

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd



**Imunohematologická vyšetření dárců krve
a krevních složek**

Immuno-hematological testing in blood donors

Bakalářská práce

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

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval(a) samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne

podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce RNDr. Gabriele Červené, Ph.D., za odborné vedení, konzultaci, pomoc a podporu.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor: Eliška Eliášová

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

Název práce: Imunohematologická vyšetření dárců krve a krevních složek

Bakalářská práce je zaměřena na imunohematologická vyšetření dárců krve a krevních složek. Jsou zde uvedeny základní imunohematologické pojmy, vysvětleny laboratorní postupy vyšetření krve dárců a jejich význam pro zajištění bezpečnosti a kompatibility krevních transfuzí. Práce se věnuje určování krevních skupin v systémech ABO a RhD, popisuje vyšetření Rh a Kell fenotypu a detailněji se zaměřuje na screening a identifikaci nepravidelných antierytrocytových protilátek. Praktická část popisuje metodiku vyšetřování nepravidelných antierytrocytových protilátek na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Je zde uveden záchyt nepravidelných antierytrocytových protilátek u souboru dárců z TO FN HK v letech 2020–2024, včetně nejčastěji zastoupených protilátek a posouzení jejich klinického významu. Zjištěná data jsou porovnána se zahraničními studii.

Klíčová slova: imunohematologie, dárce krve, krevní skupiny, screening protilátek, antierytrocytové protilátky

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Laboratory diagnostics in Healthcare

Author: Eliška Eliášová

Supervisor: RNDr. Gabriela Červená, Ph.D.

Title of thesis: Immunohematological testing in blood donors

This bachelor's thesis focuses on immunohematological testing in blood donors. Thesis presents immunohematological terms, describes laboratory procedures for examining donor blood, and explains their importance for ensuring the safety and compatibility of blood transfusions. The work focuses on the determination of blood groups in the ABO and RhD systems, describes Rh and Kell phenotype testing, and provides a detailed focus on the screening and identification of irregular antierythrocyte antibodies. The practical part describes the methodology of irregular antierythrocyte antibody testing at the Transfusion Department of the University Hospital in Hradec Králové. The study presents the detection of irregular antierythrocyte antibodies among a cohort of blood donors at the Transfusion Department of the University Hospital in Hradec Králové between 2020 and 2024. It includes an analysis of the most frequently identified antibodies and an evaluation of their clinical significance. The findings are subsequently compared with data from international studies.

Keywords: immunohematology, blood donor, blood groups, antibody screening, antierythrocyte antibodies

Obsah

Zkratky	7
1 Úvod.....	8
2 Teoretická část	9
2.1 Imunohematologie	9
2.1.1 Základní imunohematologické pojmy	9
2.2 Krevní skupinové systémy	12
2.2.1 AB0 systém.....	12
2.2.2 Rh systém	13
2.2.3 Kell systém.....	15
2.3 Imunohematologická vyšetření u dárců krve a krevních složek.....	16
2.3.1 Vyšetření krevních skupin AB0 a RhD.....	16
2.3.2 Vyšetření Rh (C, c, E, e, C ^w) a Kell fenotypu	19
2.3.3 Screening nepravidelných protilátek proti erytrocytům.....	20
2.3.4 Další vyšetření	23
3 Praktická část.....	25
3.1 Metodika screeningového vyšetření antierytrocytových protilátek	25
3.2 Výsledky	28
4 Diskuse	36
5 Závěr	38
6 Seznam obrázků.....	39
7 Seznam tabulek.....	40
8 Seznam grafů	41
9 Literatura	42
10 Zdroje obrázků, tabulek a grafů.....	47

Zkratky

AGH – anti-human globulinum

AIHA – autoimunitní hemolytická anémie

FN – Fakultní nemocnice

HFA – antigen s vysokou frekvencí výskytu

HON – hemolytické onemocnění novorozence

HTR – hemolytické potransfuzní reakce

Ig – imunoglobulin

KS – krevní skupina

LFA – antigen s nízkou frekvencí výskytu

LISS – roztok o nízké iontové síle

NAT – nepřímý antiglobulinový test

PAT – přímý antiglobulinový test

PCR – polymerázová řetězová reakce

SA – sloupcová aglutinace

TO – Transfuzní oddělení

TP – transfuzní přípravek

1 Úvod

Znalost a studium krevních skupin je nedílnou součástí moderní medicíny, zejména v oblasti transfuzního lékařství a imunohematologie. Objev nových antigenů na krevních buňkách, identifikace klinicky významných antierytrocytových protilátek, rozvoj a automatizace vyšetřovacích metod přispívají ke snížení rizika potransfuzních komplikací.

Teoretická část se věnuje základním pojmům imunohematologie, přehledu hlavních krevních skupinových systémů, principům metod a imunohematologickým vyšetřením, která se provádějí u dárců krve a krevních složek. Screeningové vyšetření antierytrocytových protilátek je důležité pro případné odhalení klinicky závažných typů protilátek, které mohou působit nežádoucí hemolytické reakce jako je zkrácené přežívání transfundovaných erytrocytů. Nepravidelné antierytrocytové protilátky se mohou vyskytovat i u dárců krve, např. po těhotenství či po podání krevní transfuze.

Cílem praktické části je zhodnotit záchyt klinicky významných nepravidelných antierytrocytových protilátek u souboru dárců krve a krevních složek Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové v letech 2020–2024 a získané výsledky porovnat s daty dostupnými v literatuře.

2 Teoretická část

2.1 Imunohematologie

Imunohematologie studuje vztah imunitního systému a krve, založený na interakcích antigenů a protilátek. Imunitní systém dokáže rozeznat cizí antigeny a odstranit je například pomocí tvorby protilátek. První poznatky zahrnují objev aglutinace, děje, při kterém červené krvinky jedince reagují se séry jiných osob. Tento obor je důležitý pro správnou diagnostiku, bezpečné transfuze a prevenci potransfuzních komplikací [1].

2.1.1 Základní imunohematologické pojmy

Antigen

Antigen je součástí membrány erythrocytu a může vyvolat imunitní reakci, tzn. tvorbu protilátky, která je produkována osobou, které daný znak chybí. Protilátka se váže na specifické části antigenu (epitopy). Některé antigeny se mohou vyskytovat i v rozpustné formě. Plní řadu funkcí např. udržují tvar erythrocytů, podílí se na transportu látek nebo regulaci komplementu [2]. Většina erythrocytových antigenů patří mezi endogenní antigeny, tzn., že jejich syntéza probíhá v erythrocytech. Z biochemického hlediska se rozeznávají proteinové a sacharidové antigeny [3].

Vzhledem k velkému množství identifikovaných antigenů na erythrocytech byla Mezinárodní společností pro krevní transfuzi zavedena v 90. letech minulého století klasifikace, která je pravidelně rozšiřována. Do roku 2021 je známo celkem 378 erythrocytových antigenů, z toho 345 je zařazeno do 43 krevních skupinových systémů (krevní skupiny), 14 do 5 kolekcí a dále se rozlišují série antigenů s nízkou (LFA) a vysokou frekvencí výskytu v populaci (HFA) [2, 3, 4].

Krevní skupinové systémy (krevní skupiny)

Krevní skupiny zahrnují antigeny, které mají společné vlastnosti, tzn. známou biochemickou strukturu, umístění na chromozomu a identifikovaný gen [3, 4].

Kolekce antigenů

Antigeny, které nesplňují všechna kritéria pro zařazení do krevního skupinového systému, jsou řazeny do kolekcí. Patří zde sérologicky nebo geneticky podobné antigeny, jedná se o příbuzné antigeny [2].

Série antigenů

Antigeny, které nelze zařadit do krevního skupinového systému ani do kolekce patří do sérií. Série LFA zahrnují antigeny, které se v populaci vyskytují méně než v 1 % a HFA jsou antigeny s výskytem vyšším než 90 % v populaci [2].

Protilátka

Po kontaktu s cizím antigenem je vyvolána tvorba protilátky. Protilátky (imunoglobuliny) jsou produkty B lymfocytů a jsou součástí specifické imunitní odpovědi. Vyskytují se ve volné formě (např. v plazmě, séru, tělních tekutinách) nebo jako receptory na membránách buněk. Jejich úkolem je neutralizace a eliminace antigenů [4, 5].

Základem protilátky jsou 4 bílkovinné řetězce, 2 lehké označované jako kappa a lambda a 2 těžké, které jsou navzájem propojeny. Tvar molekuly protilátky připomíná písmeno Y, na kterém se rozlišuje Fc fragment (konstantní oblast), který plní efektorovou funkci a je u všech protilátek totožný a Fab fragmenty, které jsou specifické a slouží k vazbě antigenu [6].

V imunohematologii se nejvíce uplatňují protilátky třídy IgM a IgG, popř. IgA. Podle příčiny vzniku se antierycytové protilátky dělí na přirozené, které se vyskytují bez předchozí imunizace erytrocytovým antigenem a imunní, které vznikají následkem imunizace cizorodým erytrocytovým antigenem (např. po podání inkompatibilního transfuzního přípravku, během těhotenství či po transplantaci). Jako přirozené pravidelné protilátky se označují protilátky anti-A a anti-B, všechny ostatní protilátky jsou nepravidelné [3, 6].

IgM jsou většinou řazeny mezi chladové protilátky a obvykle se na erytrocyty navazují při nízkých teplotách (pod 20 °C). Jsou označovány jako kompletní, tzn., umí propojit dva erytrocyty přímo (jsou schopné tzv. přímé aglutinace). Mezi zástupce patří např. protilátky AB0 nebo protilátky Lewis systému [3, 4].

Protilátky třídy IgG jsou většinou tepelné, optimálně reagují při teplotě lidského těla (37 °C) a jsou vždy klinicky významné. Jedná se o nepravidelné antierycytové protilátky, které se dále rozlišují na aloprotilátky a autoprotilátky. Aloprotilátky mohou být příčinou zkráceného přežívání transfundovaných dárcovských erytrocytů. Vzhledem ke své malé struktuře mají schopnost přecházet přes placentární bariéru, navazovat se na fetální erytrocyty a působit jejich hemolýzu a rozvoj hemolytického onemocnění novorozence (HON) [3, 4].

Mezi klinicky nejvýznamnější patří protilátky např. z Rh, Kell, Kidd nebo Duffy systému [2, 7]. Jsou označovány jako inkompletní, protože propojení dvou erytrocytů dosáhnou až pomocí dodaných faktorů (např. AGH, sérum *antiglobulinum humanum*, které obsahuje složku anti-IgG a/nebo anti-C3d) do reakce (jsou nepřímo aglutinující). Autoprotilátky se v těle nemocného váží na vlastní erytrocyty. Mohou být chladového i tepelného typu a jsou klinicky významné (způsobují např. autoimunitní hemolytickou anémii – AIHA). U dárců krve, těhotných žen i pacientů se provádí screeningové vyšetření s cílem zachytit a identifikovat klinicky významné nepravidelné aloprotilátky [8, 9].

Aglutinace

Aglutinace (hemaglutinace) je děj při kterém dochází ke shlukování erytrocytů a probíhá ve dvou fázích. Nejdříve dochází k vazbě protilátky na erytrocyt (tzv. senzibilizaci) a pokud je protilátka schopna překlenout vzdálenost mezi dvěma sousedními erytrocyty, dochází k jejich propojení a vzniku shluku (vlastní aglutinace). Druhou fází lze laboratorně ovlivnit např. použitím AGH séra, roztoku o nízké iontové síle, nastavením optimální teploty a doby inkubace, upravením pH, centrifugací či použitím enzymů [3, 4, 10].

2.2 Krevní skupinové systémy

Historie krevních skupin je velmi bohatá. V roce 1901 rozdělil rakouský lékař Karl Landsteiner krev do tří skupin (0, A, B). Objevil, že člověk může mít na erythrocytech antigeny a v plazmě protilátky v takové kombinaci, aby nedocházelo k jejich vzájemné reakci. Toto Landsteinerovo pravidlo, je základem určování krevních skupin. Dále se tomuto lékaři ve spolupráci s A. Wienerem podařilo objasnit význam krevního faktoru Rh (dnes označovaný jako D antigen). V roce 1907 zveřejnil český psychiatr Jan Jánský výzkum potvrzující existenci čtyř krevních skupin, dnes označovaných jako 0, A, B, a AB, za což byl Americkou lékařskou komisí označen jako objevitel typů krevních skupin. Bohužel roku 1930 byla za tento objev udělena Nobelova cena K. Landsteinerovi [11, 12].

Mezi nejdůležitější a klinicky nejvýznamnější krevní skupinové systémy patří AB0, Rh a Kell systém [2, 7].

2.2.1 AB0 systém

AB0 systém je nejvýznamnějším krevně skupinovým systémem a nachází se na 9. chromozomu. Zahrnuje geny A, B a H (0). Alely A a B jsou kodominantní, alela 0 je recesivní a prosadí se pouze v homozygotní formě 00. Každý jedinec dědí jednu alelu od otce a jednu alelu od matky. Otec i matka mohou být homozygoti: A/A, B/B, 0/0 nebo heterozygoti: A/0, B/0, A/B. Existuje 6 genotypů: AA, A0, BB, B0, AB a 0 a 4 fenotypy: A, B, AB, 0 [13].

Podle přítomnosti antigenů (aglutinogenů) na povrchu membrány erythrocytů se rozlišují čtyři základní krevní skupiny A, B, AB a 0. Strukturou se jedná o oligosacharidy, které se váží na lipidovou nebo proteinovou část membrány a vytvářejí glykolipid nebo glykoprotein. AB0 systém je jediný krevní systém, u kterého jsou v plazmě / séru každého jedince přítomny přirozené pravidelné protilátky (aglutininy, anti-A, anti-B) proti antigenu, který se nenachází na jeho erythrocytech (viz Tabulka 1) [1, 2, 13].

Gen H je základem pro vznik H antigenu, který se nachází na membráně všech erythrocytů, je kódován na 19. chromozomu a vzniká navázáním L-fukózy na tzv. prekurzorový řetězec. Jedinec s krevní skupinou 0 má na svých erythrocytech pouze H antigen a v plazmě anti-A a anti-B protilátky [13, 14].

Antigen A vzniká po navázání N-acetylgalaktosaminu na galaktózu H antigenu. Jedinci s krevní skupinou A mají na povrchu erythrocytů A antigen a v plazmě anti-B protilátky [13, 14].

Antigen B vzniká navázáním D-galaktózy ke galaktóze H antigenu. Jedinci s krevní skupinou B mají na povrchu svých erytrocytů B antigen a v plazmě anti-A protilátky [13, 14].

Jedinci s krevní skupinou AB mají na erytrocytech antigeny A, B i H a v plazmě nemají žádné protilátky [13, 14].

V ABO systému se podle množství antigenů na membráně erytrocytu rozlišují podskupiny (u fenotypů A i B). Nejčastější jsou podskupiny A₁ a A₂ a vznikají aktivitou transferáz. V praxi se běžně u dárců krve ani u pacientů nevyšetřují [3, 13, 15].

Tabulka 1 - Základní dělení skupin ABO systému

ABO skupina	Antigeny na erytrocytech	Protilátky v plazmě	Genotyp
0	žádné	anti-A, -A ₁ , -B, -A, B	0/0
A	A (+A ₁)	anti-B	A/A a A/0
B	B	anti-A, A ₁	B/B a B/0
AB	A + B, A, B (+A ₁)	žádné	A/B

Upraveno podle: Masopust a Písačka, 2022

2.2.2 Rh systém

Rh systém je vysoce komplexní a polymorfní krevní skupinový systém. Skládá se z velkého množství antigenů, které jsou kódovány RHD a RHCE geny. Nejvýznamnější antigeny D, C, c, E, e jsou velmi imunogenní a mohou způsobovat hemolytické potransfuzní reakce (HTR) či hemolytické onemocnění novorozenců (HON) [13].

Nejdůležitější a nejvíce imunogenní je D antigen. Osoby, u nichž se tento antigen na membráně červených krvinek nachází, jsou označovány jako RhD pozitivní a jedná se o většinu kavkazské populace. Jedinci, kteří na svých erytrocytech tento antigen nemají, se označují jako RhD negativní. V případě podání RhD pozitivního transfuzního přípravku RhD negativnímu příjemci může dojít k rozvoji potransfuzní reakce a tvorbě anti-D protilátek. Podobný problém může nastat v případě RhD negativní matky nesoucí RhD+ plod. Anti-D protilátky matky mohou procházet přes placentu a vázat se na erytrocyty plodu a způsobovat jejich předčasný zánik. V těchto případech by měla být všem RhD negativním ženám během těhotenství preventivně podávána anti-D profylaxe (anti-D protilátka), která zničí RhD+ erytrocyty plodu, které pronikly do systému matky, dříve, než začne reagovat matčin imunitní systém [16, 17].

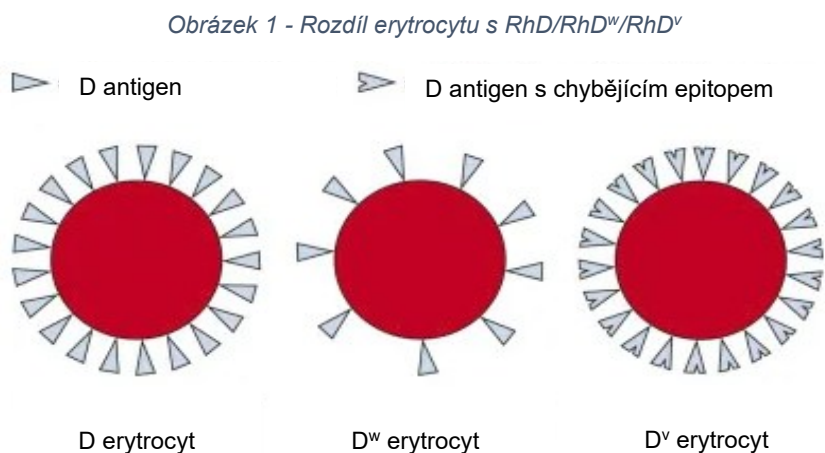
U některých osob může docházet k mutacím či rekombinacím RHD genu a vzniku nových forem D antigenu, např. slabý D weak (D^w) a variantní D (D^v) antigen. Vyšetřování

těchto zvláštních forem má význam u dárců krve / krevních složek z důvodu správného označení vyrobeného erytrocytového transfuzního přípravku a u těhotných žen z hlediska podání anti-D profylaxe [17, 18].

D^w antigen je na povrchu membrány erytrocytů zastoupený v redukovaném množství, jedná se o kvantitativní změnu. Jedinec s laboratorně potvrzeným D^w antigenem je označen jako RhD+ a v případě nutnosti podání transfuze může dostat RhD pozitivní transfuzní přípravek [18, 19].

D^v antigen má změněn jeden či více epitopů nebo některé epitopy úplně chybí a vzniká nový protein, jedná se o kvalitativní změnu. Jedinci s laboratorně potvrzeným D^v antigenem musí dostat RhD negativní transfuzní přípravek v případě nutnosti podání transfuze, protože u nich hrozí riziko imunizace po podání RhD pozitivní krve. Jedná-li se o dárce krve s D^v antigenem je jeho vyrobený erytrocytový transfuzní přípravek označen jako RhD pozitivní. U těhotných žen s D^v antigenem se doporučuje během těhotenství preventivně podat anti-D profylaxi [18, 19].

Rozdíly mezi erytrocyty s normálním D antigenem, s variantou D antigenu (D^v) a se slabým antigenem D (D^w) znázorňuje Obrázek 1.



Upraveno podle: *Obgyn Key*, 2017

Antigeny C, c, E, e jsou kódovány RHCE genem a tvoří alelické páry. Nejvíce jsou v kavkazské populaci zastoupeny antigeny e 98 %, c 81 %, C 68 % a nejméně E 29 %. Určení Rh fenotypu, tzn. antigenů C, c, E, e, C^w se provádí u všech prvdárců z důvodu správného označení vyrobeného transfuzního přípravku [13, 20].

Protilátky Rh systému se většinou vytvářejí následkem imunizace např. během těhotenství nebo po podání transfuze. Jsou klinicky významné, imunní a mohou působit HTR i HON. Vyšetřují se pomocí nepřímého antiglobulinového testu (NAT) nebo enzymového testu, ve kterém vykazují zesílenou reakci. Mezi zástupce patří např. anti-D, anti-c či anti-E, anti-e, anti-C a anti-C^w, hojně zastoupená u české populace [3].

2.2.3 Kell systém

Krevní skupinový systém Kell je po AB0 a Rh systému dalším velmi imunogenním krevně skupinovým systémem. Mezi nejdůležitější antigeny patří K (Kell), k (Cellano), Kp^a (Penny), Kp^b (Rautenberg), Js^a (Sutter), Js^b (Mathews). Nejčastěji se v kavkazské populaci vyskytuje antigen k (s frekvencí 91 %), zatím co antigen K, pouze u 9 %. Z důvodu vysoké imunogenicity K antigenu, je důležité, aby Kell negativní dívky a ženy ve fertilním věku dostávaly v případě nutnosti podání transfuze dárcovské erythrocyty bez odpovídajícího antigenu [14, 21].

Kell protilátky patří do třídy IgG, jsou vysoce imunogenní a klinicky významné a mohou působit HON a HTR [14, 21].

2.3 Imunohematologická vyšetření u dárců krve a krevních složek

Závazná imunohematologická vyšetření dárců krve a jejích složek stanovuje vyhláška č. 143/2008 Sb., jedná se o určení krevní skupiny AB0, RhD a screening nepravidelných protilátek proti erytrocytům. U každého dárce plné krve se stanoví Rh fenotyp (C, c, E, e, C^w) a antigen Kell. V případě nálezu Kell positivity se vyšetřuje antigen Cellano. Vyšetření se provádějí při každém odběru a tvoří součást kritérií pro propuštění transfuzních přípravků pro léčebné použití [3, 22].

K testování se používá vzorek nesrážlivé krve odebraný do zkumavky s protisrážlivým činidlem (EDTA). Vyšetření probíhá v sériích v plně automatických analyzátoch. Principem je reakce antigenu a protilátky, tzn. přímá či nepřímá aglutinace. V současnosti jsou nepoužívanějšími metodami sloupcová aglutinace (SA) a systém pevné fáze [3, 22].

2.3.1 Vyšetření krevních skupin AB0 a RhD

Určení krevní skupiny zahrnuje stanovení antigenů (aglutinogenů) a antigenu D, které jsou přítomny na erytrocytech pomocí monoklonálních diagnostických antisér anti-A, anti-B, anti-AB a anti-D a detekci přirozených pravidelných protilátek (aglutininů) v plazmě pomocí diagnostických erytrocytů 0, A₁, B. Pokud jsou v plazmě (vyšetřované / v diagnostickém antiséru) přítomny protilátky, dojde k jejich navázání na erytrocyty (diagnostické / vyšetřované), propojení a viditelnému shlukování krvinek (přímá aglutinace). Toto vyšetření je klíčové pro správné označení a použití vyrobeného transfuzního přípravku [3, 23, 24].

U prvodárců se vyšetření provádí dvakrát ze dvou nezávislých vzorků a zahrnuje vyšetření aglutinogenů i aglutininů, které si musí odpovídat. Prvním vzorkem je zkumavka nesrážlivé krve odebraná před odběrem a druhým může být krev odebraná z přídatného vaku odběrové soupravy nebo ze segmentu transfuzního přípravku. RhD antigen se vyšetřuje dvakrát pomocí různých klonů diagnostických sér anti-D třídy IgM metodou přímé aglutinace. K případnému odhalení falešně pozitivních výsledků se používá Rh kontrolní sérum, které anti-D protilátku neobsahuje. U všech prvodárců s výsledkem RhD negativní se přešetřuje ev. přítomnost D^{wv} (metodou NAT) pomocí dvou diagnostických sér anti-D třídy IgG odlišných klonů, která detekují variantu D^{vi}. Možné výsledky jsou znázorněny v Tabulce 2 [3, 23, 24].

Zeslabené, nejednoznačné či pozitivní reakce s jedním nebo oběma anti-D séry značí pravděpodobnou přítomnost D^{w/v}. Pokud je to možné, je vzorek přešetřen pomocí PCR a zjištěný typ D^w či D^v je zapsán k dárci do laboratorního informačního systému i na identifikační štítek transfuzního přípravku [3, 23].

Tabulka 2 - Stanovení D^{w/v} u nových dárců krve

	Dárce	Transfuzní přípravek
S oběma dg. séry pozitivní	D ^{w/v}	RhD pozitivní
S oběma dg. séry negativní	RhD negativní	RhD negativní
1 dg. sérum poz. 1 dg. sérum neg.	D ^{w/v}	RhD pozitivní

Upraveno podle: Masopust a Písačka, 2022

U opakovaných dárců se provádí ověření KS, tzn. antigenů AB0 a D antigenu. Výsledek se kontroluje s předchozími záznamy v databázi laboratorního informačního systému [3, 23, 24].

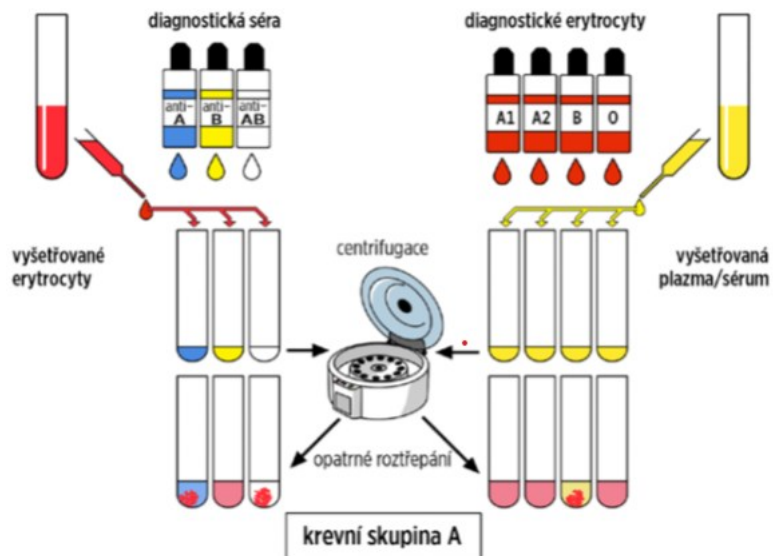
Při vyšetřování je důležité používat kontroly (pozitivní a negativní), které napomáhají předcházet vydávání nesprávných výsledků. U manuálně prováděných testů jsou zařazovány v rámci denní kontroly diagnostik nebo při změně šarže diagnostik. U testů prováděných na automatických analyzátoch jsou prováděny dle doporučení výrobce [23].

Existují různá provedení přímé aglutinace. Vlivem rozvoje automatizace se vyšetřování provádí v sériích na mikrotitrační desce nebo metodou sloupcové aglutinace (SA). Zkumavková metoda se používá výjimečně. Nepřímý antiglobulinový test (NAT) se provádí metodou pevné fáze či SA [3, 24].

Zkumavkový test

Zkumavkový test není již v rutinní praxi rutinně používán, ale může sloužit např. k rychlému přešetření krevní skupiny. Provádí se ve dvou řadách zkumavek (viz Obrázek 2), v přední řadě se vyšetřují aglutinogeny na erythrocytech pomocí diagnostických antisér a v zadní řadě aglutininy v plazmě pomocí diagnostických krvinek. Z vyšetřovaných erythrocytů se připraví tzv. náplav ve fyziologickém roztoku. Následuje centrifugace, roztřepání sedimentu, odečet a vyhodnocení pozitivních reakcí (aglutinací). Výsledky se odečítají makroskopicky okem, hodnocení reakcí se provádí na tzv. kříže [3, 24].

Obrázek 2 - Zkumavkový test

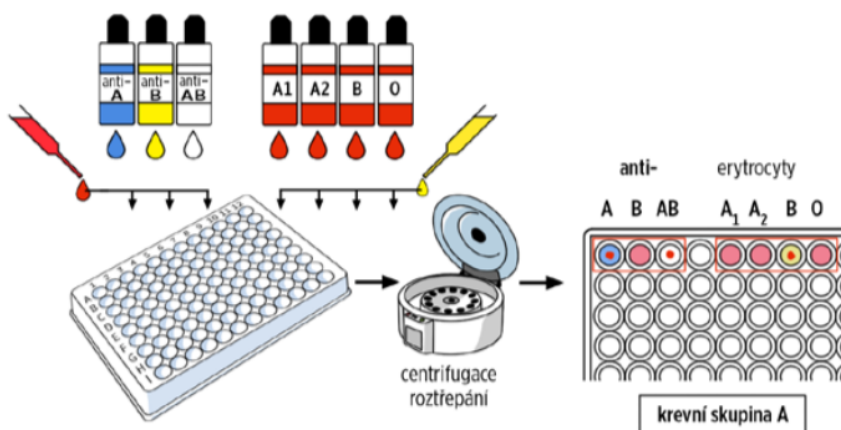


Zdroj: Masopust a Písačka, 2022

Aglutinace na mikrotitrační desce

Vyšetření se provádí v jamkách desky (viz Obrázek 3). Používají se známá diagnostická séra, ke kterým se přikapává náplav krvinek dárce (připravený v roztoku o nízké iontové síle, LISS) a diagnostické krvinky s navázanými antigeny, které reagují s vyšetřovanou plazmou. Pozitivní reakce, tzn. vazba antigenu s protilátkou je viditelná jako terčik na dně jamky a v případě negativní reakce je celá jamka zbarvena homogenně. Reakce se hodnotí automaticky pomocí čtečky v přístroji [3, 24].

Obrázek 3 - Aglutinace na mikrotitrační desčičce

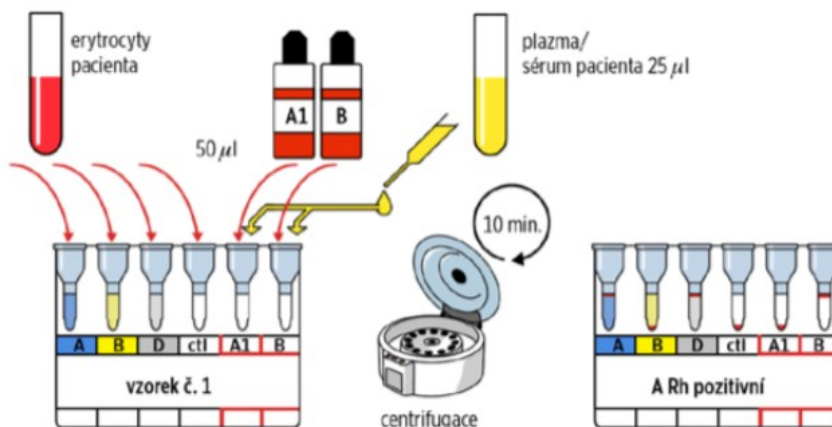


Zdroj: Masopust a Písačka, 2022

Metoda sloupcové aglutinace

Výhodou metody sloupcové aglutinace v gelu (viz Obrázek 4) je rychlost, jednoduchost provedení a možnost automatizace. Testování se provádí v mikrozkuvkách, které jsou naplněny gelem a umístěny v plastové kartě. K vyšetřování (antigenů, protilátek) lze zvolit různé typy gelu (neutrální, s předkapanými diagnostickými antiséry). Z vyšetřovaných erytrocytů se připravuje náplav v roztoku o nízké iontové síle (LISS), který se pipetuje do jednotlivých mikrozkuvek. Při vyšetřování aglutininů se do gelu kape vyšetřovaná plazma a známé diagnostické krvinky. Po inkubaci následuje centrifugace. Nenavázané volné erytrocyty prochází gelem na dno mikrozkuvky a reakce se označuje jako negativní. V případě pozitivní reakce, dochází k vazbě protilátek s antigeny krvinek a zachycení aglutinátu v horní části či uvnitř mikrozkuvky. Reakce se hodnotí semikvantitativně čtečkou na tzv. křížce [3, 24].

Obrázek 4 - Sloupcová aglutinace



Zdroj: Masopust a Písačka, 2022

2.3.2 Vyšetření Rh (C, c, E, e, C^w) a Kell fenotypu

U prvodárců se stanovení fenotypu, tzn. určení antigenů C, c, E, e, C^w a K na erythrocytech provádí metodou přímé aglutinace ze dvou nezávislých vzorků (popř. může být ověření provedeno při dalším odběru). Používají se diagnostická séra anti-C, anti-c, anti-E, anti-e, anti-C^w a anti-K. V případě pozitivního výsledku antigenu K je vyšetřena ev. přítomnost antigenu k. Fenotyp je uveden na štítku vyrobeného transfuzního přípravku [25].

2.3.3 Screening nepravidelných protilátek proti erytrocytům

Za nejcitlivější metodu pro zachycení a identifikaci nepravidelných antierytrocytových protilátek je považován NAT. Existují různé možnosti jeho provedení, v současné době se nejvíce používá metoda pevné fáze a SA [4].

Nepřímý antiglobulinový test (NAT)

NAT detekuje klinicky významné nepravidelné antierytrocytové protilátky (IgG) volně přítomné v séru / plazmě. K vyšetřované plazmě / séru se přidají diagnostické erytrocyty, na které se během inkubace (*in vitro*) váží přítomné IgG (a / nebo složky komplementu), promytím se odstraní plazmatické bílkoviny a přidá se AGH (polyspecifické), které se připojí na IgG navázané na diagnostických erytrocytech, vytvoří přemostění a umožní přiblížení a aglutinaci erytrocytů [3, 4].

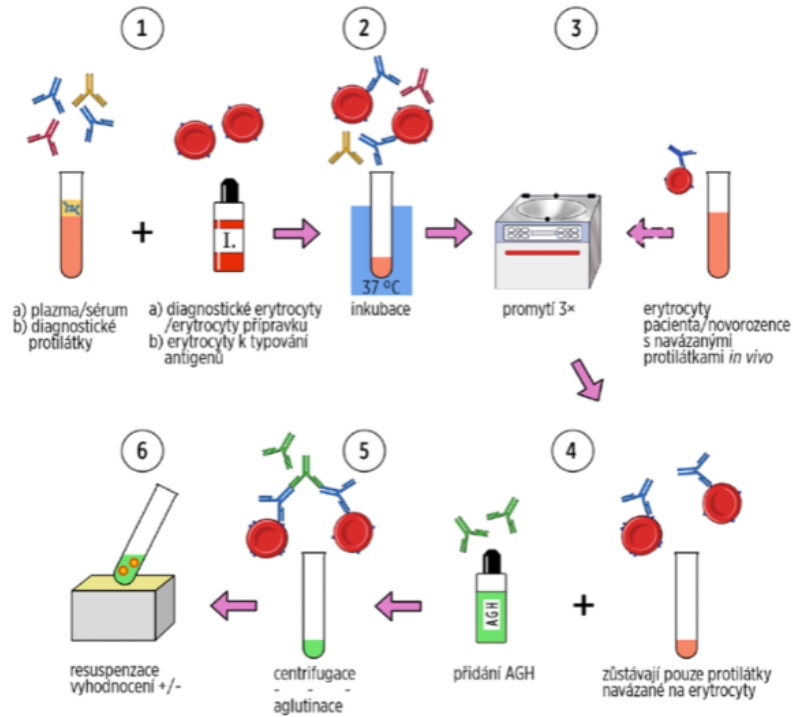
Při vyšetřování dárců krve / krevních složek se používají panely diagnostických erytrocytů ve směsi (tzv. poolované). Diagnostické krvinky obsahují většinu klinicky významných antigenů (C, C^W, c, D, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, M, N, Le^a) [3, 24, 26].

Je-li screeningovým vyšetřením zachycena protilátka, určí se její specifita pomocí základního, ev. doplňujícího identifikačního panelu diagnostických erytrocytů. Poté se provede (pro kontrolu) stanovení příslušného skupinového systému na erytrocytech vyšetřovaného vzorku, proti kterému je protilátka namířena. Pokud je u dárce krve potvrzen záchyt klinicky významné protilátky, je vyrobený TP zlikvidován a dárce je trvale vyřazen z dárcovství [27, 28].

Zkumavkový test – NAT (viz Obrázek 5)

Test se v rutinní praxi používá výjimečně. Ve zkumavce reaguje vyšetřovaná plazma s diagnostickými erytrocyty, následuje inkubace a centrifugace. Nevýhodou je nutnost propírání nadbytkem fyziologického roztoku, aby se odstranily nenavázané imunoglobuliny. K sedimentu erytrocytů se přidá AGH a po centrifugaci a protřepání sedimentu se odečítají reakce. Vyhodnocení se provádí na křížce, používá se tzv. master list, ve kterém je uvedeno složení antigenů, které jsou navázány na diagnostických krvinkách [24, 26].

Obrázek 5 - Nepřímý antiglobulinový test – zkumavková metoda

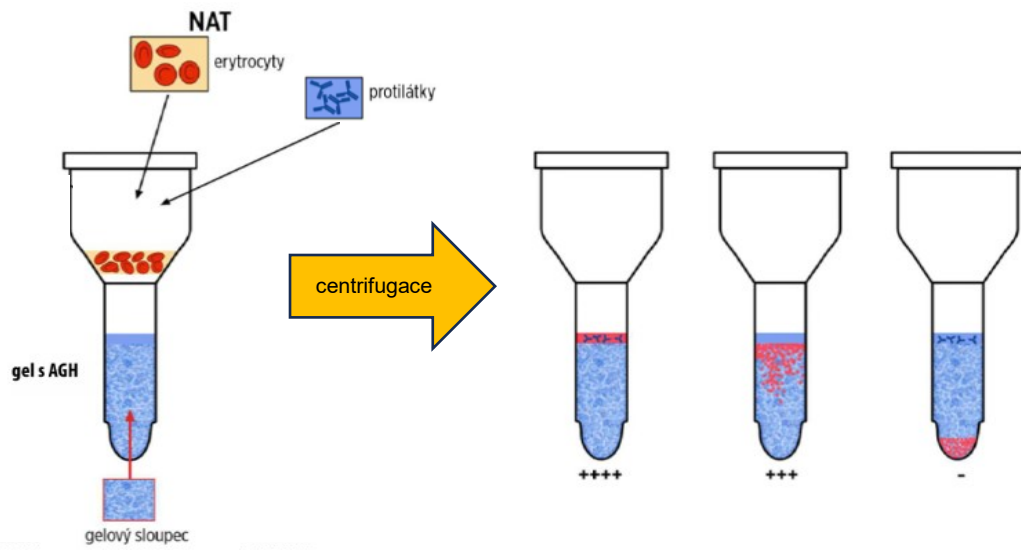


Zdroj: Masopust a Písačka, 2022

Sloupcová aglutinace – NAT (viz Obrázek 6)

K vyšetření se používají diagnostické karty s mikrozkušnicemi, které jsou naplněny gelem s AGH. Do nich se přikapávají diagnostické krvinky a vyšetřovaná plazma. Po inkubaci následuje centrifugace a odečet reakcí. Negativní reakce nastane v případě, že erythrocyty sedimentují na dno zkumavky. Pozitivní reakce se projeví zadržením erythrocytů na povrchu nebo uvnitř gelu a značí přítomnost nepravidelných protilátek. Hodnocení pozitivních reakcí se provádí na tzv. kříže [24, 26].

Obrázek 6 - Nepřímý antiglobulinový test – metoda sloupcové aglutinace

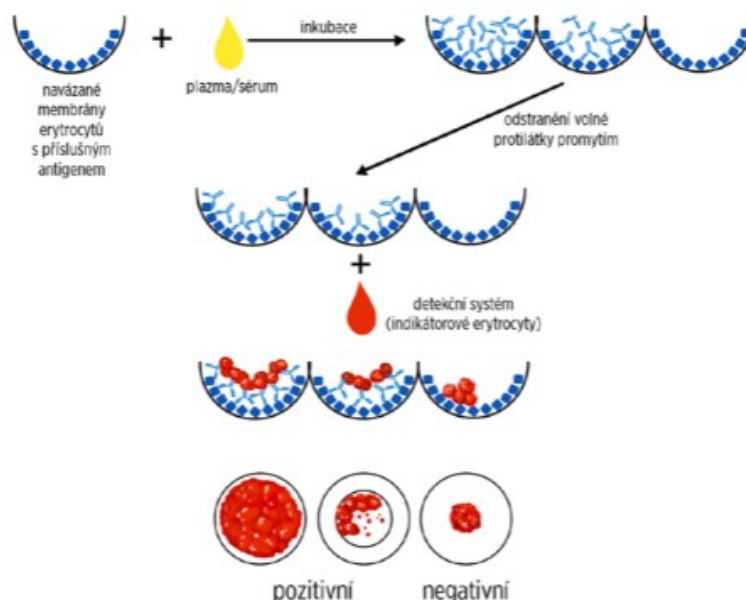


Upraveno podle: Masopust a Písačka, 2022

Metoda pevné fáze – NAT (viz Obrázek 7)

K vyšetření se používají stripy s navázanými lyofilizovanými diagnostickými erythrocyty. Do jamek stripů se přidá vyšetřovaná plazma a LISS roztok. Následuje inkubace a promytí. Pozitivní reakce, tzn. vazba protilátky a antigenu, se zviditelní přidáním indikátorových krvinek (s navázanou sekundární protilátkou anti-IgG). Po centrifugaci je viditelné homogenní zbarvení jamky způsobené zadržením indikátorových krvinek na dně jamky a tvorbou anti-IgG-IgG komplexu. Negativní reakce je viditelná jako terčik uprostřed jamky, způsobený usazením indikátorových krvinek. Hodnocení reakcí probíhá čtečkou přístroje [24, 26].

Obrázek 7 - Nepřímý antiglobulinový test –metoda pevná fáze



Zdroj: Masopust a Písačka, 2022

2.3.4 Další vyšetření

Vyšetření dalších antigenů krevních skupinových systémů

U dárců krve / krevních složek KS 0 je vhodné určit fenotyp i u dalších antigenních systémů (např. Duffy, Kidd, Lewis). Typy antigenů jsou poté uvedeny na štítku vyrobeného erytrocytového TP. Vyšetření má význam pro zajištění kompatibility krevních transfuzí, které jsou určeny polytransfundovaným pacientům, u kterých se v plazmě vyskytují antierytrocytové protilátky často ve směsi. Typování dalších antigenů se provádí pomocí přímé či nepřímé aglutinace metodou pevné fáze, SA, popř. zkušavkovým testem [3, 25].

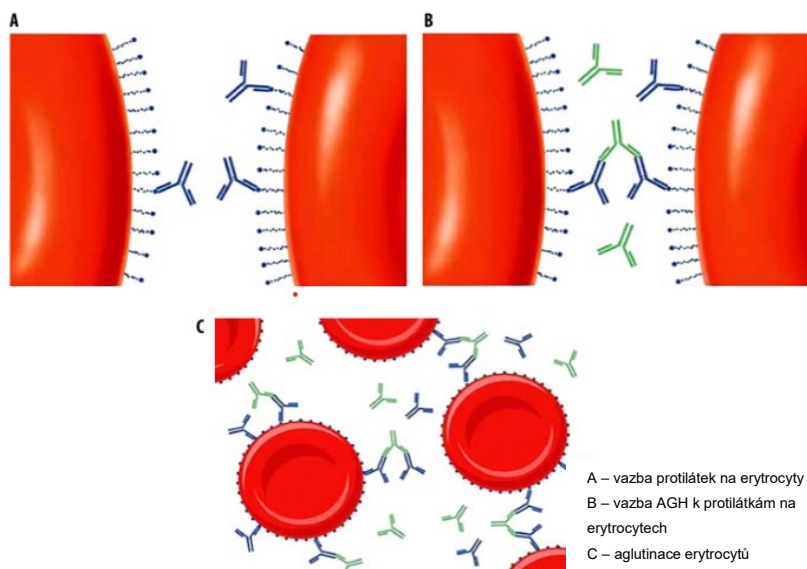
Přímý antiglobulinový test (PAT)

Test slouží k detekci aktivovaného komplementu nebo IgG protilátek, které jsou navázány přímo na erythrocytech vyšetřované osoby *in vivo*, tzn. v krevním řečišti. K náplavu vyšetřovaných erythrocytů se přidá AGH a po centrifugaci se odečítají reakce. Provedení je možné SA, metodou pevné fáze, příp. zkušavkovým testem (viz Obrázek 8) [3, 29].

Tento test se provádí při podezření na HON, autoimunitní hemolytickou anémii či hemolytické potransfuzní reakce. U dárců krve se provádí např. v případě pozitivního výsledku Rh kontroly nebo pokud došlo k pozitivní reakci v rámci předtransfuzního vyšetření. U zdravých osob se může také vyskytnout PAT pozitivita, výsledek je většinou dočasný a nevede k žádným klinickým problémům. Příčinou je např. virová infekce či užívání

některých léků. Dárce je z evidence dárcovství dočasně vyřazen, po určité době je pozván na odběr kontrolního vzorku a přešetřen [30].

Obrázek 8 - Princip přímého antiglobulinového testu



Zdroj: Masopust a Písačka, 2022

Enzymový test

Test je v současné době používán jako doplňující vyšetření, např. v případě identifikace směsi protilátek nebo při vyšetřování protilátek z Rh či Lewis systému. Enzymy (bromelin, papain, ficin) štěpí kyselinu sialovou z povrchu membrány erythrocytů, dochází k odkrytí antigenů a protilátky se mohou snadněji navázat. Test se provádí metodou SA nebo ve zkumavce [31].

Molekulárně genetické metody

V případě diskrepantních a nejasných nálezů při sérologickém vyšetření krevních skupin lze využít molekulárně genetické metody (tzv. genotypování). Principem je PCR, při které dochází k namnožení úseků DNA pomocí enzymu DNA polymerázy a teplotních změn v cyklu. Genotypování umožňuje detekovat tzv. SNP (*single nucleotid polymorfism*) a funguje na principu porovnávání konkrétní sekvence DNA s referenční sekvencí. Existuje řada komerčních souprav (např. microarray, PCR SSP, rt PCR) [3, 32].

3 Praktická část

Cílem praktické části práce je zhodnocení záchytu nepravidelných antierytrocytových protilátek v rámci screeningového vyšetření u dárců krve a jejich složek na TO FN HK v letech 2020–2024.

Dle literárních dat je výskyt antierytrocytových protilátek u dárců krve / krevních složek nízký, prevalence se udává od 0,04 % do 0,4 % [37, 38, 39, 40, 41, 42, 43]. Zdraví jedinci se mohou imunizovat např. v těhotenství nebo podanou transfuzí. Screeningové vyšetření protilátek proti erytrocytům je důležité z hlediska prevence hemolytických potransfuzních reakcí.

Získaná data pocházejí z archivu automatických analyzátorů (Neo Iris, Galileo Neo, firmy Immucor) a z laboratorního informačního systému Imunohematologické laboratoře TO FN HK.

3.1 Metodika screeningového vyšetření antierytrocytových protilátek

Vyšetřování antierytrocytových protilátek u dárců krve / krevních složek se na TO FN HK provádí ze vzorku plazmy na plně automatizovaném přístroji, metodou NAT v systému pevné fáze Capture[®]. V případě pozitivního nebo neinterpretovatelného výsledku se vzorek přešetřuje manuálně pomocí sloupcové aglutinace (SA) na gelových kartách (diagnostický systém DG Gel Coombs, firmy Grifols), metodou NAT. V případě pozitivního výsledku získaného i metodou SA se provede identifikace antierytrocytové protilátky a posouzení klinického významu vzhledem k dárci krve (způsobilost k dalším odběrům) i pacientovi (použití vyrobeného TP) [33].

V přístroji (viz Obrázek 9) probíhá vyšetření v jamkách stripů Capture[®] Ready-Screen[®], jejichž dna jsou výrobcem potažena lyofilizovanými diagnostickými (tzv. směsnými) erytrocyty. Do jamek je přidána vyšetřovaná plazma dárce (25 µl) a LISS roztok (50 µl, který současně slouží jako kontrola, protože obsahuje barvivo, které po přidání plazmy mění barvu z fialové na modrou). LISS je roztok se sníženým obsahem iontů a umožňuje rychlejší vazbu antierytrocytové protilátky na antigen. Následuje inkubace (37 °C po dobu 20 min.) a promytí. Vazba protilátky a antigenu (pozitivní reakce) se zviditelní přidáním indikátorových krvinek (60 µl, s navázanou sekundární anti-IgG protilátkou), tzn., po

centrifugaci jsou indikátorové krvinky zadrženy na dně (homogenní zbarvení jamky) a vytvářejí pevné anti-IgG-IgG komplexy. V opačném případě (negativní reakce) se indikátorové krvinky usadí uprostřed jamky jako viditelný terčik. V každé sérii vyšetření se nasazuje pozitivní a negativní kontrola (25 μ l). Reakce je detekována čtečkou přístroje [33].

V případě pozitivního / neinterpretovatelného výsledku získaného z analyzátoru je screening antierytrocytových protilátek přešetřen SA (metodou NAT). Vyšetření se provádí na gelové kartě (DG Gel Coombs) v mikrozkuvkách naplněných gelem s AGH (viz Obrázek 10). Do čtyř mikrozkuvek se dá kapka (50 μ l) diagnostických krvinek (SeraScan Diana 4) a poté se do všech mikrozkuvek pipetuje 25 μ l vyšetřované plazmy, následuje inkubace (15 min. při 37 °C), centrifugace dle pokynů výrobce a odečet aglutinace pomocí čtečky DG readeru [34].

Následuje určení typu antierytrocytové protilátky (identifikace) použitím základního, ev. doplňujícího identifikačního panelu diagnostických erytrocytů, který obsahuje antigeny krevně skupinových systémů v různých kombinacích. Reakce probíhají v 11 mikrozkuvkách gelové karty (DG Gel Coombs), do kterých se přidává 1 kapka příslušných diagnostických erytrocytů a 2 kapky vyšetřované plazmy, následuje inkubace (15–20 min. při 37 °C), centrifugace a odečet aglutinace. Pomocí master listu, který obsahuje informaci o antigenech navázaných na diagnostických krvinkách, se odečte typ protilátky. Nebo se identifikace provádí na automatickém analyzátoru (metoda pevné fáze) v jamkách dvojstripu Capture Ready-ID® (14 jamek s antigeny, včetně pozitivní a negativní kontroly) a výsledek se odečte čtečkou přístroje a vyhodnocení typu protilátky se provede pomocí master listu [34].

Po určení typu protilátky se pro kontrolu provede určení příslušného skupinového systému na erytrocytech vyšetřovaného vzorku, proti kterému je protilátka namířena [34].

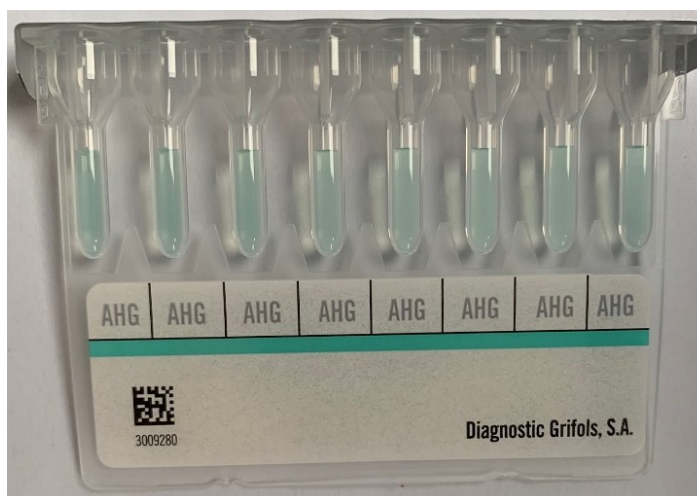
K dárci je v laboratorním informačním systému zaznamenán typ antierytrocytové protilátky. Jestliže je protilátka klinicky významná, je dárci z dárcovství trvale vyřazen a vyrobený TP je zadržen a zlikvidován. V případě zjištění nescifických reakcí, popř. pozitivního PAT je dárci vyřazen dočasně a po určité době je pozván na odběr kontrolního vzorku, a pokud vyšetření vychází negativně, je zařazen do dárcovství zpět [34].

Obrázek 9 - Automatický analyzátor Neo Iris (f. Immucor)



Zdroj: TO FN HK

Obrázek 10 - Gelová karta (DG Gel Coombs)



Zdroj: TO FN HK

3.2 Výsledky

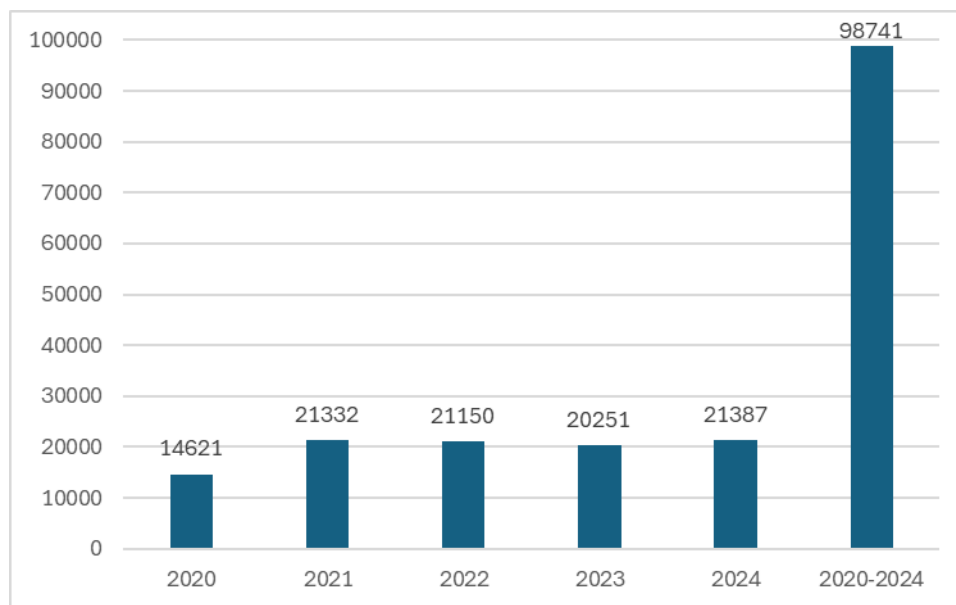
V letech 2020–2024 bylo na automatickém analyzátoru provedeno 98 741 screeningových vyšetření nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve a jejích složek. Nejvíce se testovalo v roce 2024 (21 387) a nejméně v roce 2020 (14 621), což přehledně zobrazuje Tabulka 3 a Graf 1.

Tabulka 3 - Počet provedených screeningových vyšetření nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve a krevních složek na TO FN HK v letech 2020–2024

Rok	Počet vyšetření
2020	14621
2021	21332
2022	21150
2023	20251
2024	21387
2020-2024	98741

Zdroj: Data z TO FN HK

Graf 1 - Počet provedených screeningových vyšetření nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve a krevních složek



Zdroj: Data z TO FN HK

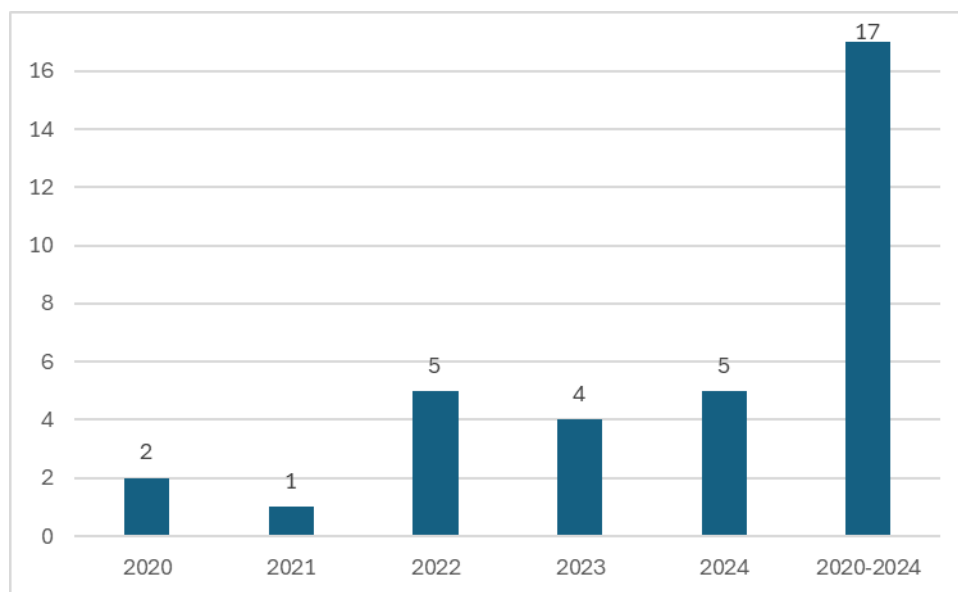
Z celkového počtu 98 741 provedených screeningových vyšetření u dárců krve a krevních složek bylo automatickým analyzátozem zachyceno a metodou SA potvrzeno pouze 17 klinicky významných antierytrocytových protilátek. Nejvíce těchto protilátek bylo identifikováno v roce 2022, 2024 (celkem 5x) a nejméně v roce 2021 (celkem 1x). Počet pozitivních screeningových vyšetření antierytrocytových protilátek za jednotlivé roky je uveden v Tabulce 4 a Grafu 2. Prevalence antierytrocytových protilátek je 0,017 %.

Tabulka 4 - Počet pozitivních screeningových vyšetření antierytrocytových protilátek u dárců krve na TO FN HK v letech 2020-2024

Rok	Počet
2020	2
2021	1
2022	5
2023	4
2024	5
celkem	17

Zdroj: Data z TO FN HK

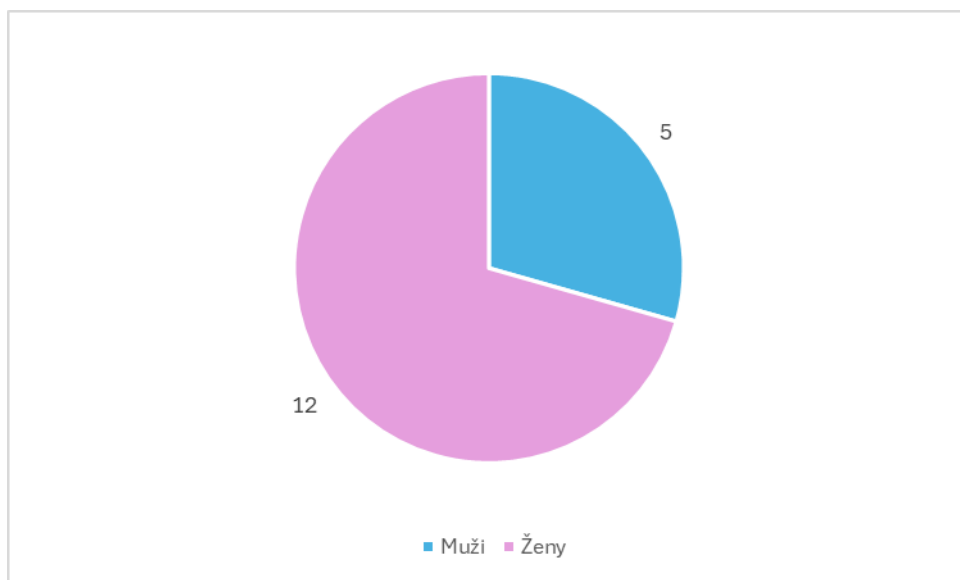
Graf 2 - Počet pozitivních screeningových vyšetření antierytrocytových protilátek u dárců krve na TO FN HK v letech 2020-2024



Zdroj: Data z TO FN HK

Antierytrocytové protilátky byly nalezeny u 12 žen a 5 mužů (viz Graf 3) z čehož vyplývá, že se protilátky častěji vyskytovaly u žen. Počty zachycených klinicky významných antierytrocytových protilátek u mužů a žen za sledované období (2020–2024) jsou uvedeny v Tabulce 5 a Grafu 4.

Graf 3 - Počet zachycených antierytrocytových protilátek u mužů a žen ve sledovaném období (2020–2024)



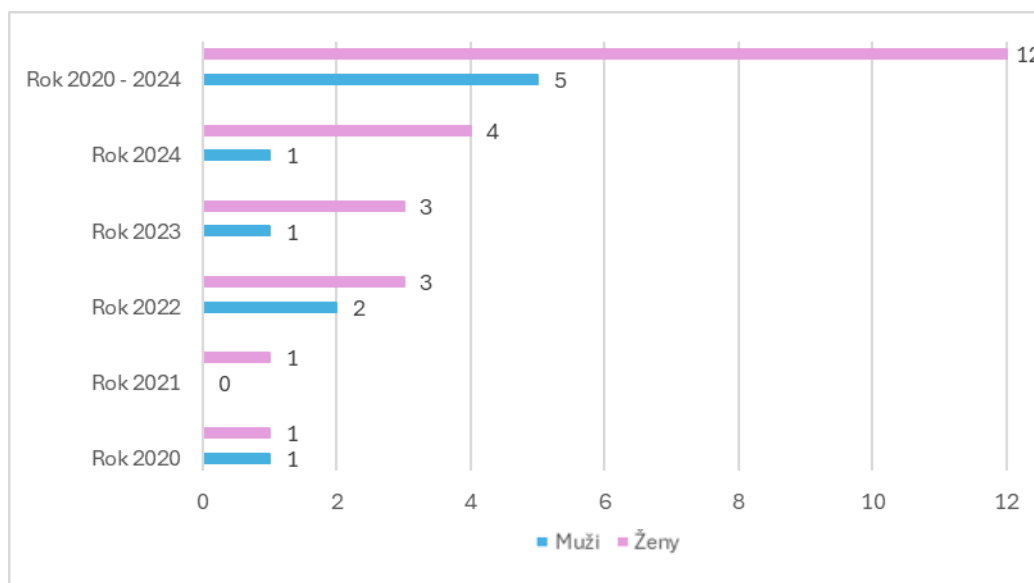
Zdroj: Data z TO FN HK

Tabulka 5 - Počet zachycených antierytrocytových protilátek u mužů a žen v jednotlivých letech

Muži					Ženy				
2020	2021	2022	2023	2024	2020	2021	2022	2023	2024
1	0	2	1	1	1	1	3	3	4
Celkem 5					Celkem 12				

Zdroj: Data z TO FN HK

Graf 4 - Počet zachycených antierytrocytových protilátek u mužů a žen v jednotlivých letech



Zdroj: Data z TO FN HK

Analýza protilátek

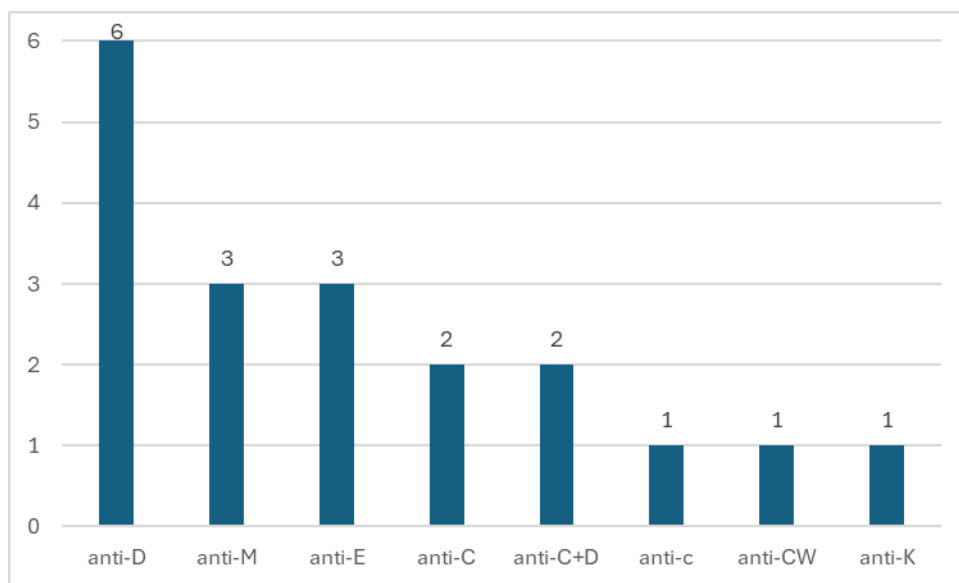
Identifikované antierytrocytové protilátky jsou pro přehlednost rozděleny do krevních skupinových systémů (Rh, Kell a MNSs). Dále je zhodnocen jejich klinický význam, možnost použití vyrobených TP a posouzena způsobilost dárců krve / krevních složek k dalším odběrům. Viz Tabulka 6 a Graf 5.

Tabulka 6 - Četnost zachycených antierytrocytových protilátek u dárců krve

Zachycená antierytrocytová protilátka	Četnost záchytu
anti-D	6x (2x ve směsi anti-C+D)
anti-M	3x
anti-E	3x
anti-C	2x (2x ve směsi anti-C+D)
anti-C+D	2x
anti-c	1x
anti-C^w	1x
anti-K	1x

Zdroj: Data z TO FN HK

Graf 5 - Četnost zachycených antierytrocytových protilátek u dárců krve



Zdroj: Data z TO FN HK

Rh systém

Většina protilátek proti antigenům z Rh systému je imunního typu a vznikají např. v těhotenství nebo po podané transfuzi. Jedná se o klinicky významné protilátky, mohou působit hemolytické potransfuzní reakce (HTR) i hemolytické onemocnění novorozence (HON), díky své struktuře jsou schopny procházet placentou. Nejčastěji jsou třídy IgG, méně často IgM a většinou nevážou komplement. Destrukce erytrocytů těmito protilátkami probíhá působením makrofágů ve slezině a játrech (extravaskulární hemolýza) [19].

Z celkového počtu identifikovaných protilátek byly protilátky z Rh systému ve sledovaném souboru zastoupeny nejvíce, a to ve 12 případech, z toho u 11 žen a u 1 muže.

Nejčastěji zachycenou protilátkou celkově i v rámci tohoto systému byla anti-D protilátka, identifikovaná u 5 žen a 1 muže. Anti-D protilátka je považována za klinicky nejvýznamnější protilátku Rh systému. V případě podání RhD pozitivních erytrocytů RhD negativnímu příjemci, může dojít k jeho imunizaci a vytváření anti-D protilátky. Ve dvou případech u žen došlo k záchytu anti-D protilátky v kombinaci s protilátkou anti-C (anti-C + anti-D). Tyto protilátky se často vyskytují společně. Protilátka anti-C může působit pozdní hemolytické potransfuzní reakce i HON [3].

Dále byla u 3 žen identifikována protilátka anti-E vznikající imunizací, např. po podání transfuze nebo během těhotenství. Tato protilátka může způsobovat HTR i HON, v některých případech se může vyskytovat přirozeně po prodělané infekci [3].

U jedné ženy byla potvrzena přítomnost protilátky anti-c, jedná se o druhou klinicky nejzávažnější protilátku Rh systému. Způsobuje těžké formy HON i HTR [19].

U jedné ženy ze sledovaného souboru byla zachycena protilátka anti-C^w, která vzniká imunizací proti antigenu C^w, např. v důsledku těhotenství nebo podáním transfuze od dárce, který má tento antigen přítomný na povrchu erytrocytů. Tato protilátka může způsobovat lehčí formy HON nebo HTR. I když se antigen C^w nachází pouze u malé části kavkazské populace, je dle literárních dat výskyt této protilátky v České republice častý [3].

Dárci s identifikovanou protilátkou z Rh systému byli z dárcovství trvale vyřazeni a všechny vyrobené TP byly na TO FN HK zadrženy a zlikvidovány.

Kell systém

U jedné ženy ze sledovaného souboru byla zjištěna protilátka anti-K, která je klinicky velmi významná. Po protilátkách AB0 a Rh systému se jedná o nejčastěji se vyskytující a nejvíce imunogenní protilátku. Obvykle bývá třídy IgG, neváže komplement a reaguje při teplotě těla (37 °C). Protilátky Kell systému mohou být i třídy IgM, vyskytující se jako autoprottilátky u lidí prodávající infekci způsobenou *E. coli*, takto vzniklé anti-K protilátky po uzdravení jedince mizí. Protilátka anti-K je namířena proti antigenu K, který se nachází na povrchu erytrocytů u části kavkazské populace (9 %), vzniká např. po transfuzích nebo v těhotenství a způsobuje závažné HON a HTR. Protilátka má schopnost procházet placentou a následně se navazovat na fetální erytrocyty a způsobit jejich hemolýzu i útlum erythropoézy plodu v kostní dřeni. V případě, že plod zdědí po otci antigen K je třeba u těhotných žen s anti-K protilátkou sledovat dynamiku jejího titru během celého těhotenství. Ženám a dívkám ve fertilním věku (Kell negativní) je nutno podávat Kell negativní (kk) erytrocytové TP [3, 35].

Dárkyně s identifikovanou protilátkou anti-Kell byla z dárcovství vyřazena a vyrobené TP byly na TO FN HK zadrženy a zlikvidovány.

MNSs systém

U dvou žen a jednoho muže ze sledovaného souboru byla zjištěna přítomnost protilátky anti-M. Tato protilátka patří do MNSs systému, který je velmi polymorfní. Ve většině případů se jedná o přirozené nepravidelné protilátky třídy IgM chladového typu (optimálně reagují při 4–20 °C) nezpůsobující HTR či HON. V některých případech je možný výskyt nati-M protilátky jako imunní protilátky třídy IgG (reagující při pokojové teplotě a při

37 °C), v těchto případech může působit pozdní hemolytické potransfuzní reakce i HON [3, 36].

Všichni dárci s identifikovanou protilátkou z MNSs systému byli z dárcovství vyřazeni a vyrobené TP byly na TO FN HK zadrženy a zlikvidovány.

Nespecifické reakce

Jako nespecifické reakce se v imunohematologii označují nežádoucí nebo falešně pozitivní výsledky. Tyto reakce mohou nastat z různých důvodů, jako jsou technické komplikace, nesprávná příprava vzorku či přítomnost nežádoucích bílkovin plazmy, které mohou ovlivnit testování. Automatický analyzátor je vyhodnotí jako neinterpretovatelné. Přešetřením těchto vzorků metodou SA je ve většině případů získán negativní výsledek a screening antierytrocytových protilátek je uzavřen jako negativní [3].

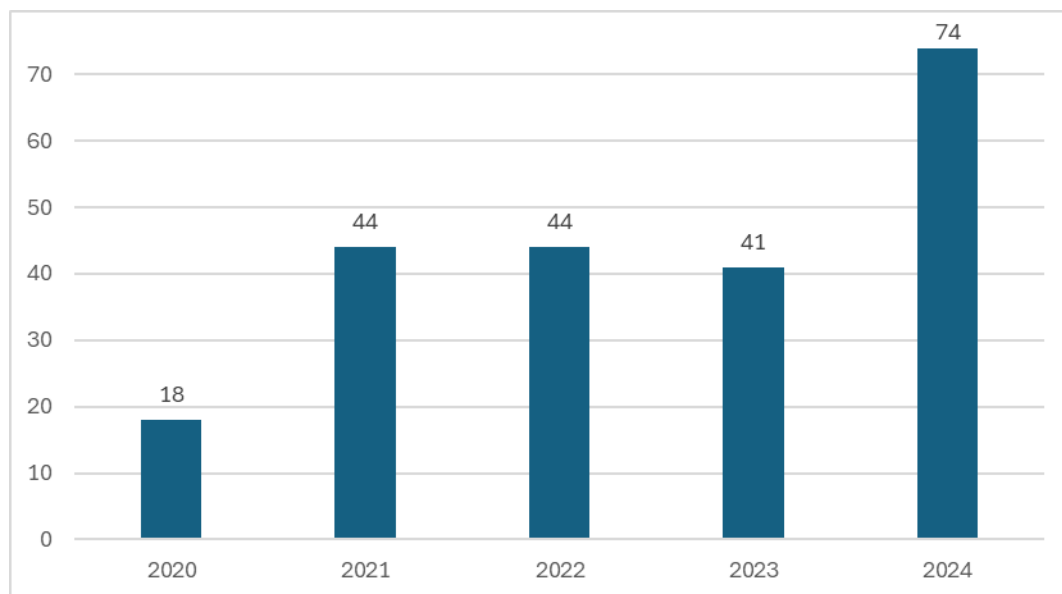
Nejvíce nespecifických reakcí zaznamenal automatický analyzátor v roce 2024, celkem 74 a nejméně v roce 2020, celkem 18. Pro přehlednost jsou výsledky za jednotlivá léta uvedeny v Tabulce 7 a celkové výsledky (muži a ženy dohromady) uvedeny v Grafu 6.

Tabulka 7 - Počty zachycených nespecifických reakcí u mužů a žen v letech 2020-2024

Rok 2020		
Muži	Ženy	Celkem
13	5	18
Rok 2021		
Muži	Ženy	Celkem
28	16	44
Rok 2022		
Muži	Ženy	Celkem
30	14	44
Rok 2023		
Muži	Ženy	Celkem
26	15	41
Rok 2024		
Muži	Ženy	Celkem
44	30	74
Rok 2020–2024		
Muži	Ženy	Celkem
141	80	221

Zdroj: Data z TO FN HK

Graf 6 - Celkový počet zachycených nespecifických reakcí v jednotlivých letech



Zdroj: Data z TO FN HK

4 Diskuse

Screeningové vyšetření antierytrocytových protilátek patří mezi základní imunohematologická vyšetření a provádí se u pacientů v rámci předtransfuzního vyšetření, u těhotných žen a dárců krve a krevních složek. Cílem je zachytit všechny klinicky významné antierytrocytové protilátky, které jsou namířeny proti antigenům na červených krvinkách a mohou způsobovat závažné reakce po podání transfuzních přípravků [3].

Na Transfuzním oddělení FN HK bylo u dárců krve v letech 2020–2024 provedeno celkem 98 741 screeningových vyšetření antierytrocytových protilátek. Nejvíce se testovalo v roce 2024 (21 387) a nejméně v roce 2020 (14 621). Nízký počet provedených vyšetření v roce 2020 byl pravděpodobně způsoben menším počtem dárců z důvodu probíhající covidové pandemie. Jen u 17 dárců byly zachyceny klinicky významné nepravidelné antierytrocytové protilátky. Vyšetřování probíhalo na plně automatickém imunohematologickém analyzátoru na principu NAT metodou pevné fáze. K přešetření a potvrzení pozitivních výsledků byla použita metoda sloupcové aglutinace v gelu. Dle odborných zahraničních analýz se prevalence antierytrocytových protilátek pohybuje mezi 0,04 % - 0,4 % u našeho souboru je to 0,017 %. Rozdílné hodnoty prevalence protilátek proti erytrocytům u dárců krve mohou být způsobeny rozdílnou předchozí imunizací (těhotenství, transfuze), genetickými rozdíly v populaci, způsobem testování a citlivostí použitých metod, věkem či pohlavím dárců [37, 38, 39, 40, 41, 42, 43].

Ve sledovaném souboru byly nejčastěji zachyceny a identifikovány protilátky z Rh systému, které mohou být klinicky velmi závažné. Hlavní příčinou vzniku těchto protilátek je pravděpodobně aloimunizace RhD negativních žen během těhotenství či podání RhD pozitivních transfuzních přípravků RhD negativním jedincům [3, 19]. I v našem souboru byl potvrzen vyšší záchyt antierytrocytových protilátek u žen, což se shoduje s daty většiny publikovaných zahraničních studií [37, 38, 39, 40, 41, 42, 43]. Celkem 6x byla na TO FN HK identifikována protilátka anti-D (5x u žen). Tato protilátka je klinicky nejvýznamnější protilátkou z Rh systému a může působit HON i HTR [19]. Zavedení anti-D profylaxe do klinické praxe vede ke snížení počtu imunizovaných žen. Nicméně k tvorbě protilátek během těhotenství může docházet i z důvodu imunizace matky jinými erytrocytovými antigeny. Vysoký záchyt anti-D protilátky popisují i zahraniční studie [37, 40, 43].

Dále byla ve sledovaném souboru dárců zachycena protilátka anti-C (2x ve směsi anti-C+D), která může působit pozdní HTR i HON [3]. Výskyt této protilátky potvrzuje i zahraniční studie provedená v Indii [41]. Celkem u tří žen byla potvrzena přítomnost protilátky anti-E.

Tato protilátka vzniká nejčastěji imunizací, např. po podání transfuze nebo během těhotenství a může působit HTR i HON. V některých případech se může vyskytovat přirozeně po prodělané infekci [3]. Častý výskyt této protilátky potvrzují i zahraniční studie [37, 40]. Jedenkrát byla zachycena protilátka anti-c a anti-C^w. Anti-c protilátka je klinicky velmi závažná a může působit těžké formy HON i HTR. Protilátka anti-C^w vzniká nejčastěji imunizací, např. během těhotenství nebo podáním transfuze od dárce, který má antigen C^w přítomný na povrchu membrány erytrocytů. Dle odborných studií je výskyt tohoto antigenu pouze u malé části kavkazské populace (2 %), ale v České republice je záchyt anti-C^w protilátky i přesto významný. Tato protilátka může způsobovat lehčí formy HON nebo HTR [3]. Častý záchyt anti-c a anti-C^w u dárců krve popisuje i zahraniční studie [37].

U dvou žen a jednoho muže ze sledovaného souboru byla zjištěna přítomnost protilátky anti-M. Tato protilátka patří mezi chladové protilátky, které nejsou klinicky závažné [3, 36]. Podobný záchyt protilátek z MNSs systému uvádí studie provedené v Indii [37, 39].

U jedné ženy ze sledovaného souboru byla zachycena protilátka anti-K. Po protilátkách z AB0 a Rh systému se jedná o nejčastěji se vyskytující a nejvíce imunogenní protilátku. Obvykle se řadí do třídy IgG, neváže komplement, optimálně reaguje při teplotě těla a má schopnost procházet placentou, navazovat se na fetální erytrocyty a působit útlum erythropoézy v kostní dřeni. Způsobuje závažné HON a HTR [3, 35]. Tato protilátka je namířena proti antigenu K, který se nachází na povrchu erytrocytů pouze u části kavkazské populace (9 %). Kell negativním ženám a dívkám ve fertilním věku je proto nutné podávat Kell negativní erytrocytové TP. Studie z roku 2023 prováděna na území Srbska udává záchyt této protilátky u dárců jako nejčastější [40].

Automatický analyzátor zachytil při screeningovém vyšetření dárců krve četné nespecifické reakce (celkem 221x). Přešetřením těchto vzorků metodou sloupcové aglutinace byly získány negativní výsledky. Důvodem výskytu těchto falešně pozitivních reakcí, mohou být reakce bílkovin plazmy s klinicky nevýznamnými erytrocytovými antigeny přítomnými na indikátorových krvinkách či membránách erytrocytů, které jsou při výrobě imobilizovány na dna stripů. I přes výše uvedenou skutečnost je Capture-R® metoda k vyšetřování vhodná a detekuje všechny klinicky významné protilátky [44].

Všichni dárce s identifikovanými klinicky významnými protilátkami byli z dárcovství vyřazeni a vyrobené TP byly na TO FN HK zadrženy a zlikvidovány.

5 Závěr

Cílem práce bylo zhodnotit záchyt klinicky významných nepravidelných antierytrocytových protilátek u souboru dárců krve a krevních složek Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové v letech 2020–2024. Celkem bylo provedeno 98 741 screeningových vyšetření, 17x byla zachycena a identifikována klinicky významná antierytrocytová protilátka. Nejčastěji se vyskytovaly protilátky z Rh systému (anti-D) a vyšší záchyt byl potvrzen u žen, což je v souladu s daty zahraničních studií. Prevalence antierytrocytových protilátek ve sledovaném souboru dárců byla 0,017 %, tedy nižší, než uvádí odborné studie, což může být způsobeno rozdílnou délkou sledovaného období, počtem dárců i množstvím provedených screeningových vyšetření.

6 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Rozdíl erytrocytu s RhD/RhD ^w /RhD ^v	14
Obrázek 2 - Zkumavkový test.....	18
Obrázek 3 - Aglutinace na mikrotitrační destičce.....	18
Obrázek 4 - Sloupcová aglutinace.....	19
Obrázek 5 - Nepřímý antiglobulinový test – zkumavková metoda.....	21
Obrázek 6 - Nepřímý antiglobulinový test – metoda sloupcové aglutinace	22
Obrázek 7 - Nepřímý antiglobulinový test –metoda pevná fáze	23
Obrázek 8 - Princip přímého antiglobulinového testu.....	24
Obrázek 9 - Automatický analyzátor Neo Iris (f. Immucor).....	27
Obrázek 10 - Gelová karta (DG Gel Coombs)	27

7 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Základní dělení skupin AB0 systému	13
Tabulka 2 - Stanovení D ^{w/v} u nových dárců krve	17
Tabulka 3 - Počet provedených screeningových vyšetření nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve a krevních složek na TO FN HK v letech 2020–2024	28
Tabulka 4 - Počet pozitivních screeningových vyšetření antierytrocytových protilátek u dárců krve na TO FN HK v letech 2020-2024	29
Tabulka 5 - Počet zachycených antierytrocytových protilátek u mužů a žen v jednotlivých letech	30
Tabulka 6 - Četnost zachycených antierytrocytových protilátek u dárců krve.....	31
Tabulka 7 - Počty zachycených nespecifických reakcí u mužů a žen v letech 2020-2024	34

8 Seznam grafů

Graf 1 - Počet provedených screeningových vyšetření nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve a krevních složek.....	28
Graf 2 - Počet pozitivních screeningových vyšetření antierytrocytových protilátek u dárců krve na TO FN HK v letech 2020-2024.....	29
Graf 3 - Počet zachycených antierytrocytových protilátek u mužů a žen ve sledovaném období (2020–2024).....	30
Graf 4 - Počet zachycených antierytrocytových protilátek u mužů a žen v jednotlivých letech	31
Graf 5 - Četnost zachycených antierytrocytových protilátek u dárců krve	32
Graf 6 - Celkový počet zachycených nespecifických reakcí v jednotlivých letech	35

9 Literatura

- [1] Písačka M., Kořínková P., Matějková E., and Bolcková H. T., 'Imunohematologie - historie, současný stav poznání a role ÚHKT', 2012. Accessed: Oct. 25, 2024. [Online]. Available: <https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2012/89/14.pdf>
- [2] Chottová Dvořáková Magdaléna and Mistrová Eliška, *Fyziologie krve a základy imunity*, 1st ed., vol. 110. Praha: Karolinum, 2018.
- [3] Masopust Jiří and Písačka Martin, *Praktická imunohematologie - erytrocyty*, 2nd ed., vol. 448. Praha: Grada, 2022.
- [4] Řeháček Vít, Masopust Jiří, and kolektiv, *Transfuzní lékařství*, vol. 264. Grada, 2012.
- [5] Masarykova univerzita, 'Základy imunohematologie', 2018. Accessed: Oct. 25, 2024. [Online]. Available: <https://is.muni.cz/el/med/jaro2018/MBTS081p/um/Imunohematologie.pdf>
- [6] Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně, 'protilátka (imunoglobulin)', 2024. Accessed: Oct. 25, 2024. [Online]. Available: <https://www.linkos.cz/slovnicek/protilatka-immunoglobulin/>
- [7] Kittnar Otomar and kolektiv, *Lékařská fyziologie*, 2nd ed., vol. 752. Praha: Grada, 2020.
- [8] Barcellini Wilma and Zanella Alberto, 'Chapter 62 - Red Cell Autoantibodies', 2014. Accessed: Feb. 13, 2025. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780444563781000629>
- [9] Chaffin Joe - Blood Bank Guy, 'Autoantibody', Mar. 2016. Accessed: Feb. 13, 2025. [Online]. Available: <https://www.bbguy.org/?s=autoantibodies>
- [10] Velký lékařský slovník, 'aglutinace', 2024. Accessed: Nov. 01, 2024. [Online]. Available: <https://lekarske.slovniky.cz/pojem/aglutinace>
- [11] ČTK, 'Objevitel krevních skupin Landsteiner se narodil před 140 lety', Jun. 2008. Accessed: Oct. 25, 2024. [Online]. Available: <https://www.tribune.cz/zdravotnictvi/objevitel-krevnich-skupin-landsteiner-se-narodil-pred-140-lety/#>
- [12] Florence, 'Jan Janský, objevitel krevních skupin, by oslavil 150 let – jeho objev zachránil spoustu lidských životů', Apr. 2023. Accessed: Oct. 25, 2024. [Online]. Available: <https://www.florence.cz/odborne-clanky/florence-plus/jan-jansky-objevitel-krevnich-skupin-by-oslavil-150-let-jeho-objev-zachranil-spoustu-lidskych-zivotu/>

- [13] Červená G., 'Krevní skupinové systémy erytrocytů, významné antigeny a protilátky', 2024. Accessed: Nov. 15, 2024. [Online]. Available: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KBLV/?path=transfuziologie+i>
- [14] Harmening Denise M., *Modern Blood Banking & Transfusion Practices*, 6th ed., vol. 669. Philadelphia: F. A. Davis Company, 2012.
- [15] IVT IMUNO, 'Krevní skupiny - AB0 systém'. Accessed: Nov. 16, 2024. [Online]. Available: <https://pro.ivtimuno.com/www/stranky/krevni-skupiny-ab0-system>
- [16] Blood and Transplant and Give blood, 'The RH system', Nov. 2024. Accessed: Nov. 19, 2024. [Online]. Available: <https://www.blood.co.uk/why-give-blood/demand-for-different-blood-types/the-rh-system/>
- [17] Česká průmyslová zdravotní pojišťovna, 'Rhesus faktor'. Accessed: Nov. 19, 2024. [Online]. Available: <https://cpzp.cz/clanek/3598-0-Rhesus-faktor.html>
- [18] FONS Příručka laboratorního vyšetření, 'RhD antigen'. Accessed: Nov. 20, 2024. [Online]. Available: <https://stara.cskb.cz/plv/Produkty/00D45B17-6814-4FE5-8492-09CB7338F7DD.html>
- [19] Dean L., 'Blood Groups and Red Cell Antigens Chapter 7The Rh blood group', 2005. Accessed: Feb. 26, 2025. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2269/>
- [20] Masarykova univerzita, 'Krevní skupiny erytrocytů', 2018. Accessed: Nov. 20, 2024. [Online]. Available: https://is.muni.cz/el/med/jaro2018/MBTS081p/um/Krevni_skupiny.pdf
- [21] Dean L., 'Blood Groups and Red Cell Antigens The Kell blood group', 2005. Accessed: Nov. 29, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2270/>
- [22] Válek, 'Vyhláška č. 195/2023 Sb. - Vyhláška o lidské krvi', Jun. 2023. Accessed: Feb. 13, 2025. [Online]. Available: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2023-195?text=vyhl%C3%A1%C5%A1ka+o+lidsk%C3%A9+krvi>
- [23] Masopust J., Písačka M., and Turek P., 'Základní Imunohematologická laboratorní vyšetření červené řady – Obecné zásady a technické postupy, vol. 23, Sep. 2019, Accessed: Dec. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.transfuznispolecnost.cz/media/document/e0cd66d421a31125b19201d1312835dc.pdf>

- [24] Červená G., 'Vyšetřovací metody v imunohematologii I.', 2024. Accessed: Dec. 10, 2024. [Online]. Available: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KBLV/?path=transfuziologie+i>
- [25] Společnost pro transfuzní lékařství, 'Imunohematologická vyšetření dárců krve a krevních složek, Apr. 2012. Accessed: Dec. 20, 2024. [Online]. Available: <https://www.transfuznispolecnost.cz/media/document/18d6f6fe99e5ab0ae2ae275a2d97da60.pdf>
- [26] FONS Příručka laboratorních vyšetření, 'Nepřímý antiglobulinový test, Accessed: Dec. 13, 2024. [Online]. Available: <https://stara.cskb.cz/plv/Produkty/59A3E22A-2227-45B3-B867-3C078F092890.html>
- [27] Penka Miroslav, Tesařová Eva, and kolektiv, *Hematologie a transfuzní lékařství II*, vol. 208. Grada, 2012.
- [28] Ústav hemotologie a krevní transfuze, 'TRANSREG – Národní registr vyřazených dárců krve a registr vzácných erytrocytů', 2013. Accessed: Feb. 04, 2025. [Online]. Available: <https://www.uhkt.cz/gdpr/informace-pro-pacienty-a-darce-2013-registry/informace-pro-darce>
- [29] Fábryová Viera and kolektiv, *Imunohematológia a transfúzna medicína pre prax*, vol. 232. Grada, 2012.
- [30] Vandana Puri, Aruna Chhikara, Geetika Sharma, and Et al., 'Critical evaluation of donor direct antiglobulin test positivity: Implications in cross-matching and lessons learnt', *Department of Pathology, Lady Hardinge Medical College, New Delhi, India*, 2019, Accessed: Feb. 22, 2025. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6580823/>
- [31] FONS Příručka laboratorních vyšetření, 'Enzymový test, Accessed: Dec. 16, 2024. [Online]. Available: <https://stara.cskb.cz/plv/Produkty/A17302A3-44ED-458C-8E47-B5AB8EB3A9EE.html>
- [32] Thermo Fisher Scientific Inc., 'What is Genotyping?' Accessed: Dec. 21, 2024. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/genotyping-analysis-real-time-pcr-information/what-is-genotyping.html>
- [33] Transfuzní oddělení FN HK, 'Vyšetření na analyzátorech Galileo Neo a Neo Iris, Standardní operační postup vyšetřovací TO_SOPV_LAB 301', 2024.

- [34] Transfuzní oddělení FN HK, 'Screening a identifikace nepravidelných antierytrocytových protilátek, Standardní operační postup vyšetřovací TO_SOPV_LAB 105', 2024.
- [35] Maheshwari Ashish, Zubair Muhammad, and Maheshwari Apoorva, 'StatPearls Kell Blood Group System', Oct. 2024. Accessed: Feb. 26, 2025. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK609095/>
- [36] Adkins D. Brian and Booth S. Garrett, 'Transfusion medicine Red blood cell antigens MNS system', Jun. 2024. Accessed: Feb. 27, 2025. [Online]. Available: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/transfusionmedMNSUssystem.html>
- [37] R. K. Luhar, R. J. Shah, and V. Harimoorthy, 'Antibody Screening and Identification in Voluntary Blood Donors – Need of the Hour', *Global Journal of Transfusion Medicine*, 2022, Accessed: Mar. 22, 2025. [Online]. Available: https://journals.lww.com/gjtm/fulltext/2022/07010/antibody_screening_and_identification_in_voluntary.10.aspx
- [38] Laiane da Silva Santos, Sérgio Eduardo Soares Fernandes, Anna Luiza Oliveira Sant'Anna, and Et al., 'Irregular red blood cell antibodies, abnormal hemoglobin and dangerous universal blood donor insights from a public blood center in a Brazilian metropolitan area', Aug. 2024, Accessed: Mar. 22, 2025. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473050224001319>
- [39] Garg Neeraj, Sharma Tanya, and Singh Bharat, 'Prevalence of irregular red blood cell antibodies among healthy blood donors in Delhi population', Apr. 2014, Accessed: Mar. 22, 2025. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24797241/>
- [40] Randjelović Milica, Veličković Ana, Vojinović Jelena, and Et al., 'Prevalence and identification of irregular erythrocyte antibodies in voluntary blood donors in the territory of Southeast Serbia', *Blood Transfusion Institute of Niš, Niš, Serbia; †University Clinical Center of Niš, Pediatric Internal Diseases Clinic, Niš, Serbia; ‡University of Niš, Faculty of Medicine, Niš, Serbia*, 2024, Accessed: Mar. 22, 2025. [Online]. Available: <https://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/0042-8450/2024/0042-84502405293R.pdf>
- [41] Pahuja Sangeeta, Kushwaha Shivani, Sethi Neha, and Et al., 'Screening of blood donors for erythrocyte alloantibodies', 2013, Accessed: Mar. 22, 2025. [Online]. Available: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/1607845412Y.0000000020#abstract>

- [42] Solanki Archana, Ashutosh Singh, and Tulika Chandra, 'Prevalence of red blood cell antibodies in whole blood donors: A single-centre experience in north India', Sep. 2020, Accessed: Mar. 22, 2025. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/346263270_Prevalence_of_red_blood_cell_antibodies_in_whole_blood_donors_A_single-centre_experience_in_north_India
- [43] Pons Sandrine, Poirrier Laurence, Fleuriot Estelle, and Et al., 'Prevalence of red blood cell alloantibodies among blood donors in the French Military Blood Institute: A 10-year retrospective study', Oct. 2023, Accessed: Mar. 22, 2025. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vox.13537>
- [44] Yamada Chisa, Serrano-Rahman Leana, Vasovic Ljiljana V., Mohandas Kala, and Uehlinger Joan, 'Antibody identification using both automated solid-phase red cell adherence assay and a tube polyethylene glycol antiglobulin method', May 2008, Accessed: Apr. 08, 2025. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18482178/>

10 Zdroje obrázků, tabulek a grafů

Obrázky

Obrázek 1 - Obgyn Key, Red Cell Alloimmunization, 2017. [Online].

<https://obgynkey.com/red-cell-alloimmunization/>

Obrázek 2 - Masopust Jiří and Písačka Martin, *Praktická imunohematologie – erytrocyty*, 2nd ed., vol. 448. Praha: Grada, 2022.

Obrázek 3 - Masopust Jiří and Písačka Martin, *Praktická imunohematologie – erytrocyty*, 2nd ed., vol. 448. Praha: Grada, 2022.

Obrázek 4 - Masopust Jiří and Písačka Martin, *Praktická imunohematologie – erytrocyty*, 2nd ed., vol. 448. Praha: Grada, 2022.

Obrázek 5 - Masopust Jiří and Písačka Martin, *Praktická imunohematologie – erytrocyty*, 2nd ed., vol. 448. Praha: Grada, 2022.

Obrázek 6 - Masopust Jiří and Písačka Martin, *Praktická imunohematologie – erytrocyty*, 2nd ed., vol. 448. Praha: Grada, 2022.

Obrázek 7 - Masopust Jiří and Písačka Martin, *Praktická imunohematologie – erytrocyty*, 2nd ed., vol. 448. Praha: Grada, 2022.

Obrázek 8 - Masopust Jiří and Písačka Martin, *Praktická imunohematologie – erytrocyty*, 2nd ed., vol. 448. Praha: Grada, 2022.

Obrázek 9 - Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 'Data SCR nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve 2020-2024', 2020.

Obrázek 10 - Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 'Data SCR nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve 2020-2024', 2020.

Tabulky

Tabulka 1 - Masopust Jiří and Písačka Martin, *Praktická imunohematologie – erytrocyty*, 2nd ed., vol. 448. Praha: Grada, 2022.

Tabulka 2 - Masopust Jiří and Písačka Martin, *Praktická imunohematologie – erytrocyty*, 2nd ed., vol. 448. Praha: Grada, 2022.

Tabulka 3 - Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 'Data SCR nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve 2020-2024', 2020.

Tabulka 4 - Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 'Data SCR nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve 2020-2024', 2020.

Tabulka 5 - Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 'Data SCR nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve 2020-2024', 2020.

Tabulka 6 - Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 'Data SCR nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve 2020-2024', 2020.

Tabulka 7 - Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 'Data SCR nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve 2020-2024', 2020.

Grafy

Graf 1 - Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 'Data SCR nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve 2020-2024', 2020.

Graf 2 - Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 'Data SCR nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve 2020-2024', 2020.

Graf 3 - Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 'Data SCR nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve 2020-2024', 2020.

Graf 4 - Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 'Data SCR nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve 2020-2024', 2020.

Graf 5 - Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 'Data SCR nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve 2020-2024', 2020.

Graf 6 - Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 'Data SCR nepravidelných antierytrocytových protilátek u dárců krve 2020-2024', 2020.