systému MNS nepatří mezi nejnebezpečnější, přesto však nejsou opomenutelné. HON je málo častý, většinou s mírnými projevy, pouze anti-M výjimečně způsobuje těžký průběh (Řeháček a spol., 2013).

Mohou se vyskytovat jako přirozené nepravidelné protilátky. Bývají třídy IgM, optimálně reagují při 4 až 20 °C a je zde výrazný efekt dávky. Jejich přítomnost je bez klinických projevů. Nepravidelné imunní protilátky jsou méně obvyklé, třídy IgG a optimálně reagují pod 20 °C. V případě, že reagují při 37 °C v NAT, mohou způsobovat i závažné klinické problémy. Neváží komplement a taktéž je zde často viděn efekt dávky. Nereagují v enzymových testech (Masopust a Písačka, 2016).

Přehled klinicky významných protilátek MNS systému

- **Protilátka anti-M**

Jako přirozená nepravidelná protilátka je relativně častá, je třídy IgM, může reagovat i při 37 °C v NAT. Jako nepravidelná imunní protilátka se vyskytuje vzácně, pak se jedná o třídu IgG, vyskytuje se převážně u dětí, někdy reaguje při 37 °C v NAT, způsobuje pozdní lehké HTR.

- **Protilátka anti-N**

Vzácná, spíše jako přirozená nepravidelná, třídy IgM.

- **Protilátka anti-S**

Imunní nepravidelná protilátka je IgG a obvykle reagující při 37 °C v NAT. Může způsobovat i těžké HON a závažné až fatální HTR. Vzácně se vyskytuje jako přirozená nepravidelná.

- **Protilátka anti-s**

Velmi vzácná, obvykle reagující při 37 °C v NAT a může způsobovat těžké HON a pozdní HTR (*Masopust a Písačka, 2016*).

1.2.8. Lutheran systém

Lutheran systém se vyskytuje na erythrocytech, buňkách placenty, kůži, ledvin a dalších. Celkem se v systému nachází 22 antigenů a nejdůležitějšími z nich jsou antigeny Lu^a a Lu^b, které jsou exprimovány pomocí genu LU lokalizovaném na 19. chromozomu. Antigen Lu^b HFA antigeny, je přítomen přibližně u 99 % populace (*Masopust a Písačka, 2016*). Nulový fenotyp Lu_{null} je označení pro Lu(a-b-), kdy nejsou exprimovány žádné antigeny Lu a je to způsobeno inaktivním genem LU nebo přítomností inhibičního genu, který brání syntéze antigenů (*Penka a spol., 2012*).

Tabulka č. 12 – Frekvence fenotypů systému Lutheran

Fenotyp	Frekvence výskytu
Lu(a+b-)	0,2 %
Lu(a-b+)	92-93 %
Lu(a+b+)	7-8 %

Zdroj: *Masopust a Písačka, 2016*

1.2.8.1. Protilátky Lutheran systému

Protilátky Lutheran systému způsobují pouze mírné a pozdní HTR. Z hlediska HON nejsou příliš nebezpečné, protože antigeny Lu nejsou na fetálních erythrocytech dostatečně vyvinuty a jejich exprese je slabá, síla antigenů věkem roste. Dalším faktem je, že Lu antigeny jsou přítomny v placentě a případné protilátky jsou na ni adsorbovány a neprochází skrze placentu do oběhu plodu (*Masopust a Písačka, 2016*).

Mohou se velmi vzácně vyskytovat jako přirozené nepravidelné protilátky, pak jsou třídy IgM a obvykle reagují při 20 °C. Jako imunní nepravidelné mohou být třídy IgM, IgG, ale také s příměsí IgA. Optimální reagují při 37 °C v NAT a je zde uplatňován efekt dávky (*Masopust a Písačka, 2016*).

Přehled klinicky významných protilátek Lutheran systému

- **Protilátka anti-Lu^a**

Obvykle bez klinického významu, HTR pouze pozdní a lehké, způsobuje spíše jen zkrácené přežívání erythrocytů.

- **Protilátka anti-Lu^b**

Taktéž bez klinického významu, případně pouze pozdní lehké HTR. Podání transfuzí bez daného antigenu je značně komplikované vzhledem k vysoké frekvenci výskytu antigenu Lu^b (*Masopust a Písačka, 2016*).

1.2.9. P1PK systém

Do tohoto systému patří 3 antigeny, antigen P1, P^k a NOR. Syntéza antigenů je podmíněna genem A4GALT, který se nachází na 22. chromozomu. Tento systém je příbuzný se systémem Globosid. Antigen P1 se vyskytuje z krevních buněk pouze na erythrocytech a jeho síla se v populaci značně liší. P1 antigen významně slábne a po určité době skladování se mohou erythrocytové transfuzní přípravky jevit jako falešně P1 negativní. Antigen P^k je kromě erythrocytů také na lymfocytech, trombocytech a dalších tkáních orgánů nebo maligních buňkách. Je přítomen pouze pokud není přítomen antigen P (patřící do systému Globosid) a pravidelně je přítomna protilátka anti-P. Nulový fenotyp p je označení pro fenotyp P1-P-P^k-, který vzniká mutací sekvence kódující protein A4GALT1 a tím pádem se netvoří antigen P1 ani antigeny systému Globosid. Z hlediska laboratorní praxe,

a omezené dostupnosti diagnostického séra anti-P^k, se jedinci dělí na P1 pozitivní a P1 negativní (*Masopust a Písačka, 2016*).

Tabulka č. 13 – Frekvence antigenu P1 a možných fenotypů systému P1PK

Antigen	Genotyp		Frekvence výskytu
P1 pozitivní	P ₁	(P1+P+)	75-80 %
	P ₁ ^k	(P1+P- P ^k +))	vzácný
P1 negativní	P ₂	(P1-P+)	20-25 %
	P ₁ ^k	(P1-P-P ^k +))	vzácný
	p	(P1-P-P ^k -)	velmi vzácný

Zdroj: *Masopust a Písačka, 2016*

1.2.9.1. Protilátky P1PK systému

Protilátky tohoto systému jsou většinou chladového charakteru třídy IgM, optimálně reagující při 4 °C a nebývají klinicky významné. Obvykle se vyskytují jako přirozené nepravidelné protilátky, imunní protilátky jsou vzácné (*Masopust a Písačka, 2016*).

Přehled protilátek P1PK systému

- **Protilátka anti-P1**

Většinou bez klinického významu, normální přežívání erytrocytů i po podání P1 pozitivních erytrocytů, protože protilátka reaguje při nižších teplotách. Významné pouze pokud reagují v NAT při 37 °C (*Řeháček a spol., 2013*).

- **Protilátka anti-P**

Vyskytuje se jako přirozená nepravidelná protilátka u všech P^k pozitivních. Může se vyskytovat jako bifázická autoprotilátka (*Masopust a Písačka, 2016*).

- **Protilátka anti-PP1P^k**

Klinicky nejvýznamnější protilátka z P1PK systému. Nachází se pouze u jedinců s fenotypem p. Způsobuje akutní HTR a HON, může být také příčinou časných potratů (*Řeháček a spol., 2013*).

1.2.10. Diego systém

Mezi hlavní antigeny patří antigeny Diego (Di^a a Di^b) a Wright (Wr^a a Wr^b). Antigeny Di^b a Wr^b patří mezi HFA antigeny. Antigeny tohoto systému jsou obecně málo imunogenní. Imunní nepravidelné protilátky mají klinický význam a mají potenciál způsobovat HTR či HON (*Penka a spol., 2012*). Nejčastější je protilátka anti- Wr^a , která bývá často pod-diagnostikována z důvodu absence Wr^a pozitivních erytrocytů ve screeningových, eventuálně panelových, diagnostických erytrocytech (*Řeháček a spol., 2013*).

1.2.11. Chido/Rodgers systém

Antigeny jsou adsorbovány na erytrocyty z plazmy podobně jako u Lewis systému. Jedná se o nepravé antigeny navázané na C4 složku komplementu. Protilátky nejsou klinicky významné a většinou nezpůsobují HTR. U výskytu protilátek anti-Chido/Rodgers není možné podávat plazmy, po podání dochází až k anafylaktickým reakcím, trombocyty se mohou podávat pouze v náhradním roztoku (bez obsahu plazmy) (*Penka, 2012*).

1.3. Imunohematologická sérologická vyšetření

Sérologická imunohematologická vyšetření jsou rutinně využívána vzhledem k jejich robustnosti, rychlosti a jednoduchosti provedení. Lze jimi detekovat antigeny na erythrocytech i antierythrocytové protilátky, ale jejich použití je v určitých případech omezeno (např. u polytransfundovaných pacientů, při vyšetřování slabých či variantních forem antigenů).

Základem těchto vyšetření je hemaglutinační reakce (aglutinace). Principem aglutinace je vazba mezi specifickou protilátkou a antigenem na povrchu erythrocytu. Dochází k navázání antigenu jednoho erythrocytu na jeden Fab konec molekuly Ig a navázání antigenu jiného erythrocytu na druhý Fab konec molekuly Ig. Aby došlo k aglutinaci, je nutné, aby docházelo ke vzájemným vazbám mezi Fab konci Ig a antigeny erythrocytů a to tak, že se překlene prostor mezi ostatními erythrocyty (*Řeháček a spol., 2013*).

Dalšími metodami k vyšetřování erythrocytových antigenů jsou molekulárně genetické metody, ELISA metody či průtoková cytometrie.

1.3.1. Principy vyšetření

1.3.1.1. Přímá aglutinace (Solný test)

U přímé aglutinace dokážou protilátky překlenout prostor mezi erythrocyty a svými konci spojí antigeny okolních erythrocytů a tím dojde k aglutinaci. Test je vhodný pro detekci protilátek třídy IgM, zejména chladových protilátek, optimálně reagujících při 4 °C a 20 °C (*Řeháček a spol., 2013*).

1.3.1.2. Nepřímá aglutinace (Antiglobulinové (Coombsovy) testy)

U nepřímé aglutinace protilátky nedokážou překlenout prostor mezi sousedními erythrocyty a erythrocyty pouze senzibilizují, patří sem hlavně protilátky třídy IgG. K prokázání protilátek je nutné přidat polyspecifické antiglobulinové sérum proti lidské bílkovině (AGH sérum) obsahující další protilátku, která dokáže přemostit prostor mezi senzibilizovanými erythrocyty a tím dojde k aglutinaci. Nepřímá aglutinace se využívá u antiglobulinových testů (*Řeháček a spol., 2013*).

Přímý antiglobulinový test (PAT)

Slouží k průkazu senzibilizovaných erytrocytů pacienta protilátkou *in vivo*. Používá se k odhalení autoimunitních patologických procesů. PAT pozitivita může být přítomna po transfuzích, transplantacích, u potransfuzních reakcí, HON a při průkazu AIHA (*Zima a spol., 2013*).

Nepřímý antiglobulinový test (NAT)

Slouží k průkazu protilátek, které se nachází volně v séru/plazmě pacienta. Můžeme je prokázat až po přidání AGH séra po inkubaci vyšetřovaného séra/plazmy pacienta a erytrocytů příjemce. Používá se k detekci klinicky významných protilátek při 37 °C, při screeningu a identifikaci nepravidelných antierytrocytových protilátek, testu kompatibility, titraci protilátek nebo při vyšetření některých antigenů krevně skupinových systémů (*Zima a spol., 2013; Řeháček a spol., 2013*).

1.3.1.3. Enzymový test

Je vhodný jako doplňkové vyšetření a slouží k průkazu protilátek, které se nachází volně v séru/plazmě pacienta. Reakce některých protilátek v prostředí enzymu zesiluje na rozdíl od vyšetření NAT (např. protilátky v Rh, Lewis systému atd.). Enzym způsobí narušení povrchu membrány erytrocytu a tím může zesílit vazbu protilátky na antigen v membráně erytrocytu. Mezi nejpoužívanější enzymy patří papain, bromelin nebo ficin (*Řeháček a spol., 2013*).

1.3.2. Metody vyšetření

1.3.2.1. Sklíčkový test

Sklíčkový test slouží jako kontrolní nebo orientační vyšetření z plné krve. Provádí se na sklíčku, sklokeramické či umělohmotné destičce a je vhodný pouze pro vyšetření antigenů a pouze pro přímou aglutinaci. Hlavní výhodou je rychlost a jednoduchost provedení (*Masopust a Písačka, 2016*).

1.3.2.2. Zkumavkový test

Zkumavkový test je starší metoda, avšak stále používaná.

Zkumavkový test lze využít při vyšetření aglutinogenů a aglutininů krevní skupiny AB0, vyšetření antigenu RhD, typování vzácných erytrocytových antigenů, titraci protilátek a v některých případech i k vyšetření protilátek v séru/plazmě pacienta a zkoušky kompatibility před podáním transfuze krve. Předtransfuzní vyšetření, zejména detekce a identifikace protilátek a zkouška kompatibility se provádí citlivějšími metodami, například sloupcovou aglutinací. V případě výskytu falešně pozitivních reakcí v gelovém prostředí je však nutné provést testování zkumavkovými testy. S falešně pozitivními reakcemi se můžeme setkat u pacientů se sepsí, v případě silně chylózních krevních vzorků, v souvislosti s některými léky a v jiných vzácných případech.

Zkumavkové testy se používají k detekci protilátek třídy IgM metodou přímé aglutinace anebo protilátek IgG metodou NAT (zejména při typování antigenů na erytrocytech velmi vzácnými diagnostiky povahy IgG). Při testování je potřeba vždy zařadit kontroly, které nám potvrzují správný výsledek (např. AB0 + Rh kontrolu u vyšetření krevní skupiny, pozitivní a negativní kontrolu pro daný antigen při vyšetřování antigenů). Pokud je u metody NAT výsledek testu negativní (tzn. k aglutinaci nedochází, znamená to, že se protilátka na erytrocyty nenavázala, po promytí se veškeré bílkoviny odstranily a přidané AGH se nemělo na co navázat a zůstalo volné), je potřeba ověřit validitu výsledku testu a provést kontrolu účinnosti AGH přidáním kontrolních erytrocytů senzibilizovaných IgG, přičemž výsledek testu musí být pozitivní (*Rýznarová, 2023*).

Hlavní výhodou zkumavkových testů je jednoduchost provedení a nízká cena. Mezi nevýhody patří nižší citlivost, chyby při provedení NAT (nedokonalé promytí, opomenutí přidání AGH, neprovedení kontroly negativního výsledku přidáním IgG senzibilizovaných kontrolních erytrocytů), které prodlužují čas vyšetření (*Rýznarová, 2023*).

1.3.2.3. Aglutinace na mikrotitračních deskách

Agglutinace je prováděna na umělohmotné desce o 96 jamkách ve tvaru „U“. Hlavními výhodami jsou malé objemy vzorků i diagnostik, možnost automatizace a vyšetření v sériích. Hlavní nevýhodou je citlivost, metoda není vhodná pro detekci nepravidelných erytrocytových protilátek (*Masopust a Písačka, 2016*).

1.3.2.4. Sloupcová aglutinace

Sloupcová aglutinace patří mezi nejpoužívanější techniky v imunohematologii. Jedná se o gelovou techniku využívající principu aglutinace a chromatografie. Vyšetření probíhá v mikrozkumavkách plněných gelem. Samotné erythrocyty gel propustí na dno jamky, aglutinované erythrocyty se zachytí v gelu. Gel může obsahovat AGH sérum pro metody nepřímé aglutinace, specifickou protilátku pro určení různých antigenů nebo může být neutrální. Neutrální gel slouží pouze jako síto k zachycení přímé aglutinace nebo ho lze využít u enzymového testu. Hlavní výhodou sloupcové aglutinace je citlivost, rychlost provedení, malé objemy vzorků a eliminace promývací fáze při testování NAT, dále možnost automatizace a vyšetření v sériích. Hlavní nevýhodou je vyšší cena a potřeba speciální přístrojové techniky (*Masopust a Písačka, 2016*).

1.3.2.5. Systém pevné fáze

Se sloupcovou aglutinací patří mezi nejpoužívanější techniky. Testy na pevné fázi se vyšetřují ve stripech. Citlivost metody pevné fáze je srovnatelná se sloupcovou aglutinací. Dna jamek jsou pokryta protilátkami nebo navázanými membránami erythrocytů, na kterých jsou přítomny potřebné antigeny. Jako indikátor reakce slouží fluorescein, enzym nebo indikátorové erythrocyty. Hlavní výhodou je citlivost, mále objemy vzorků a metody nepřímé aglutinace jsou srovnatelné s technikou sloupcové aglutinace. Nevýhodou je horší interpretace slabších reakcí, vyšší výskyt nespecifických reakcí a omezené možnosti testování (není možné využít enzymový test nebo titraci protilátek) (*Masopust a Písačka, 2016*).

1.4. Předtransfuzní vyšetření

Každá transfuze, i kompatibilní, může být potenciálně riziková. Je tedy důležité transfuze správně indikovat, podat ve správný čas a ve správném množství.

Předtransfuzní vyšetření je prováděno pouze u erytrocytových transfuzních přípravků, u podání plazem či trombocytových transfuzních přípravků se toto vyšetření neprovádí.

Cílem vyšetření je zajistit dostatečně dlouhé přežívání dárcovských erytrocytů v oběhu pacienta a zamezit nežádoucím účinkům transfuze, mezi které patří potransfuzní reakce či imunizace pacienta (*Řeháček a spol., 2013*).

Předtransfuzní vyšetření se skládá z vyšetření krevní skupiny pacienta, screeningu nepravidelných protilátek proti erytrocytům v séru/plazmě pacienta a testu kompatibility s vhodně zvolenými erytrocytovým TP. Vyšetření krevní skupiny a screeningu nepravidelných protilátek u TP je prováděno v rámci imunohematologického vyšetření dárce (*Řeháček a spol., 2016*).

1.4.1. Vyšetření krevní skupiny

Vyšetření krevní skupiny (KS) patří mezi základní a nejdůležitější testy v rámci předtransfuzního vyšetření. Jedná se o určení antigenů a aglutininů v AB0 systému a D antigenu v Rh systému. K vyšetření se používají metody přímé aglutinace. Je možné použít zkumavkový test, mikrotitrační destičky nebo sloupcovou aglutinaci (nejpoužívanější). K ověření již známé KS lze použít orientační sklíčkový test.

Vyšetření antigenů se provádí pomocí certifikovaných diagnostik. Je nutné použít minimálně diagnostika s protilátkami anti-A a anti-B, může být doplněno o anti-AB. Vyšetření je doprovázeno vyšetřením aglutininů, které se vyšetřují pomocí diagnostických erytrocytů, kde je nutné použít minimálně erytrocyty A₁ a B, případně je vyšetření doplněno o erytrocyty A₂ a 0, kdy erytrocyty KS 0 fungují jako kontrolní a mohou upozornit na přítomnost jiných protilátek než anti-A a anti-B. U novorozenců se do 4 měsíců věku vyšetřují pouze antigeny, aglutininy nikoli, protože ještě nejsou dostatečně vyvinuty (*Řeháček a spol., 2013*)

Tabulka č. 14 – Vyšetření aglutinogenů na erythrocytech pomocí diagnostických protilátek a vyšetření aglutininů v séru/plazmě pomocí diagnostických erythrocytů

KS	diagnostické antisérum			diagnostické erythrocyty				protilátka pravidelná	protilátka nepravidelná
	-A	-B	-AB	A ₁	A ₂	B	0		
0	-	-	-	+	+	+	-	anti-A,B	-
A ₁	+	-	+	-	+	+	+	anti-B	anti-H (0)
A ₂	+	-	+	+	-	+	-	anti-B	anti-A ₁
B	-	+	+	+	+	-	-	anti-A	-
A ₁ B	+	+	+	-	+	-	+	žádná	anti-H (0)
A ₂ B	+	+	+	+	-	-	-	žádná	anti-A ₁

Zdroj: Rýznarová, 2022

Vyšetření D antigenu se provádí dvěma monoklonálními IgM diagnostiky různých klonů, která u příjemců transfuzí nebo těhotných nedetekují variantu D^{VI}, aby nedošlo k podání RhD pozitivních erythrocytů pacientovi s RhD variantou a následné imunizaci. K vyšetření AB0 a Rh systému je vhodné zařazovat kontrolní diagnostikum, jeho negativní výsledek nám potvrzuje validitu vyšetření (Řeháček a spol., 2013).

1.4.2. Screening nepravidelných antierythrocytových protilátek

Tímto testem se snažíme zachytit přítomnost nepravidelných antierythrocytových protilátek v séru či plazmě pacienta. Používají se tři typy (ev. čtyři) diagnostických erythrocytů, které mají určité zastoupení antigenů (některé z antigenů v homozygotní formě). Dále musí být zařazeny určité fenotypy, aby bylo možné rozlišit případnou kombinaci protilátek. Provádí se metodou LISS-NAT a může být doplněn enzymovým testem. Nejčastěji používanou technikou je sloupcová aglutinace nebo systém pevné fáze (Penka a spol., 2012; Řeháček a spol., 2013).

V případě pozitivního výsledku je žádoucí pokračovat ve vyšetření a protilátku identifikovat.

1.4.3. Test kompatibility

Test kompatibility spočívá ve „křížení“ dárce a příjemce, zjišťuje se tak kompatibility daného TP s příjemcem transfuze. Tímto testem lze zachytit případný výskyt anti-LFA protilátek (protilátek proti antigenům s nízkou frekvencí výskytu – screeningové erythrocyty poskytují negativní reakci, zkouška kompatibility je pozitivní, dárce má na erythrocytech velmi vzácný antigen). V reakci se inkubují erythrocyty dárce se sérem/plazmou pacienta metodou NAT. Nejčastěji používanou technikou je sloupcová aglutinace nebo pevná fáze, jejichž citlivost je srovnatelná, zkumavkový test se již nepoužívá (pouze ve výjimečných případech). Dále je v některých případech vhodné doplnit enzymový test (polytransfundovaní pacienti, pacienti s prokázanou protilátkou reagující v enzymu atd.) (*Penka a spol., 2012; Rýznarová, 2023*).

1.4.3.1. Elektronický test kompatibility

Elektronický test kompatibility spočívá v tom, že výběr TP provádí počítač na základě negativního screeningu protilátek a AB0 kompatibility TP a příjemce transfuze. U pacienta musí být k dispozici záznamy o dřívějších vyšetřeních a aktuální vyšetření se s nimi musí shodovat. Podmínkou použití elektronického testu kompatibility je validovaný laboratorní informační systém, který vše kontroluje a při rozporu neumožní vydání TP (*Masopust a spol., 2016*).

1.4.4. Identifikace protilátek

Identifikace protilátek se provádí na základě pozitivního screeningového vyšetření protilátek nebo pozitivního testu kompatibility. Ne vždy musí být pozitivní výsledek obou testů. Pozitivní screening protilátek a negativní test kompatibility může znamenat přítomnost protilátek proti antigenu, který není přítomen na erythrocytech TP (*Masopust a spol., 2016*). Negativní screening protilátek a pozitivní test kompatibility může znamenat, že na diagnostických erythrocytech není zastoupen antigen, proti kterému je protilátka namířena, ale křížený TP daný antigen má. Dále může pozitivitu testu kompatibility způsobit PAT pozitivita TP. Každý pozitivní výsledek je nutno objasnit.

U identifikace protilátek je technika provedení i postup vyšetření stejný jako u screeningu protilátek, rozdíl je v použití deseti a více diagnostických panelových erytrocytů a je doporučeno zařadit autokontrolu (sérum/plazma pacienta s vlastními erytrocyty). Panelové erytrocyty mají určité kombinace fenotypů, díky kterým snáze rozlišíme nejčastěji se vyskytující protilátky, případně kombinaci dvou a více protilátek. Identifikace může být doplněna enzymovým testem, který může pomoci v rozlišení např. směsi protilátek (*Řeháček a spol., 2013*).

Specificita protilátky nebo kombinace protilátek je potvrzena na základně minimálně dvou pozitivních reakcí s diagnostickými erytrocyty nesoucí daný antigen a minimálně třech negativních reakcích s erytrocyty negativní pro daný antigen (*Masopust a Písačka, 2016*).

V indikovaných případech je vhodné provádět identifikaci protilátek při laboratorní teplotě 20 °C nebo při 4°C.

1.4.5. Časový požadavek na přípravu transfuze

1.4.5.1. Vitální indikace

Při život ohrožujícím stavu pacienta se vydávají TP bez provedení předtransfuzního vyšetření. Vzorek k vyšetření je nutné nabrat před podáním transfuze a vyšetření je provedeno dodatečně (co nejdříve). Nelze vyloučit vznik akutní potransfuzní hemolytické reakce, protože pacient může mít protilátku, která je zjištěna až při dodatečném předtransfuzním vyšetření (*Masopust a spol., 2022a*).

V případě neznámé KS se vydávají univerzální TP:

- Erytrocyty – krevní skupina 0 RhD negativní, K negativní
- Plazma – krevní skupina AB (bez ohledu na RhD kompatibilitu)
- Trombocyty – bez ohledu na krevní skupinu včetně RhD, přednostně resuspendované v náhradním roztoku

V případě známé KS a ověřených záznamů v laboratorním systému se provede ověření KS příjemce a přednostně se podávají stejnoskupinové TP (*Indrák, 2014; Masopust a spol., 2022*).

1.4.5.2. Statim

Statimová vyšetření jsou prováděna přednostně a TP jsou připraveny co nejdříve po provedení kompletního předtransfuzního vyšetření. Vydání plazmy je většinou možné do 30 min (po rozmražení). V případě trombocytů, pokud jsou k dispozici, je možné vydání ihned. Erytrocytové přípravky jsou k dispozici až po provedení předtransfuzního vyšetření a to do 60-90 min, čas se liší v závislosti na požadovaných vyšetřeních. V případě komplikací při vyšetření (např. nález nepravidelných protilátek či auto protilátek), kdy není možné dodržet uvedený čas, je nutná individuální domluva s ošetřujícím lékařem pacienta. Lékař zhodnotí klinickou situaci a rozhodne o postupu. Pokud lze, podání TP se odloží, než budou dokončena všechna potřebná vyšetření, pokud je podání nutné vyber se nejméně rizikový TP (*Masopust a spol., 2022*).

1.4.5.3. Rutina

Neurgentní požadavek, většinou plánované transfuze na určitý den a čas, který je uveden na žádance. Předtransfuzní vyšetření jsou prováděna obvykle v sérii (*Indrák, 2014*).

1.5. Molekulárně genetická vyšetření

Molekulárně genetická vyšetření (DNA metody) jsou prováděna na specializovaných pracovištích. Principem je analýza DNA, která se nejčastěji izoluje ze vzorku krve. Tyto metody jsou finančně náročnější a jejich použití je omezeno na vybrané imunohematologické indikace. Mezi nevýhody patří vysoká vstupní investice přístrojového vybavení (*Masopust a spol., 2016*).

DNA metody:

- Polymerázová řetězová reakce (např. PCR SSP, kvantitativní real-time PCR),
- Microarray metody,
- a další metody.

K detekci pozitivních reakcí (získaných amplikonů DNA po proběhlé PCR) se používá gelová elektroforéza v agarózovém gelu nebo specifické sondy (FRET, hydrolyzační sondy) (*Masopust a spol., 2016*).

Mezi možné indikace genotypování krevních skupin patří:

- zjištění diskrepantních nálezů při sérologických vyšetření,
- stanovení genotypu dárců krve a pacientů (polytransfundovaných, k odlišení dárcovských erytrocytů od erytrocytů pacienta),
- určení slabých či variantních antigenů (diagnostika Rh systému),
- stanovení genotypu plodu z fetální DNA v plazmě těhotné,
- u pacientů léčených monoklonálními protilátkami nebo u pacientů s autoimunitním onemocněním, která komplikují sérologická vyšetření (*Masopust a spol., 2016*).

1.5.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR metoda vyvinutá Kary Mullisem v 80. letech minulého století je založena na použití enzymu DNA polymerázy, která je schopna syntetizovat nové vlákno DNA komplementární k původnímu templátovému vláknu. Tento enzym umí přidat nukleotid pouze na již existující 3'-OH skupinu, a proto je pro zahájení syntézy DNA potřeba do reakce přidat primery, které se k řetězci DNA připojují ve specifickém místě. Primery určují sekvenci DNA,

která má být replikována. Výsledkem PCR reakce je amplifikace konkrétní sekvence DNA (*Valones a spol, 2009*).

Princip PCR reakce je založen na opakování několika cyklů:

- **Denaturace, teplota 95 °C**

Zahřátím DNA se rozpojí vodíkové můstky mezi vlákny DNA a dvouvláknová DNA (dsDNA) je rozdělena na jednovláknovou DNA (ssDNA).

- **Annealing (hybridizace), teplota 50-60 °C**

Molekuly ssDNA po ochlazení opět renaturují, ve směsi jsou v nadbytku specifické oligonukleotidy, které hybridizují se svou komplementární sekvencí rychleji než dlouhé jednořetězcové molekuly, jejichž koncentrace je mnohem nižší.

Teplota při hybridizaci je pro výsledek PCR kritická, dále musí být vhodně nastavena pro použitý pár primerů.

- **Elongace, teplota 65-75 °C**

Oligonukleotidy, které dosedly na ssDNA (templát) při hybridizaci slouží jako primery pro DNA polymerázu. Od jejich 3'-konce začíná syntéza nového řetězce, který je komplementární s templátem (*Šmarda, 2005*).

Po několika cyklech narůstá produkt v exponenciálním množství (*Šmarda, 2005*).

1.5.2. Microarray metody

Pomocí těchto metod je možné provádět analýzu velkého počtu polymorfismů během jedné reakce. Používají se k vyšetření antigenů, které nelze vyšetřit sérologickými metodami (např. antigeny v systému Dombrock) nebo u polytransfundovaných pacientů, kdy sérologická vyšetření komplikují již podané TP. Mezi hlavní nevýhody patří finanční a časová náročnost (*Masopust a spol., 2016*).

1.5.3. PCR SSP

PCR SSP je založena na izolaci DNA ze vzorku nesrážlivé periferní krve, amplifikaci DNA pomocí enzymu Taq polymerázy a směsi sekvenčně specifických primerů. Dalším krokem je separace získaných amplikonů DNA pomocí horizontální elektroforézy. Posledním krokem je identifikace velikosti amplikonů po UV ozáření gelu, interpretace výsledku pomocí odečítací tabulky či software a zápis komentáře. PCR SSP se využívá u vyšetření slabého a variantního antigenu D, genotypování HPA či HLA systému (*SOPV HLA laboratoř, TO FN HK, 2021*).

1.5.3.1. Vyšetření slabého a variantního antigenu D

Stanovení RhD antigenu (u pacientů, těhotných, novorozenců nebo dárců krve) je komplikováno existencí řady kvalitativně (= variantní, partial D antigeny) a kvantitativně (= slabé, weak D antigeny) odlišných forem RhD proteinu. Znalost zastoupení variantních a slabých D antigenů je důležitá pro doporučení transfuzní substituce a anti-D profylaxe v těhotenství. Sérologickými metodami nelze vždy určit, zda se jedná o slabý nebo variantní antigen D a výsledek je uzavřen jako RhD^{w/v}. V určitých případech je vhodné došetření antigenu D pomocí DNA metod (*SOPV HLA laboratoř, TO FN HK, 2021*).

Tabulka č. 15 – Označení RhD^{w/v}

Příjemce	TP k podání
RhD pozitivní	RhD pozitivní
RhD ^{w/v} – PCR určen jako slabý antigen D (D weak*)	
Rh D negativní	RhD negativní
RhD ^{w/v} – PCR nevyšetřeno, výsledek neuzavřen	
RhD ^{w/v} – sérologicky suspektní varianta/varianta určená PCR	

Zdroj: *web Transfuzní společnost, 2012*

*do této kategorie se zařazují typy slabého antigenu D podle aktuálních doporučení a poznatků (v současnosti typy 1, 2, 3, 4.0 a 4.1)

1.6. Transfuzní přípravky

Mezi nejčastěji používané TP patří erytrocytové transfuzní přípravky, trombocytové koncentráty a plazma. Transfuzní přípravky se mohou vyrábět různými technikami a od nich se také odvíjí jejich vlastnosti a možnosti použití (*Liubruno a spol., 2009*).

1.6.1. Erytrocyty

Erytrocytové transfuzní přípravky lze připravit diferenciální centrifugací plné krve nebo technikou aferézy, kdy se antikoagulovaná krev rozdělí pomocí separátoru krevních elementů a je sbírána jen jedna krevní složka, v tomto případě erytrocyty. Erytrocyty jsou resuspendovány v náhradním roztoku, kdy resuspenzní roztok zajišťuje antikoagulaci, dále obsahuje látky potřebné k udržení funkční membrány a funkčního metabolismu erytrocytů. Erytrocytové koncentráty se vzácným zastoupením krevně skupinových antigenů je možno zmrazit a dlouhodobě skladovat, jako kryoprotektivum se používá glycerol (*Indrák, 2014*).

Nejčastěji používané erytrocytové transfuzní přípravky v praxi jsou ERD (erytrocyty resuspendované, deleukotizované) a EBR (erytrocyty bez buffy-coatu, resuspendované) (*Řeháček a spol., 2013*).

Vyrobené erytrocytové TP se mohou dále upravovat:

- **Odstranění buffy-coatu**

Odstranění tenké vrstvy leukocytů a trombocytů, která vznikla při centrifugaci mezi plazmou a erytrocyty. Prevence febrilních nehemolytických reakcí.

- **Deleukotizace TP**

Odstranění leukocytů ($<1 \times 10^6$ na TU), z důvodu prevence imunizace, prevence přenosu cytomegaloviru, snížené riziko imunotolerance. Deleukotizace by měla být, pokud možno, provedena přímo při výrobě, před uskladněním TP.

- **Promytí TP**

Opakované promytí resuspenzními roztoky, vhodné při alergii na plazmatické bílkoviny a riziku hemolýzy při podání komplementu (*Indrák, 2014*).

Tabulka č. 16 – Přehled základních erytrocytových TP

Transfuzní přípravek	Zkratka	Minimální obsah Hb (g/TU)
Erytrocyty	E	45
Erytrocyty bez buffy-coatu	EB	43
Erytrocyty resuspendované	ER	45
Erytrocyty bez buffy-coatu	EBR	43
Erytrocyty deleukotizované	ED	40
Erytrocyty resuspendované	ERD	40
Erytrocyty z aferézy	EA	40
Erytrocyty z aferézy resuspendované	EAR	40
Erytrocyty z aferézy deleukotizované	EAD	40
Erytrocyty z aferézy resuspendované deleukotizované	EARD	40
Erytrocyty promyté	EP	40

Zdroj: Řeháček a spol., 2013

Legenda:

Hb ... Hemoglobin

TU ... Transfuzní jednotka = základní terapeutická dávka připravená z jednoho odběru 450 ml plné krve

Jedna terapeutická dávka erytrocytů by měla zvýšit hemoglobin pacienta přibližně o 10 g/l (Kubánková, 2020).

1.6.2. Trombocyty

Trombocytové TP jsou získávány buď z plné krve, kdy se zpracovává izolovaný buffy-coat nebo z plazmy bohaté na destičky. Dalším způsobem je trombocytferéza, kdy jsou z krve separovány pouze trombocyty a ostatní krevní komponenty jsou vráceny zpět do oběhu (Lejdarová, 2016a). Trombocyty jsou resuspendovány v části plazmy nebo v resuspenzním roztoku. Trombocyty z plné krve se připravují smísením 4-6 buffy-coatů nebo smísením 4-6 jednotek trombocytů z plné krve (Řeháček a spol., 2013). Běžně se přípravky deleukotizují, protože jsou často indikovány u hematoonkologických pacientů (Indrák, 2014).

Při podání trombocytových TP není shoda v AB0 a antigenu D v Rh systému zásadní. Za běžných okolností je dodržována AB0 shoda, u krvácejících pacientů se shoda nemusí respektovat. Při vitální indikaci se upřednostňují trombocyty v náhradním roztoku (*Gašová a spol., 2022*).

Při aplikaci trombocytového TP ženám RhD negativním, které jsou ve fertilním věku, upřednostňujeme podání RhD negativního trombocytového TP jako prevenci tvorby anti-D protilátky.

V praxi jsou nejvíce používány trombocyty z aferézy (*Lejdarová, 2016a*).

Tabulka č. 17 – Přehled základních trombocytových TP

Transfuzní přípravek	Zkratka	Počet destiček
Trombocyty z buffy-coatu	TB	$0,5 \times 10^{11}$
Trombocyty z buffy-coatu směsné	TBSD	$2-3 \times 10^{11}$
Trombocyty z buffy-coatu směsné deleuktozované resuspendované	TBSDR	$2-3 \times 10^{11}$
Trombocyty z aferézy	TA	$2-3 \times 10^{11}$
Trombocyty z aferézy deleukotizované	TAD	$2-3 \times 10^{11}$
Trombocyty z aferézy deleukotizované resuspendované	TADR	$2-3 \times 10^{11}$

Zdroj: *Indrák, 2014*

Terapeutická dávka pro dospělého příjemce je minimálně 2×10^{11} trombocytů, což odpovídá 4-5 koncentrátům trombocytů z buffy-coatu nebo jednomu koncentrátu směsných trombocytů nebo trombocytů z aferézy (*Indrák, 2014*). Jedna terapeutická dávka trombocytů by měla zvýšit počet trombocytů u pacienta o $20-40 \times 10^9/l$ (*Lejdarová, 2016b*).

1.6.3. Plazma

Plazma se získává centrifugací z plné krve nebo technikou plazmaferézy. Plazma prochází v České republice povinnou karanténou a ke klinickému použití je uvolněna nejdříve po šesti měsících. Plazma a přípravky vyrobené z plazmy se standardně uchovávají zmražené při teplotě nižší než -25°C . Dodržuje se AB0 kompatibilita, na RhD kompatibilitu se nebere ohled. V případě vitální indikace se podává plazma krevní skupiny AB (*Řeháček a spol., 2013*).

Tabulka č. 18 – Přehled základních TP vyrobených z plazmy

Transfuzní přípravek	Zkratka	Objem [ml]
Plazma	P	240-260
Plazma z aferézy	PA	dle výroby
Kryoprotein	Kryo	dle výroby
K-plazma (plazma bez kryoproteinu)		dle výroby

Zdroj: *Indrák, 2014*

V praxi se nejvíce využívají transfuzní přípravky P (plazma) a PA (plazma z aferézy). Kryoprotein a K-plazma se v České republice běžně nevyrábějí. Výroba se provádí po dohodě s konkrétním zařízením transfuzní služby (*Indrák, 2014*).

1.6.4. Granulocyty z aferézy

Granulocyty se získávají pomocí aferézy anebo z buffy-coatu izolovaného z plné krve, při menší hmotnosti příjemce. Terapeutická dávka je alespoň $10 \times 10^9/l$. Podání granulocytů je indikováno výjimečně, a to například u agranulocytární sepsi, u které pacient nereaguje na širokospektrá antibiotika, zejména v neonatologii a pediatrii, dále u pacientů po chemoterapii při nehojících se defektech s těžkou agranulocytózou (*Indrák, 2014*).

1.6.5. Ozáření transfuzních přípravků

Ozáření transfuzních přípravků se provádí z důvodu prevence reakce štěpu proti hostiteli (GVHD). Viabilní lymfocyty, které jsou obsaženy v přípravku, mohou reagovat proti antigenně neshodnému příjemci transfuze a u imunokompromitovaných jedinců mohou vyvolat GVHD. Ozáření se provádí gama-zářením o dávce 25-30 Gy (Grey), které zamezí blastické transformaci lymfocytů v TP. Ozářené TP jsou indikovány u imunokompromitovaných jedinců, včetně pacientů před a po transplantacích, nedonošenců, novorozenců a u příbuzenských transfuzí (*Procházková, 2009*).

1.7. Výběr vhodného transfuzního přípravku

Výběr TP se provádí vždy individuálně dle potřeb pacienta. Základními faktory, na které musíme brát ohled při výběru TP, jsou věk, pohlaví, diagnóza pacienta nebo již prokázaná protilátka.

Přednostně se podávají TP shodné v AB0 systému a u erytrocytových TP shodné v antigenu D. U plazmy a trombocytů není nutné brát ohled na RhD. Podávání jinokupinových TP je možné v případě dodržení AB0 kompatibility (u erytrocytů včetně shody v antigenu D), upozornění ošetřujícího lékaře na vydání TP s odlišnou krevní skupinou a negativního výsledku testu kompatibility (pouze u erytrocytových TP) (*Masopust a Písačka, 2016*).

1.7.1. Novorozenci a děti

V případě neonatální transfuze je potřeba dodržet kompatibilitu TP v AB0 systému a RhD pro plod i matku. V případě prokázané protilátky u matky volíme TP bez daného antigenu. TP musí být ozářené, deleukotizované a pokud možno čerstvé (stáří maximálně do 5 dní po odběru). Test kompatibility se provádí se sérem/plazmou matky u intrauterinní transfuze i při výměnné transfuzi novorozence (test kompatibility se se sérem/plazmou novorozence neprovádí). TP se podávají ohřáté na tělesnou teplotu, aby nedošlo k hypotermii plodu/novorozence (*Kim, 2018; Masopust a Písačka, 2016*).

1.7.2. Ženy ve fertilním věku

U dívek a žen ve fertilním věku (do 50 let) se volí erytrocytové TP Kell kompatibilní a pokud možno shodné v negativních znacích v Rh systému, pokud neznáme Kell fenotyp volíme K negativní erytrocyty. Při podání trombocytů se volí RhD kompatibilní trombocyty, z důvodu prevence anti-D imunizace. Podání RhD inkompatibilních trombocytů se provádí pouze výjimečně (v urgentních případech) a je nutné nejpozději do 72 hodin po podání aplikovat anti-D imunoglobulin (*Masopust a Písačka, 2016*).

1.7.3. Imunizovaní pacienti

Volíme erythrocyty bez daného antigenu, proti kterému je protilátka namířena a Kell kompatibilní, pokud neznáme Kell fenotyp volíme K negativní erythrocyty. Pokud možno bereme ohled na Rh fenotyp (shodný v negativních znacích) (*Masopust, 2016*).

U protilátky anti-E volíme TP bez antigenu c, u anti-c volíme bez antigenu E a u anti-D bez antigenu C, je však nutné přihlížet k fenotypu pacienta (pokud jej známe). U kombinace protilátek je vhodné stanovit ještě Jk, Fy a S fenotyp a volit erythrocyty shodné v negativních znacích těchto systémů. Pokud není možné zajistit erythrocyty shodné v negativních znacích ve výše uvedených systémech, volíme heterozygotní formy fenotypů (např. Jk(a+b+), Fy(a+b+), Ss) (*Masopust a Písačka, 2016*).

1.7.4. Pacienti s hematologickou/hematoonkologickou diagnózou a s AIHA

U této skupiny pacientů se řídíme dle pravidel psaných výše v kapitole 6.3. Je vhodné volit deleukotizované TP. U pacientů s chladovou AIHA je vhodné zvážit ohřátí TP před podáním (*Lukášová a spol., 2017*). U hematoonkologických pacientů je vhodné zvážit ozáření TP (*Procházková, 2009*).

1.7.5. Pacienti po transplantaci

U pacientů po transplantaci je vhodné podávat deleukotizované a ozářené transfuzní přípravky (*Procházková, 2009*).

1.7.5.1. AB0 a RhD inkompatibilní transplantace krvetvorných buněk

a) „Velká neshoda“

Transplantace přináší „nové“ antigeny, jedná se o inkompatibilitu v AB0 antigenech dárce a imunitním systémem příjemce (např. dárce KS A a příjemce KS 0). Po třech týdnech od transplantace lze prokazovat PAT pozitivitu a může se objevit přechodná imunitní hemolýza. Anti-A a anti-B jsou prokazatelné i několik měsíců po transplantaci, stejně tak PAT pozitivita.

Zde se podávají erytrocytové TP AB0 shodné s původní skupinou AB0 příjemce, dokud je skupina příjemce prokazována a je pozitivní PAT a/nebo jsou stále prokazatelné inkompatibilní AB0 protilátky. U TP obsahující plazmu volíme TP dle AB0 krevní skupiny dárce ode dne transplantace.

b) „Malá neshoda“

V tomto případě transplantace přináší „nové“ protilátky, jedná se o inkompatibilitu v AB0 antigenech příjemce a imunitním systémem dárce (např. dárce KS 0 a příjemce KS A). Za 1-2 týdny se může projevit i klinicky významná imunitní hemolýza.

Zde se podávají erytrocytové TP dle AB0 dárce s minimálním obsahem inkompatibilních protilátek, dokud jsou detekovatelné erytrocyty s původní krevní skupinou. TP s obsahem plazmy se podávají shodné s původní skupinou příjemce, dokud nedojde k vymizení erytrocytů s původní krevní skupinou.

c) „Kombinovaná neshoda“

Kombinace výše uvedených neshod.

Zde se podávají erytrocytové TP krevní skupiny 0 s minimálním obsahem inkompatibilních protilátek, dokud jsou detekovatelné původní erytrocyty s původní krevní skupinou. U TP obsahujících plazmu se podávají TP krevní skupiny AB do vymizení erytrocytů s původní krevní skupinou (*Masopust a Písačka, 2016*).

U RhD pozitivního příjemce s RhD negativním štěpem se podávají RhD negativní erytrocyty a trombocyty (*Masopust a Písačka, 2016*)

1.7.5.2. AB0 a RhD inkompatibilní orgánová transplantace

a) Příjemce má antigen A či B navíc oproti štěpu

= nestejnoskupinová kompatibilní transplantace

V tomto případě se do 48 hodin od transplantace (i v den transplantace) dodržuje krevní skupina příjemce. Následující dny se vybírají TP shodné s příjemcem i štěpem.

b) Příjemci chybí antigen A či B přítomný ve štěpu

= nesteroidní skupinová inkompatibilní transplantace

Před transplantací se u příjemce zjišťuje titer protilátek proti příslušnému antigenu, v případě vysokého titru se provádí plazmaferéza, popřípadě imunoabsorbce, aby došlo k jeho snížení. Od okamžiku provedení transplantace se podávají kompatibilní erythrocyty s příjemcem i se štěpem (*Masopust a Písačka, 2016*).

c) RhD neshoda

U RhD negativních příjemců se při podání erythrocytů po transplantaci RhD pozitivního orgánu dodržuje RhD příjemce, podávají se tedy RhD negativní erythrocyty.

U RhD pozitivních příjemců se po transplantaci RhD negativního orgánu dodržuje RhD příjemce, podávají se tedy RhD pozitivní erythrocyty. Pravidelně se vyšetřuje screening protilátek a PAT. V případě detekce protilátky anti-D se začnou podávat RhD negativní erythrocytové transfuzní přípravky. Tato situace hrozí cca ve 2. až 4. týdnu po transplantaci a je známkou přihojování transplantátu (*Masopust a Písačka, 2016*).

Tabulka č. 19 – Výběr transfuzních přípravků při AB0 neshodné orgánové transplantaci

	Orgán 0	Orgán A	Orgán B	Orgán AB
Příjemce 0	ery 0	ery 0	ery 0	ery 0
	plazma 0 (A,B,AB)	plazma A (AB)	plazma B (AB)	plazma AB
Příjemce A	ery 0	ery A (0)	ery 0	ery A (0)
	plazma A (AB)	plazma A (AB)	plazma AB	plazma AB
Příjemce B	ery 0	ery 0	ery B (0)	ery B (0)
	plazma B (AB)	plazma AB	plazma B (AB)	plazma AB
Příjemce AB	ery 0	ery 0 (A)	ery 0 (B)	ery AB (A,B,0)
	plazma AB	plazma AB	plazma AB	plazma AB

Zdroj: *Masopust a spol., 2022b*

Legenda:

V závorkách jsou uvedeny přípustné alternativy.

Trombocyty podléhají stejnému výběru jako plazma, v případě vitální indikace je možné podávat trombocyty v náhradním roztoku bez ohledu na AB0 (*Masopust a Písačka, 2016*).

2. Experimentální část

2.1. Charakteristika souboru

Pro experimentální část své diplomové práce jsem použila skupinu pacientů (v rámci předtransfuzního vyšetření) a gravidních žen (vyšetřované v rámci prenatální poradny). Data pochází ze dvou pracovišť, která spolu úzce spolupracují – Transfuzní oddělení Karlovarské krajské nemocnice v Chebu (TO CH) a Transfuzní oddělení v Karlových Varech (TO KV). TO CH disponuje laboratoří imunohematologie, která zajišťuje imunohematologická a předtransfuzní vyšetření a má vlastní odběrové středisko. Výrobu a zpracování odebrané krve zajišťuje TO KV.

2.2. Metodika

2.2.1. Screening protilátek a identifikace antierytrocytových protilátek

Preanalytická část všech vyšetření je prováděna v souladu s aktuálním Doporučením Společnosti pro transfuzní lékařství (*Masopust a spol., 2019*). Před zahájením denního provozu laboratoře jsou prováděny denní kontroly, které zaručují validitu výsledků vyšetření.

Pro screeningové vyšetření a identifikaci antierytrocytových protilátek používáme metodu sloupcové aglutinace prováděnou na gelových kartách (DiaMed). Screening protilátek je standardně prováděn v LISS-NAT i v enzymovém testu (který je Společností pro transfuzní lékařství doporučován pouze jako doplňkové vyšetření) u všech pacientů, v případě potřeby může být proveden při 4 nebo 20 °C (např. v případě nejasností u vyšetření krevní skupiny či podezření na nepravidelné chladové protilátky). Identifikace protilátek je zařazena v případě pozitivního screeningu protilátek nebo pozitivního testu kompatibility. Identifikace protilátek je prováděna v NAT, individuálně (dle konkrétního případu) i v enzymovém testu nebo při 4 nebo 20 °C. Zároveň je vždy s identifikací protilátek vyšetřován přímý antiglobulinový test (PAT), včetně zařazení autokontroly (AK).

Principy metod vyšetření jsou uvedeny v teoretické části viz kapitola 1.3.

Vzorek k analýze:

- nesrážlivá krev – antikoagulant EDTA, citrát sodný, CPD-A
- srážlivá krev

Reagencie, materiál:

- 0,8% screeningové diagnostické erythrocyty – DiaCell I-II-III (DiaMed)
- 0,8% panelové diagnostické erythrocyty – DiaPanel (DiaMed)
- (TO KV má navíc k dispozici diagnostické panelové erythrocyty od firmy Sanquin)
- Gelové karty pro sloupcovou aglutinaci – ID-Card LISS/Coombs, ID-Card NaCl, ID-Card Reverse grouping with antibody screening (DiaMed)
- Modifikovaný roztok o nízké iontové síle (LISS) – ID-Diluent 2 (DiaMed)
- Modifikovaný roztok bromelinu pro enzymový test – ID-Diluent 1 (DiaMed)
- Fyziologický roztok (0,9 % NaCl)
- Automatické pipety (25 µl a 50 µl), plastové špičky, plastové jednorázové zkumavky, jednorázové plastové Pasteurovy pipety

Přístroje:

- Centrifugy, ID-inkubátor a ID-centrifuga

Postup vyšetření screeningu a identifikace protilátek, metodou sloupcové aglutinace:

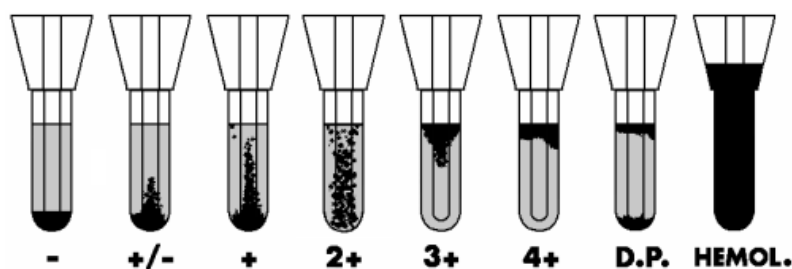
- Primární vzorek pacienta centrifugujeme 5 minut při 3000 otáček za minutu, separujeme sérum/plazmu do předem označené zkumavky a opakujeme centrifugaci viz výše.
- Diagnostické erythrocyty (screeningové, panelové) vytemperujeme na laboratorní teplotu a provedeme kontrolu ID karet (bez poškození či bublin, stejná hladina gelu v jamkách).
- V případě vyšetření chladových nepravidelných protilátek vytemperujeme diagnostické erythrocyty i vzorek pacienta na požadovanou teplotu (4 °C nebo 20 °C).
- Připravíme si 0,8 % suspenzi erythrocytů pacienta (autokontrola, PAT).
Z primárního vzorku odebereme část erythrocytů pacienta do předem označené zkumavky a 3x propereme ve fyziologickém roztoku, centrifugujeme 1 minutu při 3000 otáčkách. Ze zkumavky s 3x propranými erythrocyty odebereme 10 µl erythrocytů a přidáme přibližně 1 ml LISS roztoku pro získání požadované koncentrace suspenze erythrocytů.
- ID karty označíme číslem vyšetření, jménem pacienta, čísly diagnostických erythrocytů, či jinou značkou dle potřeby (např. autokontrola – AK).
- Do mikrozkuavek pipetujeme 50 µl 0,8% diagnostických erythrocytů dle označení.
- Do každé mikrozkuavky pipetujeme 25 µl séra/plazmy.

- V případě enzymového testu pipetujeme 25 μ l bromelinu do jamek určených pro enzymový test.
- Při použití metody NAT nebo enzymového testu inkubujeme 15 minut při 37 °C v ID-inkubátoru.
- Při 4 °C inkubujeme v lednici 30 minut, při 20 °C inkubujeme 15 minut v prostoru odpovídající teploty.
- Následně centrifugujeme 10 minut v ID-centrifuze.

Postup vyšetření přímého antiglobulinového testu, metodou sloupcové aglutinace:

- Příprava vzorku probíhá v rámci vyšetření screeningu a identifikace protilátek viz výše.
- ID karty označíme číslem vyšetření a jménem pacienta.
- Do mikrozkušavky pipetujeme 50 μ l 0,8 %suspence erytrocytů pacienta.
- Následně ihned centrifugujeme 10 minut v ID-centrifuze.
- Hodnocení:
 - Hodnotíme za použití vhodného osvětlení.
 - Negativní reakce – kompaktní sediment na dně gelu.
 - Pozitivní reakce – aglutinované erytrocyty jsou rozptýlené v gelu nebo vytvářejí na povrchu gelu červenou linku.
 - Sílu reakcí hodnotíme na počet křížů.

Obrázek č. 4 – Hodnocení sloupcové aglutinace



Zdroj: Králová, 2013

Zápis výsledků vyšetření je zaznamenáván do LIS, v případě pozitivního výsledku se používají přiložené antigenní profily k diagnostickým screeningovým (obrázek č. 5) a panelovým erytrocytům (obrázek č. 6), které jsou zakládány s výsledkem vyšetření (v tzv. Knize pozitivních protilátek).

Obrázek č. 5 – Antigenní profil screeningových diagnostických erytrocytů

Rh-hr		Möglicher Genotyp / Probable genotype / Genotype probable / Possibile genotipo / Genotipo provável		Spender / Donor / Donateur / Donatore / Donante / Doador		Rh-hr																Kell		Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Luth.		Xg		Spez. Antigene / Special types / Antigènes particuliers / Antígenos particulares / Tipos especiais			Resultat / Result / Résultat / Risultato / Resultado / Resultado		
D	C	E	e	C*	K	k	Kp*	Kp*	Je*	Je*	Fy*	Fy*	Jk*	Jk*	Le*	Le*	P	M	N	S	s	Lu*	Lu*	Xg*	Xg*	♀	♂	IAT	Enzyme	4°C														
I	CCC*D.ee	R ₁ *R ₁	936062	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	N/A								
II	ccD.EE	R ₂ R ₂	173444	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	N/A								
III	ccdde	rr	912112	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	N/A									

Zdroj: vlastní zdroj, součástí diagnostických erytrocytů DiaMed

Obrázek č. 6 – Antigenní profil panelových diagnostických erytrocytů

Rh-hr		Möglicher Genotyp / Probable genotype / Genotype probable / Possibile genotipo / Genotipo provável		Spender / Donor / Donateur / Donatore / Donante / Doador		Rh-hr																Kell		Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Luth.		Xg		Spez. Antigene / Special types / Antigènes particuliers / Antígenos particulares / Tipos especiais			Resultat / Result / Résultat / Risultato / Resultado / Resultado			Bemerkungen / Remarks / Remarques / Note / Observações		
D	C	E	e	C*	K	k	Kp*	Kp*	Je*	Je*	Fy*	Fy*	Jk*	Jk*	Le*	Le*	P	M	N	S	s	Lu*	Lu*	Xg*	Xg*	♀	♂	IAT	Enzyme	4°C																	
1	CCC*D.ee	R ₁ *R ₁	220771	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/A											
2	CCD.ee	R ₁ R ₁	630267	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	nt	nt	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/A											
3	ccD.EE	R ₂ R ₂	198713	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/A	HLA+*									
4	Ccddde	r*r	705536	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/A											
5	ccddEe	r*r	593617	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/A											
6	ccdde	rr	510457	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/A											
7	ccdde	rr	674124	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/A											
8	ccD.ee	R ₂ r	581830	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	N/A										
9	ccdde	rr	853485	0	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/A										
10	ccdde	rr	150383	0	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	N/A	HLA+*									
11	ccdde	rr	382337	0	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/A	HLA+*									

Zdroj: vlastní zdroj, součástí diagnostických erytrocytů DiaMed

2.3. Kazuistika

Pohlaví: Žena

Ročník: 1938

Diagnóza: D509 (anémie z nedostatku železa)

Dne 10. 03. 2023 byl přijat požadavek na předtransfuzní vyšetření a nakřížení 3x ERD, pacientka měla hemoglobin 51 g/l. Vyšetřením byly zjištěny pozitivní protilátky reagující v NAT se všemi diagnostickými screeningovými a panelovými erytrocyty na 1-2 kříže, testy kompatibility s deseti ERD taktéž všechny pozitivní, síla reakcí se lišila v rozmezí jednoho kříže, autokontrola a PAT byly negativní. Týž den byly vzorky zaslány na TO KV, kde došly ke stejnému závěru. Laborantka tuto skutečnost oznámila ošetřujícímu lékaři s tím, že je potřeba pacientku došetřit na vyšším pracovišti v Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT) v Praze. Vzhledem k tomu, že se jednalo o pátek odpoledne, bylo nejbližší možné odeslání vzorků k došetření v ÚHKT až v pondělí 13. 03. 2023. K dispozici tedy nebyly vhodné TP a v případě potřeby byly připraveny pouze TP z vitální indikace. Dne 12. 03. 2023 se stav pacientky zhoršil, hemoglobin klesl na 36 g/l a musely být podány 2x ERD z vitální indikace. Po aplikaci transfuzí nedošlo u pacientky k žádné reakci, po podání se hemoglobin zvýšil na 73 g/l. Dne 13. 03. 2023 ráno byly vzorky odeslány do ÚHKT v Praze k došetření. Dne 14. 03. 2023 ÚHKT uzavřelo vyšetření se závěrem, že byla zjištěna raritní **aloprotilátka anti-Chido/Rodgers (anti-Ch/R)**, patřící mezi anti-HFA protilátky (řadí se také mezi anti-HTLA protilátky). Vzhledem k téměř stoprocentní frekvenci výskytu antigenu na erytrocytech v populaci je zajištění kompatibilních TP téměř nemožné.

Doporučení k transfuzi: autotransfuze, registry vzácných dárců, vyšetření příbuzných, pokud nelze volit ERD dle Rh fenotypu a Kell kompatibilní v NAT po inhibici dárcovskou plazmou, kdy dojde k vysycení anti-Ch/R protilátek.

ÚHKT zaslalo postup k provedení inhibice dárcovskou plazmou, po provedení testu došlo k vymizení protilátky, screening protilátek i testy kompatibility byly negativní a následně byly zajištěny TP, které již nebylo nutné vydávat pouze z vitální indikace.

Pacientce není možné podávat plazmy, po podání plazmy může dojít k anafylaktické reakci, trombocyty se mohou podávat pouze v náhradním roztoku.

Výsledky

Tabulka č. 20 – Přehled a počet provedených vyšetření a počet pozitivních nálezů (specifické antierytrocytové protilátky, nespecifické nálezy a PAT pozitivita) u pacientů, těhotných žen za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV

	TO CH			TO KV		
Rok	2021	2022	Celkem	2021	2022	Celkem
Screening protilátek*	1 263	1 405	2 668	2 062	2 161	4 223
z toho STATIM	197	233	430	497	468	965
z toho pozitivní SCR**	58	56	114	172	230	402
Test kompatibility	2 372	2 954	5 326	7 267	7 382	14 649
z toho STATIM	633	747	1 380	1 736	1 530	3 266
Identifikace protilátek	65	63	128	125	219	410
PAT	235	328	563	2 071	2 673	4 744
Pozitivní nálezy***						
z toho specifické protilátky	55	50	105	173	190	363
z toho nespecifické nálezy	25	25	50	107	130	237
z toho PAT pozitivní	15	13	28	46	39	85
z toho PAT pozitivní	15	12	27	20	21	41
% zastoupení pozitivních screeningů protilátek z celkového počtu provedených screeningů						
TO CH	4,3 %		TO KV	9,5 %		
% zastoupení specifických protilátek z celkového počtu pozitivních nálezů						
TO CH	47,6 %		TO KV	65,3 %		
% zastoupení nespecifických nálezů z celkového počtu pozitivních nálezů						
TO CH	26,7 %		TO KV	23,4 %		
% zastoupení PAT pozitivit z celkového počtu vyšetření PAT						
TO CH	4,8 %		TO KV	0,9 %		

* Do screeningů protilátek jsou zahrnuta vyšetření provedena testem NAT, enzymovým testem nebo přímou aglutinací při chladu (při 4 nebo 20 °C).

** Celkový počet pozitivních screeningů včetně vícenásobných vyšetření téhož pacienta.

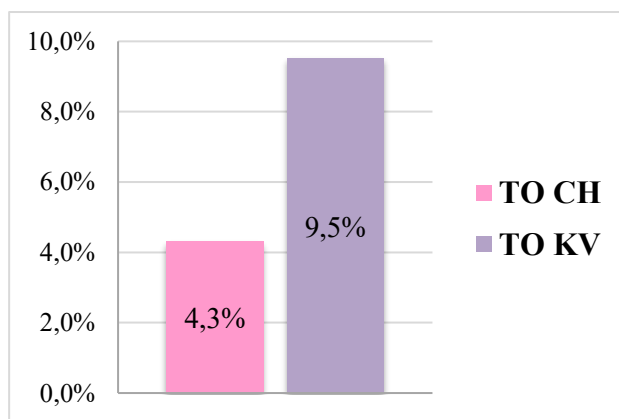
*** Pozitivní nález je započítán pouze 1x i v případě vícenásobných vyšetření pacienta.

V tabulce č. 20 je uveden přehled a počet všech provedených vyšetření (zahrnuta jsou i vícenásobná vyšetření téhož pacienta, tedy pokud je pacient vyšetřován několikrát v roce) na TO CH a TO KV v letech 2021 a 2022 u sledovaného souboru (pacienti v rámci předtranfuzního vyšetření a gravidní ženy z prenatální poradny). Ve druhé části tabulky jsou uvedeny pozitivní nálezy (specifické protilátky, nespecifické nálezy a PAT pozitivita), kde je každý pacient započítán pouze jednou, aby nebyla zkreslena data pozitivních záchytů.

Z tabulky vyplývá, že na TO CH a TO KV bylo za rok **2021 a 2022** provedeno **6 891** screeningových vyšetření antierytrocytových protilátek (z toho **1 395** ve statimovém režimu), **19 975** testů kompatibility (z toho **4 646** ve statimovém režimu), **538** identifikací antierytrocytových protilátek a **5 307** PAT vyšetření. Všechny pozitivní nálezy (**468**) jsou dále rozděleny na specifické nálezy a nespecifické nálezy. Značně vyšší počet PAT testů na TO KV lze vysvětlit jeho rutinním zařazením v rámci každého předtransfuzního vyšetření. Na TO CH je PAT zařazován pouze u pozitivních SCR, v rámci identifikace protilátek nebo požadavku z klinického oddělení.

Pro zajímavost je v grafu č. 1 uvedeno porovnání záchytu pozitivních screeningových vyšetření nepravidelných antierytrocytových protilátek na obou pracovištích (TO CH a TO KV), který vychází z tabulky č. 20.

Graf č. 1 – Procentuální přehled pozitivních screeningových vyšetření antierytrocytových protilátek z celkového počtu provedených screeningových vyšetření u pacientů a těhotných žen za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV



Na TO KV byl záchyt vyšší o **5,2 %**. Dohromady se v průměru jedná o **6,9 %** pozitivních SCR vyšetření z celkového počtu provedených SCR vyšetření.

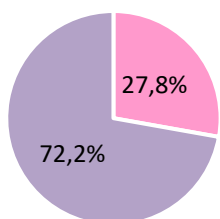
Tabulka č. 21 – Rozdělení sledované skupiny respondentů s pozitivním nálezem (specifickým i nespecifickým) podle pohlaví za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV

Laboratoř	Rok	Počet		
		Muži	Ženy	Gravidní
TO CH	2021	10	12	14
	2022	9	14	11
TO KV	2021	45	49	38
	2022	33	63	51
Celkem		97	138	114
Celkem všechny skupiny		349		

V tabulce č. 21 je znázorněno rozdělení pacientů s pozitivním screeningovým vyšetřením antierytrocytových protilátek podle pohlaví za rok 2021 a 2022, dále jsou uvedeny vyšetřené gravidní ženy. Z celkového počtu **349 pacientů** bylo **97 mužů**, **252 žen**, z nichž bylo **114 gravidních**. Ženy zaujímají 72,2 %, pokud vyřadíme gravidní, pak je to **58,7 %** (bez gravidních) z celkového počtu pozitivních nálezů. V grafu č. 2 je uvedeno procentuální zastoupení mužů (27,8 %), žen (79,9 %) a gravidních (32,7 %), vztaženo k celkovému počtu pozitivních.

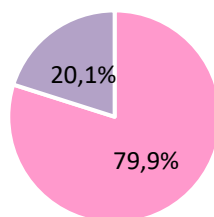
Graf č. 2 – Procentuální zastoupení sledovaných skupin respondentů s pozitivním nálezem (specifickým i nespecifickým) podle pohlaví za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV

Muži z celkového počtu pozitivních



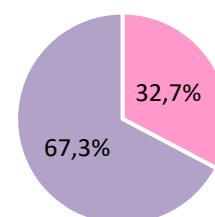
■ Muži ■ Ostatní

Všechny ženy z celkového počtu pozitivních



■ Ženy ■ Ostatní

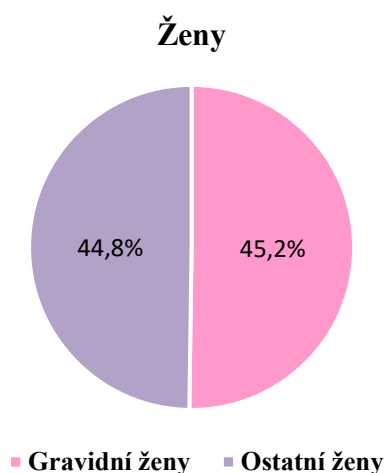
Gravidní ženy z celkového počtu pozitivních



■ Gravidní ženy ■ Ostatní

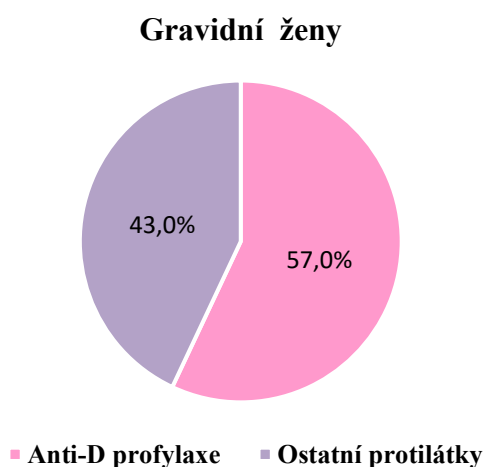
Skupina gravidních žen zastupovala **32,7 %** z celkového počtu všech pozitivních nálezů (specifických i nespecifických) a **45,2 %** z celkového počtu žen s pozitivním nálezem, znázorněno v grafu č. 3 (viz níže).

Graf č. 3 – Procentuální zastoupení žen a gravidních žen se pozitivním nálezem (specifickým i nespecifickým) antierytrocytových protilátek za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV



Ze **114 gravidních žen** byla u **65**, tedy u **57 %**, zjištěna protilátka **anti-D po profylaktickém podání imunoglobulinu**, kdy se nejedná o „pravou“ protilátku, ale o pasivně přenesenou. V grafu č. 4 je znázorněno zastoupení pozitivních nálezů u gravidních žen s identifikovanou protilátkou anti-D po profylaxi a ostatních gravidních žen s jiným pozitivním nálezem (specifickým i nespecifickým).

Graf č. 4 – Procentuální zastoupení gravidních žen s anti-D po profylaxi a ostatních gravidních žen pozitivním nálezem (specifickým i nespecifickým) antierytrocytové protilátky za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV



Mezi ostatními 49 gravidními ženami, u nichž nebyla identifikována protilátka anti-D po profylaxi, byly zjištěny specifické protilátky (celkem 35), viz tabulka č. 22.

Tabulka č. 22 – Počet identifikovaných specifických antierytrocytových protilátek u gravidních žen za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV

Protilátka	anti-C	anti-c	anti-E	anti-C ^w	anti-K	anti-M	anti-N
Počet	1	2	5	1	2	4	1

Protilátka	anti-Le ^a	anti-P1	anti Fy ^a	anti-Jk ^a	anti-S	anti-Wr ^a
Počet	8	1	3	1	4	2

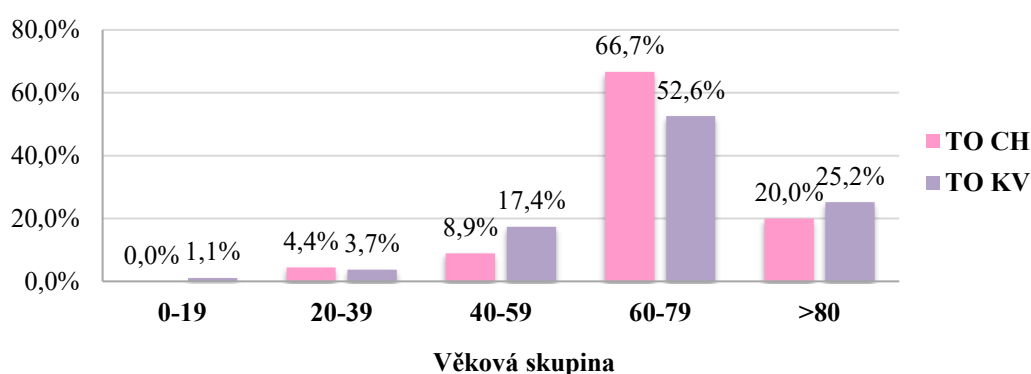
Z tabulky č. 22 vyplývá, že nejčastěji zachycenou protilátkou byla ve skupině gravidních žen **anti-Le^a**, která není pro plod nebezpečná, protože nezpůsobuje HON.

Tabulka č. 23 – Rozdělení sledovaných respondentů s pozitivním nálezem (specifickým i nespecifickým) podle věkových skupin za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV

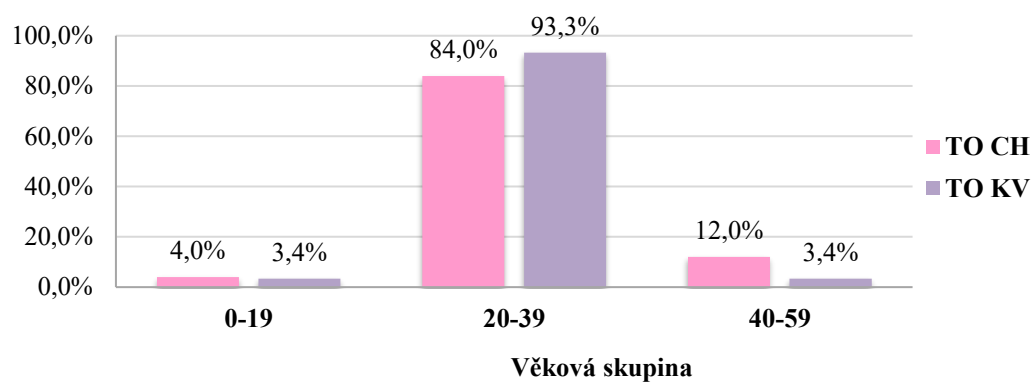
Laboratoř	Rok	Věk				
		0–19	20–39	40–59	60–79	> 80
TO CH	2021	0	13	4	14	5
	2022	1	10	3	16	4
Celkem		1	23	7	30	9
z toho gravidní		1	21	3	0	0
TO KV	2021	2	40	15	55	20
	2022	3	50	21	45	28
Celkem		5	90	36	100	48
z toho gravidní		3	83	3	0	0

V tabulce č. 23 je uvedeno rozdělení skupin respondentů s pozitivním nálezem (specifickým i nespecifickým) podle věkových skupin ve sledovaném období na TO KV a TO CH. Na tabulku navazuje graf č. 5 a 6, kde je procentuálně vyjádřeno zastoupení jednotlivých věkových skupin. Graf č. 5 shrnuje zastoupení mezi pacienty v rámci předtransfuzního vyšetření. V grafu č. 6 je zastoupení dle věku u gravidních žen. V grafu č. 5 dominuje věková skupina **60-79 let**, kdežto mezi gravidními, v grafu č. 6, dominuje věková skupina **20-39 let**.

Graf č. 5 – Procentuální zastoupení pacientů podle věku v rámci předtransfuzního vyšetření ve sledovaném období na TO CH a TO KV



Graf č. 6 – Procentuální zastoupení gravidních podle věku ve sledovaném období na TO CH a TO KV



V následujících tabulkách č. 24 a 25, a na ně navazujících grafech č. 7 a 8, jsou uvedeny specifické antierytrocytové protilátky identifikované pomocí nepřímého antiglobulinového testu (NAT), enzymového testu a případně testem přímé aglutinace při 4 °C či 20 °C (nebo jejich kombinací) technikou sloupcové aglutinace. Rozdělení specifických protilátek dle reaktivity v jednotlivých testech je uvedeno v tabulce č. 26.

Tabulka č. 24 – Přehled identifikovaných specifických nepravidelných antierytrocytových protilátek u pacientů a gravidních žen v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV

Protilátka	Rok		Celkem	Procentuální výskyt
	2021	2022		
anti-D	10	15	25	8,7%
anti-D (profylaxe)	30	35	65	22,6%
anti-C	6	2	8	2,8%
anti-c	3	10	13	4,5%
anti-E	22	17	39	13,6%
anti-e	3	2	5	1,7%
anti-C ^w	4	4	8	2,8%
anti-K	5	13	18	6,3%
anti-Kp ^a	1		1	0,3%
anti-Le ^a	14	11	25	8,7%
anti-Le ^b	4	3	7	2,4%
anti-Jk ^a	1	4	5	1,7%
anti-Jk ^b	1	1	2	0,7%
anti-Fy ^a	4	6	10	3,5%
anti-Fy ^b	1		1	0,3%
anti-S	2	5	7	2,4%
anti-Lu ^a		2	2	0,7%
anti-M	6	3	9	3,1%
anti-N	2		2	0,7%
anti-P1	1	6	7	2,4%
anti-Wr ^a	10	11	21	7,3%
anti-f	1		1	0,3%
anti-H	1	5	6	2,1%
Celkem	132	155	287	100%

V tabulce č. 24 je uveden přehled záchytu specifických nepravidelných antierytrocytových protilátek na TO CH a TO KV ve sledovaném období. Nejvíce zastoupenou byla protilátka **anti-D po profylaxi** a následně **anti-E**. V pěti případech se jednalo o nález

specifické autoprotilátky: **auto-anti-e, auto-anti-E, auto-anti-N, auto-anti-S (2x)**. Výskyt každé autoprotilátky naše pracoviště odesílá ke konfirmačnímu vyšetření do Národní referenční laboratoře v ÚHKT Praha.

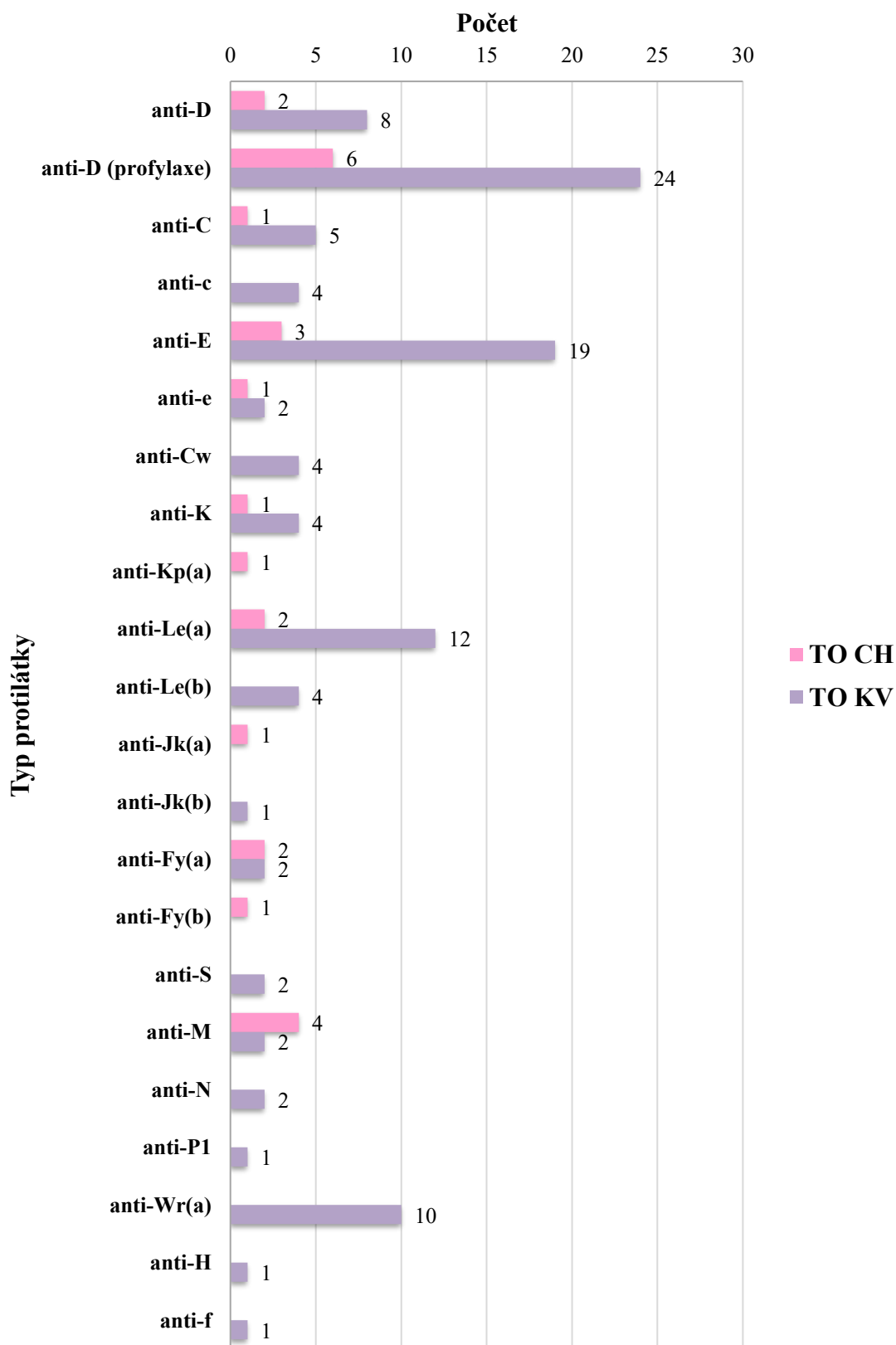
Tabulka č. 25 - Přehled identifikovaných specifických nepravidelných antierytrocytových protilátek u pacientů a gravidních žen v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV

Protilátka	TO CH				TO KV			
	2021	2022	Celkem	%	2021	2022	Celkem	%
anti-D	2	2	4	8,0 %	8	13	21	8,9 %
anti-D (profylaxe)	6	2	8	16,0 %	24	33	57	24,1 %
anti-C	1	2	3	6,0 %	5		5	2,1 %
anti-c		4	4	8,0 %	3	6	9	3,8 %
anti-E	3	3	6	12,0 %	19	14	33	13,9 %
anti-e	1	1	2	4,0 %	2	1	3	1,3 %
anti-C ^w					4	4	8	3,4 %
anti-K	1	4	5	10,0 %	4	9	13	5,5 %
anti-Kp ^a	1		1	2,0 %				
anti-Le ^a	2	3	5	10,0 %	12	8	20	8,4 %
anti-Le ^b					4	3	7	3,0 %
anti-Jk ^a	1	1	2	4,0 %		3	3	1,3 %
anti-Jk ^b					1	1	2	0,8 %
anti-Fy ^a	2		2	4,0 %	2	6	8	3,4 %
anti-Fy ^b	1		1	2,0 %				
anti-S					2	5	7	3,0 %
anti-Lu ^a		1	1	2,0 %		1	1	0,4 %
anti-M	4	2	6	12,0 %	2	1	3	1,3 %
anti-N					2		2	0,8 %
anti-P1					1	6	7	3,0 %
anti-Wr ^a					10	11	21	8,9 %
anti-f					1		1	0,4 %
anti-H					1	5	6	2,5 %
Celkem	25	25	50	100 %	107	130	237	100 %

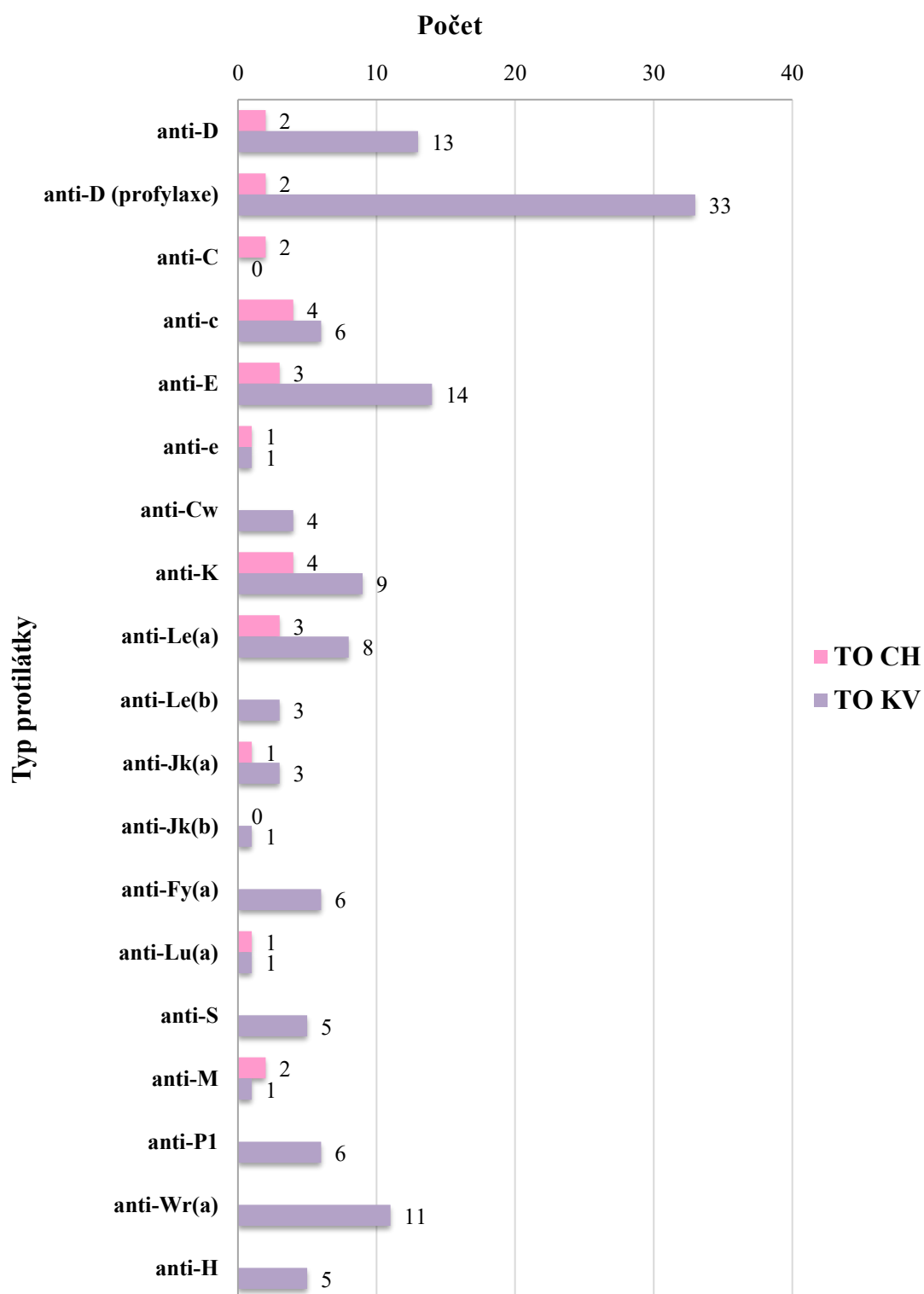
V tabulce č. 25 je přehled záchytu specifických nepravidelných antierytrocytových protilátek pro zajímavost rozdělen na TO CH a TO KV ve sledovaném období. Na TO Cheb je po **anti-D po profylaxi** nejvíce zastoupena protilátka **anti-E** a **anti-M** ve stejném počtu. Na TO KV je po **anti-D profylaxi** nejčastěji zachycena protilátka **anti-E** a dále pak **anti-D** a **anti-Wr^a**.

Data z tabulky č. 25 jsou dále pro větší přehlednost vyobrazena v grafech č. 7 a č. 8.

Graf č. 7 – Přehled počtu identifikovaných specifických nepravdělných antierytrocytových protilátek u pacientů a gravidních žen za rok 2021 na TO CH a TO KV



Graf č. 8 – Přehled počtu identifikovaných specifických nepravidelných antierytrocytových protilátek u pacientů a gravidních žen za rok 2022 na TO CH a TO KV



Tabulka č. 26 – Počet specificky reagujících antierytrocytových protilátek v jednotlivých testech za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV

Druh testu	NAT	E	NAT+E	CH	Celkem*
Počet specificky reagujících antierytrocytových protilátek	40	31	201	17	287 (289)
Procentuální zastoupení	13,8%	10,7%	69,6%	5,9%	100%

Legenda:

NAT = specifické protilátky zachycené nepřímým antiglobulinovým testem

E = specifické protilátky zachycené enzymovým testem

NAT + E = specifické protilátky zachycené oběma testy současně

CH = specifické chladové protilátky (reagující při teplotě 20 °C nebo při 4 °C)

*Celkem bylo ve sledovaném souboru pacientů a těhotných žen nalezeno 287 specifických protilátek, z nichž 2 reagovaly v NAT i jako CH (tedy v součtu 289).

V souboru specifických protilátek detekovaných na TO CH a TO KV ve sledovaném období bylo zachyceno **69,6 % reagujících současně v NAT i v enzymovém testu, 13,8 % pouze v NAT, a 10,7 % reagujících pouze v enzymovém testu. V 5,9 % případů byla protilátka identifikována jako chladová, reagující při 20 °C (nebo při 4°C).**

Pro zajímavost je v tabulce č. 27 uveden počet jednotlivých specifických protilátek, dle jejich reaktivity v příslušných testech ve sledovaném období na TO CH a TO KV.

Tabulka č. 27 – Počet specificky reagujících antierytrocytových protilátek v jednotlivých testech u pacientů a gravidních žen za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV

Protilátka	TO Cheb								TO KV							
	2021				2022				2021				2022			
	NAT	E	NAT+E	CH	NAT	E	NAT+E	CH	NAT	E	NAT+E	CH	NAT	E	NAT+E	CH
anti-D			2				2				8				13	
anti-D (profylaxe)			6				2				24				33	
anti-C			1			1	1			1	4					
anti-c						1	3				3				6	
anti-E		1	2			2	1			5	14			2	12	
anti-e			1				1				2				1	
anti-C ^w											4				4	
anti-K	1				2		2		1		3		4		5	
anti-Kp ^a	1															
anti-Le ^a		2				3				6	6			3	5	
anti-Le ^b										1	3		1		2	
anti-Jk ^a			1				1								3	
anti-Jk ^b											1				1	
anti-Fy ^a	2								2				6			
anti-Fy ^b	1															
anti-S									2				4			1
anti-Lu ^a					1											
anti-M	4			2	2				1			1	1			1
anti-N												2				
anti-P1										1				2		4
anti-Wr ^a									2		8		2		9	
anti-f											1					
anti-H												1				5
Celkem	9	3	13	2	5	7	13	0	8	14	81	4	18	7	94	11

Legenda:

NAT = specifické protilátky zachyceny nepřímým antiglobulinovým testem

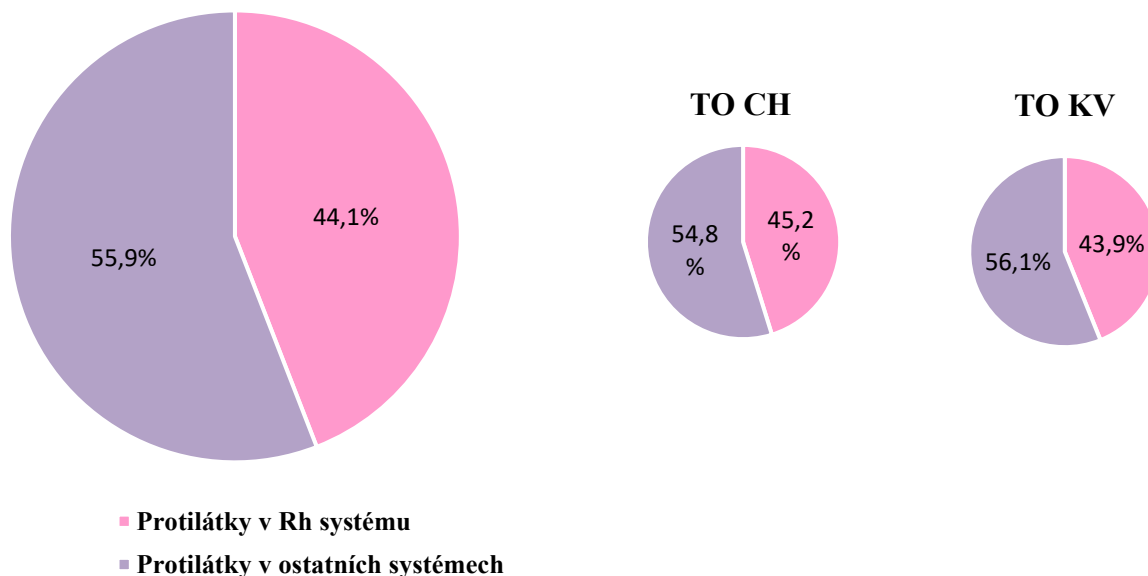
E = specifické protilátky zachyceny enzymovým testem

NAT + E = specifické protilátky zachyceny v obou testech

CH = specifické chladové protilátky reagující při teplotě 20 °C (nebo při 4 °C)

V tabulce č. 27 je zobrazen záchyt jednotlivých protilátek v různých testech. Některé protilátky není možné enzymovým testem prokazovat (např. protilátky systému MNSs, Duffy), naopak některé protilátky v tomto testu zesilují (např. protilátky z Rh systému), což napomáhá jejich identifikaci nebo identifikaci směsí protilátek.

Graf č. 9 – Záchyt protilátek v Rh systému a ostatních antierytrocytových protilátek u pacientů a gravidních žen v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV



Graf č. 9 ukazuje na četný záchyt **protilátek v Rh systému (44,1 %)** ve srovnání s **protilátkami v ostatních skupinových systémech**. Do procentuálního zastoupení nejsou zahrnuty protilátky anti-D vzniklé po podání profylaktického imunoglobulinu (pasivně přenesená protilátka).

Pro zajímavost jsou v pravé části uvedeny dílčí grafy pro TO CH a TO KV. Na TO CH zaujímají protilátky v Rh systému 45,2 % a na TO KV 43,9 % oproti ostatním systémům krevních skupin.

Tabulka č. 28 – Výčet kombinací identifikovaných antierytrocytových protilátek u pacientů a gravidních žen v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV

Laboratoř	Rok	Počet		
		Kombinace dvou protilátek	Kombinace dvou a více protilátek	
TO CH	2021	3	0	
	2022	2	0	
TO KV	2021	8	6	
	2022	17	2	
Celkem		30	8	
Výčet kombinací*		anti-C + anti-D (4x) anti-E + anti-c (4x) anti-E + anti-D anti-C + anti-e anti-c + anti-D anti-C + anti-E anti-c + Jk ^b anti-E + anti-Fy ^b anti-E + anti-Fy ^a anti-E + anti-S anti-E + anti-Wr ^a (2x)	anti-E + anti-Jk ^a anti-D + anti-Wr ^a anti-C ^w + Wr ^a anti-K + anti-Wr ^a (2x) anti-Fy ^a + anti-Jk ^a anti-Fy ^a + anti-Wr ^a anti-Wr ^a + anti-S (2x) anti-Le ^a + anti-Lu ^a anti-H + anti-M anti-Le ^b + anti-Wra ^a	anti-C + anti-C ^w + anti-E anti-C + anti-C ^w + anti-Wr ^a anti-c + anti-E + anti-Wr ^a anti-E + anti-C ^w + anti-Wr ^a (2x) anti-c + anti-C ^w + anti-E anti-c + anti-K + anti-Fy ^a anti-Le ^a + anti-Le ^b + anti- Wr ^a
Celkový počet respondentů se specifickými protilátkami (SP)		168		
Celkový počet respondentů s kombinací protilátek (KP)		38		
% respondentů s KP z celkového počtu respondentů se SP		22,6 %		

* Kombinace protilátek byly identifikovány pomocí NAT, enzymového testu a případně testem přímé aglutinace při 4 °C či 20 °C (nebo jejich kombinací).

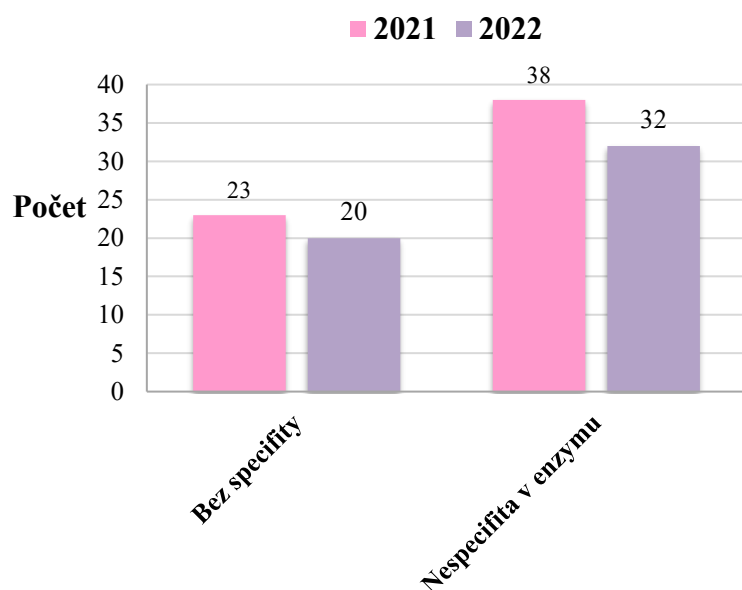
V tabulce č. 28 je u sledovaných respondentů uveden přehled zjištěných kombinací antierytrocytových protilátek (není zde zahrnuta protilátka anti-D vytvořená po profylaktickém podání imunoglobulinu). Nejčastěji byly identifikovány směsi protilátek **anti-C + anti-D (4x)** a **anti-E + anti-c (4x)**. U **31** respondentů se vyskytuje dvojkombinace protilátek a u **8** respondentů i trojkombinace protilátek. Procentuální zastoupení respondentů s kombinací antierytrocytových protilátek z celkového počtu respondentů se specifickými protilátkami je **22,6 %**.

Tabulka č. 29 – Přehled imunizace pacientů v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV

Protilátka	TO CH		TO KV		
	2021	2022	2021	2022	Celkem
anti-C			1		1
anti-c		1	1	3	5
anti-E		2	4	3	9
anti-C ^w			2	1	3
anti-K		1	2	3	6
anti-Le ^a		1	1	2	4
anti-Le ^b			1		1
anti-Jk ^a	1	1	1	1	4
anti-Fy ^a				3	3
anti-Lu ^a		1		1	2
anti-P1				1	1
anti-S				1	1
anti-Wr ^a			2		2
Celkem	1	7	15	19	42
% z celkového počtu specifických protilátek					15,2 %

V tabulce č. 29 je uveden přehled imunizace pacientů ve sledovaném období na TO CH a TO KV. Do této skupiny jsou zahrnuti pouze pacienti prokazatelně imunizovaní antigenem, který byl přítomen v podaném TP (ERD). K imunizaci došlo v **15,2 % případech z celkového počtu identifikovaných specifických antierytrocytových protilátek**.

Graf č. 10 – Přehled pozitivních nespecifických nálezů (pozitivní protilátky bez specifiity a nespecifické reakce v enzymovém testu) z celkového počtu pozitivních nálezů u pacientů a gravidních žen ve roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV



Legenda:

Bez specifiity = pozitivní protilátky bez určení specifiity (reagující v NAT, NAT+E, E)

Nespecifiita v enzymu = zahrnuje nespecifické reakce v enzymovém testu přibližně o stejné síle (včetně AK), reakce jsou přítomny ve všech vyšetřovaných jamkách, kde je použit enzymový test

Tabulka č. 30 – Přehled záchytu nespecifických reakcí u pacientů a gravidních žen v enzymovém testu z celkového počtu pozitivních nálezů v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV

Nespecifické reakce v enzymovém testu v %			
ROK	2021	2022	Celkem
TO CH	16,4 %	8 %	14,0 %
TO KV	16,7 %	14,7 %	

Tabulka č. 30 znázorňuje záchyt nespecifických reakcí v enzymovém testu, včetně procentuální zastoupení ve sledovaném období 2021 a 2022. Nespecifiita v enzymových testech zaujímá **14,0 % z celkového počtu pozitivních nálezů.**

Tabulka č. 31 – Přehled počtu příjemců transfuzí, podaných TP a počet potransfuzních reakcí v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV

Laboratoř	Rok	Celkem příjemců transfuzí	TP			
			ERD	EBR	Plazma	Trombocyty
TO CH	2021	436	368	3	136	27
	2022	597	417	1	124	22
Celkem		1 033	786		260	49
Potransfuzní reakce			4		2	0
TO KV	2021	1 068	849	26	172	47
	2022	973	800	36	128	45
Celkem		2 041	1649		300	92
Potransfuzní reakce			8		0	0

V tabulce č. 31 je uveden počet příjemců TP, druh a počet podaných TP pacientům na TO KV a TO CH během sledovaného období. Součástí tabulky je i počet hlášených potransfuzních reakcí z klinických oddělení. Hlášeny byly pouze **lehké potransfuzní reakce**, 12x febrilní nehemolytická reakce (11x po podání ERD, 1x po podání plazmy) a 2x alergická reakce (1x ERD, 1x plazma).

K reakci po transfuzi došlo u **0,5 % ERD** z celkového počtu podaných ERD a u **0,4 % plazem** z celkového počtu podaných plazem na TO CH a TO KV.

Diskuse

V tabulce č. 20 jsou přehledně uvedeny počty vyšetření screeningových vyšetření (vč. identifikací) nepravidelných antierytrocytových protilátek, testů kompatibility a přímých antiglobulinových testů. Ve druhé polovině tabulky jsou uvedeny pozitivní nálezy, které jsou rozděleny na specifické protilátky, nespecifické nálezy a PAT pozitivní reakce. Z grafu č. 1 vyplývá, že na TO KV došlo o 5,2 % k vyššímu zachytu pozitivních screeningů nepravidelných protilátek v porovnání s TO CH. V součtu počtů obou TO se jedná o 6,9 % pozitivních screeningů z celkového počtu screeningů nepravidelných antierytrocytových protilátek, což je srovnatelné s daty studie *Ebrové (2012)*, která ve své studii hodnotila kohortu nemocnic v Českých Budějovicích s podobnými výsledky (7 % pozitivních screeningových vyšetření).

Tabulka č. 21 zobrazuje rozdělení sledovaných respondentů s pozitivním screeningem antierytrocytových protilátek podle pohlaví. Z mých výsledků vyplývá, že z celkového počtu pozitivních nálezů mírně dominují ženy (58,7 %). Toto zjištění koresponduje s výsledky práce *Ebrové (2012)*, v jejímž sledovaném souboru taktéž převládaly ženy (52 %). Pokud do dat zařadím také gravidní ženy, dojde k nárůstu pozitivních nálezů (72,2 % z celkového počtu pozitivních nálezů). U gravidních žen byla v 57 % případech prokázána pasivně přenesená protilátka anti-D po podání profylaktického imunoglobulinu. Vyšší četnost výskytu pozitivních nálezů antierytrocytových protilátek u ženského pohlaví lze vysvětlit imunizací žen v období těhotenství, což potvrzuje studie autora *Verduin a spol. (2012)*. Autor dále poukazuje na vyšší výskyt tvorby protilátek u žen s diagnózou srpkovité anémie, což nebylo předmětem zkoumání v mé práci. V tabulce č. 22 jsou uvedeny gravidní ženy se specifickými protilátkami (bez protilátky anti-D po profylaxi), kdy nejčtenější zachycenou protilátkou byla protilátka anti-Le^a, která dle *Masopusta a spol. (2016)* bývá bez klinického významu a nezpůsobuje HON.

Dalším hodnoceným parametrem je věková skupina respondentů, což je znázorněno v tabulce č. 23. V příslušných grafech je zobrazeno procentuální zastoupení pacientů v rámci předtransfuzního vyšetření (graf č. 5) a gravidních žen (graf č. 6). Nejvíce zastoupenou věkovou skupinou pacientů s pozitivním nálezem antierytrocytových protilátek je věková skupina 60-79 let a mezi gravidními ženami je to 20-39 let. Tento výsledek se shoduje s *Ebrovou (2012)*, která ve své studii sledovala četnost výskytu pozitivních screeningových vyšetření protilátek u pacientů v rámci předtransfuzního vyšetření (převaha věkové skupiny 61-80 let).

V tabulce č. 24 jsou uvedeny specifické antierytrocytové protilátky, které byly zachyceny ve sledovaném období (5 z nich byly specifické autoprotilátky). Dále je uvedena podrobnější tabulka č. 25, na kterou navazují grafy č. 7 a 8, které přehledně znázorňují počty jednotlivých antierytrocytových protilátek na TO CH a TO KV. Nejvíce zastoupenou protilátkou na obou TO byla protilátka anti-D po profylaktickém podání imunoglobulinu anti-D (u RhD negativních gravidních žen z důvodu prevence HON). Na TO CH jsou dalšími nejfrekventovanějšími protilátkami anti-E a anti-M. Na TO KV následují po anti-D po profylaxi protilátky anti-E, anti-D a anti-Wr^a. Zajímavostí je zjištěný relativně častý záchyt protilátky anti-Wr^a na TO KV (8,9 % ze všech identifikovaných antierytrocytových protilátek), což nekoreluje s daty *Masopusta a spol. (2016)* (1-2 %). Tato protilátka bývá v transfuzní praxi často poddiagnostikována z důvodu chybění antigenu Wr^a na diagnostických erytrocytech (*Masopust a spol., 2016*). Pravděpodobně se v oblasti Karlových Varů vyskytuje populace jedinců s vyšší frekvencí výskytu antigenu Wr^a a určité procento dárců nese antigen Wr^a, což může vést k častému výskytu této protilátky po podané transfuzi u pacientů. Tuto teorii potvrzuje i *Janoušková (2017)*, která ve své studii (data z období let 2011 až 2017) uvádí frekvenci výskytu anti-Wr^a 9,6 %.

V tabulce č. 26 a 27 jsou uvedeny specifické protilátky podle jejich reaktivity v příslušných testech. Zde z výsledků vyplývá, že většina protilátek, tedy 83,4 %, je zachyceno v NAT nebo v NAT a enzymovém testu. Dalších 10,7 % protilátek bylo zachyceno pouze v enzymovém testu (zbylých 5,9 % protilátek patřilo mezi chladové protilátky).

V grafu č. 9 je porovnán záchyt antierytrocytových protilátek v Rh systému oproti protilátkám v ostatních erytrocytových systémech. Do tohoto výčtu nebyly zahrnuty protilátky anti-D vzniklé po podání profylaktického imunoglobulinu, protože se jedná o protilátky pasivně přenesené. U necelé poloviny specifických nálezů, tedy u 44,1 %, se jednalo o protilátky v Rh systému, což koresponduje s tvrzením *Drunecké (2017)* a *Košťálkové (2010)*, které ve svých studiích uvádějí, že protilátky v Rh systému patří mezi nejčastější. Toto potvrzují i literární data *Masopusta a spol (2016)*, která udávají, že Rh systém patří mezi systémy s největší aloimunogenicitou. Protilátky v Rh systému jsou klinicky významné a mohou způsobovat vážné HTR a HON.

Výskyt kombinací protilátek je znázorněn v tabulce č. 28. Za tvorbu aloprotilátek po podaných transfuzích je zodpovědný dobře fungující imunitní systém, který rozezná cizorodé antigeny a vyvolá protilátkovou odpověď, což je samozřejmě správná reakce organismu, ale z transfuzního hlediska je tvorba protilátek komplikací, a to hlavně pro další transfuze. Riziko

tvorby aloprotilátek je u každého jedince jinak vysoké, záleží na individuální odezvě imunitního systému jedince a značný vliv má také imunogenetika. Proč u některých jedinců k aloimunizacím dochází, někdy i již po jediném podaném TP, a u jiných k aloimunizaci nedochází ani po opakovaných transfuzích, dosud není přesně známo a je předmětem zkoumání. Logicky vzato lidé, kteří mají již jednu prokázanou protilátku, jsou náchylnější k tvorbě dalších protilátek. Z výsledků vyplývá, že u 22,6 % respondentů z celkového počtu respondentů se specifickými protilátkami se vyskytuje kombinace dvou a více protilátek. Podobný výsledek uvádí studie, která se věnovala výskytu antierytrocytových protilátek u polytransfundovaných pacientů (*Fluit, 1990*). Do studie autora byli zařazeni opakovaně transfundovaní pacienti, u kterých se sledovalo procento imunizovaných a opakovaně imunizovaných (31,8 %). U protilátek v kombinacích se často vyskytují protilátky nejvíce imunogenního Rh systému. Dále může mít vliv na tvorbu vícečetných protilátek také HLA systém, kdy HLA variabilita hraje důležitou roli v odpovědi na podnět, kterým jsou erytrocytové antigeny. Tomuto jevu se věnuje studie, ve které se autoři zaměřili na hledání asociace mezi vícečetnými aloimunizacemi proti určitým erytrocytovým antigenům a přítomností konkrétních variant HLA II. třídy (HLA-DRB1 a HLA-DQB1) v české populaci (*Maluskova a spol., 2021*). Autoři došli k závěru, že vznik vícečetných protilátek je statisticky významně spojen s alelickou skupinou HLA-DRB1*15 a HLA-DQB1*06. Zjistili signifikantní asociace mezi antigeny HLA II. třídy a třemi častými protilátkovými kombinacemi: anti-C+anti-D, anti-E+anti-c a anti-E+anti-C^w. Autoři dále upřesňují asociaci mezi HLA-DRB1*15 a zvýšeným rizikem aloimunizace proti Rh antigenům. Mezi sledovanými respondenty na TO KV a TO CH byla výše uvedená kombinace anti-C+anti-D zaznamenána 4x, anti-E+anti-c byla zaznamenána 4x a anti-E+anti-C^w (navíc ve směsi s anti-Wr^a) zaznamenána 2x. Za častý výskyt těchto kombinací by tedy mohl být, dle uvedené studie, zodpovědný HLA systém.

Na TO KV nejsou děti, ženy ve fertilním věku, pacienti (s již zjištěnými antierytrocytovými protilátkami), hematologičtí a dialyzovaní pacienti kříženi dle Rh fenotypu. U těchto pacientů je dodržována pouze kompatibilita antigenu C^w a Kell kompatibilní TP. U pacientů s antierytrocytovými protilátkami vybírá TO KV TP bez antigenu, proti kterému je protilátka namířena a dále dodržují Kell kompatibilitu (pokud není znám Kell fenotyp jsou vybrány Kell negativní TP). Na TO CH jsou vybrané skupiny pacientů (děti, ženy ve fertilním věku, pacienti s již zjištěnými antierytrocytovými protilátkami, hematologičtí a dialyzovaní pacienti) zásadně preventivně kříženi výběrem dle Rh a Kell fenotypu pacienta. Pouze v případě urgentního požadavku a nedostupných TP na skladě jsou voleny TP, které nejsou shodné v negativních

znacích Rh fenotypu, Kell kompatibilita je u těchto pacientů dodržována vždy. Dále je na TO CH standardně vyšetřován Rh a Kell fenotyp u pacientů s hemoglobinem nižším než 80 g/l (pokud jim nebyly v posledních 2-3 měsících podány erytrocytové TP), a to z důvodu předpokladu, že budou pacienti opakovaně transfundováni. V případě záchytu protilátky je poté výhodou známý Rh fenotyp, který je následně dodržován. Imunizaci pacientů se nelze vyhnout, ale je možné snížit riziko tvorby aloprotilátek křížením výběrem dle Rh a Kell (u vybraných skupin pacientů), jak je zavedeno na TO CH. Data v tabulce č. 29 ukazují přehledně imunizaci pacientů po podání TP, které zaujímají 15,2 % z celkového počtu specifických protilátek. Na TO KV byly imunizace často způsobeny protilátkami v Rh systému, což lze přisuzovat preventivnímu křížení výběrem vybraných skupin pacientů (zmíněných výše) na TO CH. Nutno podotknout, že imunizace v Rh systému na TO CH byly zaznamenány u pacientů, kteří nepatřili do vybraných skupin křížených výběrem dle Rh a Kell fenotypu. Lze předpokládat, že díky těmto preventivním opatřením na TO CH bylo a je zamezováno mnoha případným imunizacím v těchto systémech.

Nespecifické nálezy antierytrocytových protilátek, především v enzymových testech, jsou znázorněny v grafu č. 10, včetně absolutních počtů. Toto je dále upřesněno v tabulce č. 30, ze které vyplývá, že nespecifické reakce v enzymu zaujímají 14 % z celkového počtu pozitivních nálezů. Pouze na TO CH v roce 2021 byl záchyt 8 %, tzn. o několik procent nižší, ale nikoliv zanedbatelný. Dle Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství (*Masopust a spol., 2022*) není nutné provádět screening nepravidelných protilátek v enzymovém testu standardně u všech pacientů či gravidních žen. TO CH i TO KV má nastaveno standardně provádět enzymový test u každého screeningu nepravidelných protilátek, a to u gravidních žen i u pacientů v rámci předtransfuzního vyšetření. Z hlediska vysokého počtu nespecifických nálezů v enzymovém testu, které v převážné většině nebývají pro pacienty klinicky významné, což ve své práci potvrzuje i *Hynková (2013)*, by bylo vhodné používat enzymový test pouze jako doplňkové vyšetření v případě potřeby, např. při záchytu protilátek reagujících či zesilujících v tomto testu. Pokud by se při vyšetřování nepoužíval enzymový test, došlo by pravděpodobně i k poklesu výskytu klinicky nevýznamných nespecifických protilátek, které nejsou dle platných doporučení považované za rizikové i při podání TP s daných antigenem (*Hynková, 2013*).

V závěru práce jsem uvedla přehled počtu příjemců transfuzí a podaných TP včetně potransfuzních reakcí (tabulka č. 31). Z celkového počtu 14 hlášených potransfuzních reakcí bylo 12 hlášeno jako febrilní nehemolytická potransfuzní reakce (11x ERD, 1x P) a 2 z nich jako alergická potransfuzní reakce (1x ERD, 1x P). K reakci po transfuzi tedy došlo u 0,5%

ERD z celkového počtu podaných ERD a u 0,4 % plazem z celkového počtu podaných plazem na TO CH a TO KV. Nízký výskyt potransfuzních reakcí přisuzují podávání (v převážné většině) deleukotizovaných TP, což potvrzuje i *Galuszková (2020)*, která se zabývala vlivem výrobních postupů TP na četnost výskytu potransfuzních reakcí. Dnes je již běžně součástí výroby deleukotizace TP a standardně jsou v převážné většině pacientům podávány ERD.

Závěr

V práci byly popsány základní pojmy a imunohematologické děje. Byla přiblížena problematika krevně skupinových systémů, které hrají důležitou roli při předtransfuzním vyšetření a při výběru kompatibilního transfuzního přípravku.

V experimentální části práce jsem u sledovaného souboru pacientů a gravidních žen pomocí metody sloupcové aglutinace v gelu analyzovala pozitivní výsledky screeningového vyšetření nepravidelných antierytrocytových protilátek. Kohortu jsem hodnotila z různých hledisek včetně dalších imunohematologických vyšetření (identifikace protilátek, přímý antiglobulinový test, enzymový test) prováděných na našem pracovišti.

Protilátky v Rh systému patřily i v našem souboru mezi nejčastěji identifikované, ve srovnání s protilátkami ostatních erytrocytových systémů, a byl zjištěn výrazně vyšší výskyt protilátky anti-Wr^a.

Mezi pacienty s pozitivním nálezem antierytrocytových protilátek mírně dominovaly ženy, což bylo zdůvodněno vyššímu vystavení žen imunogenním podnětům během těhotenství. Největší zastoupení pozitivních nálezů bylo zjištěno u pacientů (vyšetřovaných v rámci předtransfuzního vyšetření) ve věkové skupině 60-79 let.

U některých aloimunizovaných pacientů byly zjištěny kombinace antierytrocytových protilátek (anti-C+anti-D a anti-E+anti-c), což by mohlo souviset s přítomností určitých alelických skupin HLA II. třídy.

Imunizaci v transfuzní praxi nelze úplně zabránit, ale její riziko lze u vybraných skupin pacientů (opakovaně transfundovaných) snížit preventivním křížením dle Rh, Kell a eventuálně Jk fenotypu. Na obou pracovištích se vyskytovaly pouze lehké potransfuzní reakce, což bylo zdůvodněno procesem deleukotizace TP při výrobě.

Rutiní použití enzymového testu u všech prováděných screeningových vyšetření nepravidelných antierytrocytových protilátek na TO CH i TO KV nebylo shledáno jako výhodné. Výsledky ukázaly nezanedbatelný počet klinicky nevýznamných nespecifických reakcí a vysoké ekonomické náklady tohoto testu. Zavedené postupy na TO CH i TO KV by bylo vhodné v budoucnu přehodnotit a enzymový test používat pouze účelně u vybraných případů.

Použité zkratky

Ab	protilátka
Ag	antigen
AGH	sérum proti lidské bílkovině
AIHA	autoimunitní hemolytická anémie
AK	autokontrola
anti-HFA	protilátky proti antigenům s vysokou frekvencí výskytu
anti-HLA	protilátky proti antigenům hlavního histokompatibilního systému
anti-HTLA	protilátky s vysokým titrem a nízkou aviditou
anti-LFA	protilátky proti antigenům s nízkou frekvencí výskytu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouvláknová DNA
D ^{w/v}	antigen D weak/variant
E	enzymový test
GVHD	reakce štěpu proti hostiteli
Hb	hemoglobin
HFA	antigeny s vysokou frekvencí výskytu
HLA	human leukocyte antigens (hlavní histokompatibilní systém)
HON	hemolytické onemocnění novorozence
HTR	hemolytické potransfuzní reakce
CH	Cheb
Ig	imunoglobulin
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E
MAC	komplex atakující membránu
MASP-1	serinová proteáza asociovaná s manózou
MBL	lektin vázající manózu
NAT	nepřímý antiglobulinový test
KS	krevní skupina
KV	Karlovy Vary

LISS	roztok o nízké iontové síle
LFA	antigeny s nízkou frekvencí výskytu
PAT	přímý antiglobulinový test
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCR SSP	PCR se sekvenčně specifickými primery
PR	potransfuzní reakce
SCR	screening antierytrocytových protilátek
ssDNA	jednovláknová DNA
rt-PCR	real-time PCR
TK	test kompatibility
TO	transfuzní oddělení
TP	transfuzní přípravek
TU	transfuzní jednotka
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze

Seznam tabulek

Tabulka č. 1 – Přehled skupinových systémů	22
Tabulka č. 2 – Frekvence výskytu krevních skupin v populaci	23
Tabulka č. 3 – Přehled základních vlastností AB0 systému	23
Tabulka č. 4 – Frekvence výskytu významných Rh antigenů v populaci	29
Tabulka č. 5 – Přehled Rh fenotypů a genotypů, frekvence výskytu u RhD pozitivních	30
Tabulka č. 6 – Přehled Rh fenotypů a genotypů, frekvence výskytu u RhD negativních.....	31
Tabulka č. 7 – Přehled frekvence výskytu fenotypů Kell systému	34
Tabulka č. 8 – Frekvence fenotypů systému Lewis	35
Tabulka č. 9 – Frekvence fenotypů systému Kidd	36
Tabulka č. 10 – Frekvence fenotypů systému Duffy	37
Tabulka č. 11 – Frekvence fenotypů MNS systému	38
Tabulka č. 12 – Frekvence fenotypů systému Lutheran.....	39
Tabulka č. 13 – Frekvence antigenu P1 a možných fenotypů systému P1PK	41
Tabulka č. 14 – Vyšetření aglutinogenů na erythrocytech pomocí diagnostických protilátek a vyšetření aglutininů v séru/plazmě pomocí diagnostických erytrocytů	48
Tabulka č. 15 – Označení RhD ^{w/v}	54
Tabulka č. 16 – Přehled základních erytrocytových TP.....	56
Tabulka č. 17 – Přehled základních trombocytových TP.....	57
Tabulka č. 18 – Přehled základních TP vyrobených z plazmy	58
Tabulka č. 19 – Výběr transfuzních přípravků při AB0 neshodné orgánové transplantaci	63
Tabulka č. 20 – Přehled a počet provedených vyšetření a počet pozitivních nálezů (specifické antierytrocytové protilátky, nespecifické nálezy a PAT pozitivita) u pacientů, těhotných žen za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV	69
Tabulka č. 21 – Rozdělení sledované skupiny respondentů s pozitivním nálezem (specifickým i nespecifickým) podle pohlaví za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV	71
Tabulka č. 22 – Počet identifikovaných specifických antierytrocytových protilátek u gravidních žen za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV	73
Tabulka č. 23 – Rozdělení sledovaných respondentů s pozitivním nálezem (specifickým i nespecifickým) podle věkových skupin za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV	74
Tabulka č. 24 – Přehled identifikovaných specifických nepravidelných antierytrocytových protilátek u pacientů a gravidních žen v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV	76

Tabulka č. 25 - Přehled identifikovaných specifických nepravidelných antierytrocytových protilátek u pacientů a gravidních žen v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV	78
Tabulka č. 26 – Počet specificky reagujících antierytrocytových protilátek v jednotlivých testech za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV.....	81
Tabulka č. 27 – Počet specificky reagujících antierytrocytových protilátek v jednotlivých testech u pacientů a gravidních žen za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV.....	82
Tabulka č. 28 – Výčet kombinací identifikovaných antierytrocytových protilátek u pacientů a gravidních žen v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV	84
Tabulka č. 29 – Přehled imunizace pacientů v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV.....	85
Tabulka č. 30 – Přehled záchyty nespecifických reakcí u pacientů a gravidních žen v enzymovém testu z celkového počtu pozitivních nálezů v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV	86
Tabulka č. 31 – Přehled počtu příjemců transfuzí, podaných TP a počet potransfuzních reakcí v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV	87

Seznam obrázků

Obrázek č. 1 – Struktura protilátky	14
Obrázek č. 2 – Struktura jednotlivých imunoglobulinů	16
Obrázek č. 3 – Přehled navázaných monosacharidů u jednotlivých krevních skupin	25
Obrázek č. 4 – Hodnocení sloupcové aglutinace	66
Obrázek č. 5 – Antigenní profil screeningových diagnostických erytrocytů.....	67
Obrázek č. 6 – Antigenní profil panelových diagnostických erytrocytů.....	67

Seznam grafů

Graf č. 1 – Procentuální přehled pozitivních screeningových vyšetření antierytrocytových protilátek z celkového počtu provedených screeningových vyšetření u pacientů a těhotných žen za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV	70
Graf č. 2 – Procentuální zastoupení sledovaných skupin respondentů s pozitivním nálezem (specifickým i nespecifickým) podle pohlaví za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV	71
Graf č. 3 – Procentuální zastoupení žen a gravidních žen se pozitivním nálezem (specifickým i nespecifickým) antierytrocytových protilátek za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV.....	72
Graf č. 4 – Procentuální zastoupení gravidních žen s anti-D po profylaxi a ostatních gravidních žen pozitivním nálezem (specifickým i nespecifickým) antierytrocytové protilátky za rok 2021 a 2022 na TO CH a TO KV.....	72
Graf č. 5 – Procentuální zastoupení pacientů podle věku v rámci předtransfuzního vyšetření ve sledovaném období na TO CH a TO KV	74
Graf č. 6 – Procentuální zastoupení gravidních podle věku ve sledovaném období na TO CH a TO KV	75
Graf č. 7 – Přehled počtu identifikovaných specifických nepravidelných antierytrocytových protilátek u pacientů a gravidních žen za rok 2021 na TO CH a TO KV	79
Graf č. 8 – Přehled počtu identifikovaných specifických nepravidelných antierytrocytových protilátek u pacientů a gravidních žen za rok 2022 na TO CH a TO KV	80
Graf č. 9 – Záchyt protilátek v Rh systému a ostatních antierytrocytových protilátek u pacientů a gravidních žen v roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV	83
Graf č. 10 – Přehled pozitivních nespecifických nálezů (pozitivní protilátky bez specifity a nespecifické reakce v enzymovém testu) z celkového počtu pozitivních nálezů u pacientů a gravidních žen ve roce 2021 a 2022 na TO CH a TO KV	86

Použitá literatura

Jílková, Helena. *Transfuzní lékařství*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2009, 98 stran. ISBN 9788073951511.[str. 13-14; 25-26, 30]

Jílek, Petr. *Základy imunologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Anyway, 2008, 79 stran. ISBN 978-80-254-2422-3.[34-36]

Navrátil, Leoš. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha: Grada, 2008, 424 stran. ISBN 978-80-247-2319-8. [str. 239]

Rýnarová, Eliška. Ústní sdělení, 2022.

Hořejší, Václav a Bartůňková, Jiřina. *Základy imunologie*. Vyd. 3. Praha: Triton, 2005, 279 stran. ISBN 80-7254-686-4. [str. 21-22; 45]

Hrubíško, Mikuláš. *Hematologie a krevní transfúze: Učebnice pro stř. zdrav. školy, stud. obor zdravotní laborant*. Praha: Avicenum, 1983, 274 stran. Učebnice pro zdravotnické školy (Avicenum).[str. 14-17; 20-24]

Řeháček, Vít a Masopust, Jiří. *Transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2013, 264 stran. ISBN 978-80-247-4534-3.[str. 135; 140-141; 151-178]

Drunecká, Veronika. *Tvorba protilátek u příjemců transfuze ve FN Motol*. Bakalářská práce, ČVUT v Praze, Kladno, 2017. [str. 27] [citováno 13. 10. 2022] Dostupné z:

https://dspace.cvut.cz/bitstream/handle/10467/74742/FBMI-BP-2017-Drunecka-Veronika-prace.pdf;jsessionid=F3CB07D65913F5242933AB223DF536A4?sequence=-1&fbclid=IwAR3KkERwEBtcewMj8YgjUG_5IUhiAxEFTEq1QSKVnSgBqnKO8EZ1fb36tUI

web e-learning VŠCHT. *Imunoglobuliny*. [on-line] [citováno 13. 10. 2023] Dostupné z: <https://e-learning.vscht.cz/mod/glossary/showentry.php?eid=50731>

Holubová, Monika. *STANOVENÍ PRODUKCE IMUNOGLOBULINŮ U PACIENTŮ S HUMORÁLNÍMI IMUNODEFICIENCEMI*. Bakalářská práce, 2017. [on-line] [citováno 13. 10. 2023] Dostupné z:

https://is.muni.cz/th/tahux/Holubova_M._-Bakalarska_prace_25.4.2017_.pdf

Ppenka, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2012, 208 stran. ISBN 978-80-247-3460-6.[str. 20-23; 33-40; 42-45; 48-49]

Masopust, Jiří a Písačka, Martin. *Praktická imunohematologie: erytrocyty*. Praha: Mladá fronta, 2016, 392 stran. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-3740-2.[str. 55-124; 219-230; 252-263]

Farhud DD, Zarif Yeganeh M. A brief history of human blood groups. *Iran J Public Health*. 2013;42(1):1-6. Epub 2013 Jan 1. PMID: 23514954; PMCID: PMC3595629. [citováno 16. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3595629/>

Nathan and Oski's. *Hematology of Infancy and childhood*, Saunders Elsevier, 7. vydání, Canada, 2009, [str. 625][citováno 16. 10. 2022] Dostupné z:

https://books.google.cz/books?id=_9CmOIvgJm4C&printsec=frontcover&dq=Hematology+of+Infancy+and+childhood&hl=cs&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Hematology%20of%20Infancy%20and%20childhood&f=false

Eckstein, Reinhold. *Imunohematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Diag Human, 1994, 173 stran.

Roubalová L., Imunologický princip rozvoje erytrocytární aloimunizace těhotné ženy, hemolytické nemoci plodu a prevence RhD aloimunizace u RhD negativních žen. *Časopis Česká gynekologie*, 2020 (6). [online][citováno 16. 10. 2022] Dostupné z:

<https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2020-6-14/imunologicky-princip-rozvoje-erytrocytarni-aloimunizace-tehotne-zeny-hemolyticke-nemoci-plodu-a-prevence-rhd-aloimunizace-u-rhd-negativnich-zen-126026>

Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Chapter 5, The ABO blood group.[citováno 16. 10. 2022]Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2267/>

Web LibreTexts CHEMISTRY. 6.7: Oligosaccharides. Libretexts, 2021. [online] [citováno 16. 10. 2022]Dostupné z:

https://chem.libretexts.org/Courses/Georgia_Southern_University/CHEM_1152%3A_Survey_of_Chemistry_II_%28GSU_-_Dr._Osborne%29/06%3A_Carbohydrates/6.07%3A_Oligosaccharides?readerView

Shrivastava M, Navaid S, Peethambarakshan A, Agrawal K, Khan A. Detection of rare blood group, Bombay (Oh) phenotype patients and management by acute normovolemic hemodilution. *Asian J Transfus Sci.* 2015 Jan-Jun;9(1):74-7. doi: 10.4103/0973-6247.150957. PMID: 25722578; PMCID: PMC4339938. [citováno 16. 10. 2022] Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4339938/>

Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Chapter 7, The Rh blood group.[citováno 18. 10. 2022]Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2269/>

Zima, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2013. ISBN 978-80-7492-062-2, 1146 stran. [str. 51]

Indrák, Karel, ed. *Hematologie a transfuzní lékařství*. V Praze: Triton, 2014. Lékařské repertorium. ISBN 978-80-7387-722-4.[str. 526-527]

Masopust J., Bohoněk M., Galuszková D., Gašová Z., Písačka M., Procházková R., Řeháček V., Turek P. PŘEDTRANSFUZNÍ LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_08, verze 4 (2022_05_01), 2022a. [on-line][citováno 13. 11. 2022] [str. 6-15] Dostupné z:

file:///C:/Users/u%C5%BEivatel/Downloads/dop_stl_08_predtransfuzni_vys_v4_2022_05_01.pdf

Řeháček V., Kloučková K., Drešerová Z. Záchyt antierytrocytových protilátek při předtransfuzním vyšetření. *Časopis, Transfuze a hematologie dnes*. 22, 2016, No. Supplementum, p. 28-32. [on-line] [citováno 15. 11. 2022] Dostupné z:

<https://www.prolekare.cz/casopisy/transfuzne-hematologie-dnes/2016-supplementum/imunohematologie-ii-59732>

Liumbruno G, Bennardello F, Lattanzio A, Piccoli P, Rossetti G. Recommendations for the transfusion of red blood cells. *Blood Transfus.* 2009 Jan;7(1):49-64. doi: 10.2450/2008.0020-

08. PMID: 19290081; PMCID: PMC2652237. [on-line] [citováno 15. 11. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2652237/>

Kubánková. Erytrocyty resuspendované deleukotizované (ERD IN LINE). Specifikace SPE-HTO-032. Nemocnice Písek, 2020. [on-line] [str. 6] [citováno 20. 11. 2022] Dostupné z:

https://www.nemopisek.cz/media/ke_stazeni/HTO2020ErytrocytyDeleukotizovaneERD_IN_LINE.pdf

Gašová Z., Bohoněk M., Galuszková D., Masopust J., Písačka M., Procházková R., Řeháček V., Turek P. Doporučené postupy pro podání transfuzních přípravků. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2015_12, verze 3 (2022_05_01). [on-line] [citováno 29. 11. 2022] [str. 9] Dostupné z:

file:///C:/Users/u%C5%BEivatel/Downloads/dop_stl_12_transfuze_v3_2022_05_01.pdf

Lejdarová, Hana. Trombocyty z aferézy a z plné krve – srovnání kvality a bezpečnosti. Časopis, Transfuze a hematologie dnes. 22, 2016a, No. 4, p. 244-253. [on-line][citováno 29. 11. 2022] Dostupné z:

https://www.prolekare.cz/casopisy/transfuze-hematologie-dnes/2016-4-14/trombocyty-z-aferezy-a-z-plne-krve-srovnani-kvality-a-bezpecnosti-60488?fbclid=IwAR0vo-ft0IjUa4rqBhATxOGIdXKu7QfP8N7zn_E-db1Q8oNQtsYfFRWOLeU

Lejdarová, Hana. TRANSFUZNÍ PŘÍPRAVKY A KREVNÍ DERIVÁTY. Studijní přednáška LF:MBTS081p Transfuzní služba - přednáška, 2016b. [on-line][citováno 29. 11. 2022] [slide 15] Dostupné z:

https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/MBTS081p/um/Transfuzni_pripavky_a_krevni_derivaty.pdf

Procházková, Renata. Výroba transfuzních přípravků, kontrola jakosti, SPEKTRUM TRANSFUZNÍCH PŘÍPRAVKŮ A JEJICH JAKOST. Časopis, Transfuze a hematologie dnes - Číslo 3 - Supplementum/2009. p.32-38. [on-line][citováno 29. 11. 2022] Dostupné z:

<https://www.prolekare.cz/casopisy/transfuze-hematologie-dnes/2009-3-supplementum/vyroba-transfuznich-pripavku-kontrola-jakosti-30893>

Kim DH. Transfusion practice in neonates. Korean J Pediatr. 2018 Sep;61(9):265-270. doi: 10.3345/kjp.2018.06849. Epub 2018 Sep 6. PMID: 30185018; PMCID: PMC6172519. [on-line][citováno 10. 12. 2022] Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6172519/>

M. Lukášová, J. Procházková, A. Hluší. Autoimunitní hemolytická anémie – diagnostika a léčba, včetně transfuze erytrocytů. Časopis, Transfuze a hematologie dnes, číslo 23, 2017, No. 1, p. 41-51. [on-line][citováno 22. 12. 2022] Dostupné z:

<https://www.prolekare.cz/casopisy/transfuze-hematologie-dnes/2017-1/autoimunitni-hemolyticka-anemie-diagnostika-a-lecba-vcetne-transfuze-erytrocytu-61044>

Rýznarová, Eliška. Ústní sdělení, 2023.

Králová, Šárka. Automatizace v imuno hematologii. Bakalářská práce, 2013. [on-line][citováno 12. 3. 2023] Dostupné z: <https://docplayer.cz/39445941-Automatizace-v-imunohematologii.html>

Masopust J., Bohoněk M., Galuszková D., Gašová Z., Písačka M., Procházková R., Řeháček V., Turek P. Transfuze – AB0 systém a antigen D. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2022_16, verze 1 (2022_06_01) 2022b. [on-line][citováno 25. 3. 2023] [str. 5] Dostupné z:

file:///C:/Users/u%C5%BEivatel/Downloads/doporuceni_stl_c_16_transfuze_ab0_system_a_antigen_d.pdf

Masopust J., Písačka M., Turek P. ZÁKLADNÍ IMUNOHEMATOLOGICKÁ LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ ČERVENÉ ŘADY – OBECNÉ ZÁSADY A TECHNICKÉ POSTUPY. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP 09)_07, verze 4 (2019_9), 2019. [on-line][citováno 3. 3. 2023] Dostupné z:

<file:///C:/Users/u%C5%BEivatel/Downloads/e0cd66d421a31125b19201d1312835dc.pdf>

Web Transfuzní společnost. VYŠETŘOVÁNÍ ANTIGENU D. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2012_10 ze dne 01. 11. 2012, 2012. [on-line][citováno 18. 3. 2023] Dostupné z:

<https://www.transfuznispolecnost.cz/media/document/230b46807fc5f841e5cecd725020d6ca.pdf>

Valones MA, Guimarães RL, Brandão LA, de Souza PR, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol.* 2009 Jan;40(1):1-11. doi: 10.1590/S1517-83822009000100001. Epub 2009 Mar 1. PMID: 24031310; PMCID: PMC3768498. [on-line] [citováno 18. 3. 2023] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768498/>

Šmarda, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1, 188 stran. [str. 73-75]

SOPV HLA laboratoř, TO FN HK. *TYPIZACE RHD VARIANT (PARTIAL D-TYPE) A SLABÝCH D TYPŮ (WEAK D-TYPE) METODOU PCR SSP*, 2021.

Hynková, Pavlína. Význam enzymových testů při vyšetření nepravidelných protilátek proti erytrocytům. *Bakalářská práce*, 2013. [on-line][citováno 24. 4. 2023] Dostupné z: https://is.muni.cz/th/x6xkh/BAKALARSKA_PRACE_PH_2013_konecna.pdf

Ebrová, Jana. Předtransfuzní vyšetření, klinicky významné protilátky proti antigenům erytrocytů a vyhledávání kompatibilních erytrocytů u pacientů s aloimunizace. *Bakalářská práce*, 2012. [on-line] [citováno 24. 4. 2023] Dostupné z: https://theses.cz/id/zpivoo/Bakalsk_prce.pdf

Janoušková, Miloslava. *Imunohematologické kazuistiky. Identifikace antierytrocytárních protilátek*, Transfuzní oddělení nemocnice v Karlových Varech KKN a.s.. Přednáška v rámci vzdělávací akce Konference Střešovický podzim VIII., 2017. [on-line][citováno 28. 4. 2023] Dostupné z: <https://www.uvn.cz/cs/doc/prednasky-ohkt/prednasky-ohkt-2017-1/1598-immunohematologicke-kazuistiky-identifikace-antierytrocytarnich-protilatek/file>

Košťáková, Helena. *OSTATNÍ KREVNĚSKUPINOVÉ SYSTÉMY*. *Bakalářská práce*, 2010. on-line][citováno 24. 4. 2023] Dostupné z: https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/29123/BPTX_2008_1_11160_0_201310_0_67537.pdf?sequence=1

Fluit CR, Kunst VA, Drenthe-Schonk AM. Incidence of red cell antibodies after multiple blood transfusion. *Transfusion*. 1990 Jul-Aug;30(6):532-5. doi: 10.1046/j.1537-2995.1990.30690333485.x. PMID: 2378025. [on-line][citováno 30. 4. 2023] Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2378025/>

Verduin EP, Brand A, Schonewille H. Is female sex a risk factor for red blood cell alloimmunization after transfusion? A systematic review. *Transfus Med Rev*. 2012 Oct;26(4):342-53, 353.e1-5. doi: 10.1016/j.tmr.2011.12.001. Epub 2012 Jan 13. PMID: 22244869.[on-line] [citováno 30. 4. 2023] Dostupné z:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22244869/>

Maluskova, Alena & Mrazek, Frantisek & Kozelska, Renata & Koristka, M. & Cermakova, Zuzana. (2021). Association of multispecific red blood cell alloimmunization with HLA-Class II variants is related to Rh phenotypes. *Bratislava Medical Journal*. 122. 179-183. 10.4149/BLL_2021_028. [on-line][citováno 30. 4. 2023] Dostupné z:

https://www.researchgate.net/publication/349343626_Association_of_multispecific_red_blood_cell_alloimmunization_with_HLA-Class_II_variants_is_related_to_Rh_phenotypes

Galuzzková, D. Vliv výrobních postupů transfuzních přípravků (TP) na četnost potransfuzních reakcí (PR) – srovnání roku 2008 s rokem 2018 *. *Časopis, Transfúze Hematol. dnes*, 26, 2020, No. Supplementum 1, p. 36. [on-line][citováno 30. 4. 2023] Dostupné z:

<https://www.prolekare.cz/casopisy/transfuzie-hematologie-dnes/2020-supplementum-1/vliv-vyrobnich-postupu-transfuznich-pripravku-tp-na-cetnost-potransfuznich-reakci-pr-srovnani-roku-2008-s-rokem-2018-124284>