

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**VYŠETŘENÍ ANTIGENU RhD
MOLEKULÁRNĚ GENETICKÝMI METODAMI**

Bc. Dagmar Bakerová

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Vít Řeháček

Konzultantka: Mgr. Kamila Trávníčková

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu primáři MUDr. Vítu Řeháčkovi za pomoc, konzultace, věnovaný čas a odborné rady při psaní diplomové práce. Dále bych také chtěla poděkovat paní konzultantce Mgr. Kamile Trávníčkové a paní Bc. Marcelle Dragůňové za věnovaný čas, ochotu, cenné rady a pomoc s praktickou částí.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 15. 5. 2019

Bc. Dagmar Bakerová

1.OBSAH

1. OBSAH	4
2. ABSTRAKT	6
3. ABSTRACT	7
4. ÚVOD	8
5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	9
6. TEORETICKÁ ČÁST	10
6.1 Imunohematologie erytrocytů	10
6.1.1 Antigeny krevních skupin	10
6.1.2 Protilátky proti antigenům krevních skupin	10
6.1.3 Reakce antigenu s protilátkou	11
6.2 Systémy krevních skupin	12
6.2.1 Terminologie systému krevních skupin	12
6.3 Rh systém (ISBT 004).....	13
6.3.1 Historie.....	13
6.3.2 Názvosloví a klasifikace	14
6.3.3 Molekulární genetika a proteiny Rh systému.....	15
6.3.4 Dědičnost Rh systému.....	18
6.3.5 Funkce komplexu Rh proteinů	19
6.4 RhD antigen	19
6.4.1 Frekvence výskytu	21
6.4.2 RhD negativní fenotyp	22
6.4.3 Atypické a variantní formy RhD antigenu	23
6.5 Antigeny C, c, E, e	30
6.5.1 Složené CE antigeny	31
6.5.2 Antigen V a VS	31
6.5.3 Antigen G	32
6.6 Protilátky Rh systému	32
6.7 Klinický význam Rh systému pro transfuzní lékařství a klinickou praxi	33
6.7.1 Hemolytické potransfuzní reakce.....	34
6.7.2 Hemolytické onemocnění novorozence	34
6.7.3 Autoimunitní hemolytické anémie	35
6.8 Diagnostika RhD antigenu	36
6.8.1 Sérologické metody.....	36
6.8.2 Molekulárně genetické metody	38
7. PRAKTICKÁ ČÁST	44
7.1 Sérologické metody.....	45

7.1.1	Vzorky dárců krve a krevních složek.....	45
7.1.2	Vzorky pacientů a novorozenců.....	45
7.2	Molekulárně genetické metody.....	48
8.	VÝSLEDKY	56
8.1	Soubor výsledků „Dárci krve a krevních složek“	57
8.1.1	Výsledky <i>RHD</i> genotypizace u souboru „Dárci krve a krevních složek“	57
8.1.2	Dárci krve a krevních složek - Muži	58
8.1.3	Dárci krve a krevních složek – Ženy.....	60
8.2	Soubor „Pacienti - pacienti FNHK a těhotné ženy“	61
8.2.2	Pacienti - Muži	64
8.2.3	Pacienti - Ženy	67
9.	DISKUZE	71
10.	ZÁVĚR	74
11.	POUŽITÉ ZKRATKY	75
12.	SEZNAM TABULEK.....	77
13.	SEZNAM OBRÁZKŮ	78
14.	SEZNAM GRAFŮ	78
15.	SEZNAM PŘÍLOH	79
16.	POUŽITÁ LITERATURA	80
	PŘÍLOHY.....	85

2. ABSTRAKT

Autor: Bc. Dagmar Bakerová

Školitel: MUDr. Vít Řeháček

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Název diplomové práce: Vyšetření antigenu RhD molekulárně genetickými metodami

Diplomová práce se zabývá genotypizací slabých a variantních RhD antigenů pomocí molekulárně genetických metod. Hlavním cílem práce je zhodnotit míru zastoupení jednotlivých typů variantních a slabých RhD antigenů u prvodárců krve, pacientů a těhotných žen. Testování probíhalo na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové v období od října 2015 do února 2019. K *RHD* genotypizaci byla použita metoda PCR-SSP pomocí komerčně dodávaných BAGene SSP kitů od firmy BAGene Health Care. Do studie bylo zahrnuto 32 vzorků prvodárců krve ze sledovaného období s cílem určit konkrétní typ RhD antigenu a 188 vzorků pacientů a těhotných žen, u kterých nebylo možné využitím sérologických metod jednoznačně určit RhD antigen. U všech těhotných žen bylo navíc na základě výsledku genotypizace rozhodnuto o nutnosti podání anti-D imunoglobulinu.

Provedená *RHD* genotypizace u všech sérologicky nejasných vzorků umožnila určení konkrétního typu variantního nebo slabého RhD antigenu. V souboru dat prvodárců krve byl slabý RhD antigen detekován v 1,12 % případů z celkového počtu vyšetřených prvodárců krve. V souboru pacientů byl slabý RhD antigen detekován u 0,97 % vzorků a částečný RhD antigen u 0,02 % pacientů z celkového počtu vyšetření za sledované období.

Všechny výsledky genotypizace jsou v závěru práce shrnuty a navzájem graficky porovnány a vyhodnoceny.

Klíčová slova

Rh systém, RhD antigen, vyšetření RhD antigenu, molekulárně genetické metody testování

3. ABSTRACT

Author: Bc. Dagmar Bakerová

Supervisor: MUDr. Vít Řeháček

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Title of diploma thesis: RhD antigen screening by molecular genetic methods

This thesis deals with the genotyping of weak and partial antigens using molecular genetic methods. The main aim is to evaluate the rate of the representation of individual types of variant and weak RhD antigens in first-time blood donors, patients and pregnant women. Testing took place at the Transfusion Department of University Hospital Hradec Králové between October 2015 and February 2019. The PCR-SSP method was used for *RHD* genotyping using commercially supplied BAGene SSP kits from BAGene Health Care. The study includes 32 samples from first-time blood donors in the reference period to determine the specific type of RhD antigen, and 188 samples from patients and pregnant women, for whom serological methods could not be used to unequivocally identify the RhD antigen. For all pregnant women, moreover, the genotyping result was a factor in determining whether to administer anti-D immunoglobulin.

This *RHD* genotyping for all serologically ambiguous samples has made it possible to determine a specific type of partial or weak RhD antigen.

In the donor group, the weak RhD antigen was detected in 1.12 % of cases of the total number of examined blood donors. Among patients, the weak RhD antigen was detected in 0.97 % of the samples and partial RhD antigen in 0.02 % of the patients out of the total number of those examined during the reference period.

All genotyping results have been summarized and graphically compared and evaluated at the conclusion of this thesis.

Keywords

Rh system, RhD antigen, RhD antigen testing, molecular genetic methods

4. ÚVOD

RhD antigen je hlavním antigenem krevního skupinového systému Rh. Z důvodu jeho velké imunogenicity je považován za jeden z klinicky nejvýznamnějších antigenů červených krvinek. Riziko aloimunizace a produkce anti-D protilátky nastává při inkompatibilitě v RhD antigenu mezi dárcem a příjemcem transfuze nebo mezi matkou a dítětem s odlišným RhD. Správná diagnostika RhD antigenu má jednoznačně velký význam při prevenci pozdních potransfuzních reakcí a v neposlední řadě i hemolytických onemocnění novorozence. Antigen RhD se v 1-2 % případů může vyskytovat v atypických formách - slabý RhD antigen (D weak) a částečný RhD antigen (D variant).

O kvantitativní variantě RhD antigenu hovoříme v případě D weak antigenu, který je způsoben bodovou mutací v transmembránové nebo intracelulární části RhD proteinu vedoucí ke vzniku kompletního D antigenu, avšak s redukováným počtem antigenních míst na erytrocytu. V případě kvalitativní varianty stojí za vznikem D variantního antigenu bodová mutace *RHD* genu v extracelulární části proteinu nebo rekombinace genů *RHD* a *RHCE*. Záchyt zastoupení jednotlivých typů slabých a částečných D antigenů je velmi důležitý z pohledu předcházení D imunizace, správného uzavření výsledků vyšetření a následné volby adekvátního transfuzního přípravku. Výsledek RhD vyšetření je také rozhodující při volbě anti-D profylaxe v těhotenství.

Sérologickými technikami lze zachytit atypické formy RhD antigenu, ale již nelze rozlišit, zda se jedná o D weak nebo D variantu. Nicméně, v současné době začínají nacházet v rutinním provozu imunohematologických vyšetřovacích laboratoří uplatnění i molekulárně genetické metody. K *RHD* genotypizaci metodou PCR-SSP jsou indikovány nejasné či diskrepantní sérologické výsledky vyšetření. Zejména se jedná o vzorky dobrovolných prvdárců krve a krevních složek k přesnému označení vyrobených transfuzních přípravků, u těhotných žen z důvodu rozhodnutí o podání anti-D imunoglobulinu a v neposlední řadě k jednoznačnému určení RhD antigenu u pacientů. Procentuálním zastoupením jednotlivých typů slabého D antigenu a variant částečného D antigenu se zabývá tato diplomová práce.

5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Diplomová práce se zabývá statistickým zpracováním retrospektivně získaných dat z vyšetření *RHD* genotypizace metodou PCR-SSP (BAGene Health Care), za účelem zjištění frekvence výskytu jednotlivých RhD weak typů a RhD variant u dárců, pacientů a těhotných žen ve Fakultní nemocnici Hradec Králové.

Cíle práce:

- Určit konkrétní typ a zastoupení jednotlivých typů slabé exprese RhD antigenu.
- Určit konkrétní typ a míru zastoupení variantní exprese RhD antigenu.
- Zhodnotit výskyt slabých a variantních RhD antigenů.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Imunohematologie erytrocytů

6.1.1 Antigeny krevních skupin

Antigen (imunogen) je cizí substance strukturálně se nacházející na membráně krevní buňky, se schopností navodit imunitní odpověď. Z biochemického hlediska se jedná o proteiny, glykoproteiny nebo o terminální sacharidové oblasti glykoproteinů a glykolipidů. Antigen reaguje s produkty specifické imunitní odpovědi neboli protilátkami, které jsou výsledným produktem imunitní reakce imunizované osoby, které daný antigenní znak na membráně erytrocytu chybí. [1]

Schopnost navodit imunitní odpověď (imunogenicita) každého jedince závisí především na strukturální stabilitě molekuly a na dostatečném počtu antigenních determinant neboli epitopů (část antigenu, na kterou se váže protilátka). O imunogenicitě dále rozhoduje délka trvání expozice antigenů, množství podané substance, a také způsob podání antigenů, který může být jak intravenózní, tak subkutánní. [1, 2]

V současné době je na erytrocytu známo více než 340 antigenů, z nichž 308 je zaříděno do 36 systémů krevních skupin, zbývající se řadí do kolekcí a sérií antigenů s nízkou frekvencí výskytu (LFA) nebo vysokou frekvencí výskytu (HFA). [3]

6.1.2 Protilátky proti antigenům krevních skupin

Protilátky jsou glykoproteiny nacházející se v plazmě jako výsledek odpovědi na přítomnost imunogenu, který je schopný navodit imunitní odpověď. Jedná se o imunoglobuliny, které reagují se specifickými antigeny tak, že každá vzniklá protilátka se naváže ke specifické antigenní determinantě na základě jejich vzájemné komplementarity v místech, které jsou označovány jako variabilní domény. Základní funkcí protilátek je odstranit z těla tzv. cizí elementy, přičemž při destrukci erytrocytů protilátkami se uplatňuje aktivace komplementové kaskády s následným uvolněním biologicky aktivních látek s cílem extravaskulární nebo intravaskulární lýzou buněk. [1, 2]

Strukturálně se základní jednotka imunoglobulinu skládá ze dvou identických lehkých a dvou identických těžkých polypeptidových řetězců, které jsou navzájem spojené disulfidickými vazbami a tvoří tak tvar písmene Y. Rozlišujeme pět tříd imunoglobulinů na základě rozdílných aminokyselin v těžkých řetězcích, a to izotypy IgG, IgM, IgA, IgD a IgE. Třidu IgG lze dále rozdělit na 4 podtřídy označované jako IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, přičemž se jednotlivé podtřídy liší schopností vázat komplement. Lehké řetězce se vyskytují ve dvou typech, *lambda* nebo *kappa*. [2]

V imunohematologii mají velmi významné uplatnění protilátky proti erytrocytovým antigenům třídy IgG a IgM a vzácně i IgA. Problematika skupinového systému Rh se týká pouze IgG protilátek, které mají velmi vysoký potenciál způsobit senzibilizaci a následnou destrukci fetálních erytrocytů. Tvoří se v případě inkompatibility mezi matkou a dítětem, a díky své monomerní struktuře jsou schopny procházet placentou (velikost molekuly činí 150 000 Daltonů). Protilátky IgM se při inkompatibilitě v Rh systému netvoří a z důvodu pentamerní struktury molekuly (velikost 900 000 Daltonů) jejich přechod placentou do fetální krve není možný. [1, 2, 29]

Mezi další typy rozdělení protilátek může být i jejich dělení na skupinu aloprotilátek a autoprotilátek, tudíž zda se antigen, proti kterému se protilátka utvořila, nachází či nenachází na erytrocytech daného jedince. V případě autoprotilátek (vlastní protilátky) hovoříme o projevu autoimunity. Na základě optimální teploty, při které se protilátky vážou na antigen, je můžeme rozdělit na tepelné, reagující při tělesné teplotě 37 °C a chladové, které lze při vyšetření detekovat již při pokojových teplotách od 20 do 23 °C. [2]

6.1.3 Reakce antigenu s protilátkou

Protilátky se k antigenům připojují nekovalentními vazbami - uplatňují se vodíkové a hydrofobní vazby, elektrostatické interakce a Van der Waalsovy síly. Vazebné místo protilátky musí být komplementární k danému epitopu antigenu, se kterým následně vytvoří komplex. Tato reakce je reverzibilní a funguje jen na malou vzdálenost antigenu a protilátky. Pro správný výsledek reakce musí být stanoven optimální poměr množství antigenu a protilátek, nastavení optimální teploty reakce, optimální pH, iontová síla prostředí reakce a v neposlední řadě musí být dodržena i doba inkubace, tedy čas potřebný k dosažení rovnováhy mezi molekulami antigenu a protilátky. [2]

6.2 Systémy krevních skupin

Pojem antigen se začal používat v roce 1903 s cílem vytvořit jednotnou nomenklaturu krevních skupinových systémů. Systémem je charakterizován soubor fenotypů definovaných lidskými protilátkami mající společné vlastnosti, mezi něž patří známá biochemická podstata, definovaná chromozomová lokalizace a identifikovaný, sekvenovaný gen. V systému se může nacházet pouze jeden antigen, jak je tomu v případě systému H, nebo také desítky antigenů jako například v případě systému Rh. [4, 5]

Nejprve byly číslovány antigeny prvotně vznikajících systémů, později začaly být číslovány i antigeny s nízkou anebo vysokou frekvencí výskytu, a to až do roku 1988, ve kterém byly založeny kolekce. Pojem kolekce byl zaveden ke sjednocení sérologicky, biochemicky a geneticky příbuzné sady minimálně dvou antigenů, které nesplňují kritéria systému. Antigeny, jež neodpovídají žádným definovaným systémům a kolekcím, jsou zařazeny do sérií. V případě, že je frekvence výskytu daného antigenu menší než 1% v testované populaci (označení LFA), je těmto antigenům přiřazeno číslo 700 - ISBT série 700: LFA. Série 700 v současné době obsahuje více než 20 antigenů. Antigeny s vysokou frekvencí výskytu, kde jejich incidence v testované populaci je vyšší než 90%, jsou umístěny v sérii 901 – ISBT série 901: HFA. [1, 3, 4, 5]

6.2.1 Terminologie systému krevních skupin

Od dob objevení krevní skupiny AB0 v roce 1900 prošla terminologie jednotlivých krevních skupin různými styly pojmenování a jednotlivého značení systémů. V roce 1980 zřídil ISBT (International Society of Blood Transfusion) pracovní skupinu - Working Party, jejímž úkolem byl navrhnout a dodržovat geneticky alfabeticko-numericou terminologii povrchových antigenů erytrocytů z důvodu sjednocení. V zásadě se jedná o povrchové antigeny, které byly sérologicky charakterizovány pomocí specifické protilátky. U všech antigenů označených číslem ISBT musí být prokázáno, že se jedná o znaky zděděné. [4]

Každý antigen patřící do systému krevních skupin je identifikován šesticiferným číslem. První tři číslice představují systém, do kterého antigen spadá (např. 004 pro RH systém), druhá tři čísla představují jeho specifčnost (např. 004002 pro antigen C).

V některých případech je uveden nejprve písemný symbol systému následovaný číslem antigenu (např. RH002 nebo RH2, kdy se nadbytečné nuly nepoužívají).

Fenotypové značení je užíváno k vyjádření výsledků vyšetřených antigenů, kdy se zapíše antigen a dosažený výsledek (pozitivní/negativní, + nebo -), u alelických párů antigenů s odlišením v horním indexu se uplatňuje zkrácený zápis (např. D+C+-c-E-e+). Dle terminologie ISBT jsou fenotypy zastoupeny systémovým symbolem, následně dvojtečkou a seznamem antigenů oddělených čárkami. Antigeny, u kterých se vyšetřením potvrdila jejich absence, předchází znaménko mínus. Alely jsou kurzívou značeny symbolem systému, hvězdičkou a číslem antigenu (např. *RHD*-**-2*). [1, 2]

Genotypy mají rovněž kurzívou psaný systémový písemný symbol, za nímž následuje hvězdička alely nebo haplotypy oddělené lomítkem. V případě absence antigenů daného systému, se zápis nulových fenotypů provádí s označením „null“ (např. Rh-null nebo v podobě Rh₀). [2, 3, 4]

6.3 Rh systém (ISBT 004)

Z transfuzního hlediska je Rh systém nejpolymorfnějším systémem krevních skupin, obsahující 56 klinicky významných antigenů s největší aloimunogenicitou, vyskytujících se pouze na erytrocytech, případně i na jejich prekurzorech. Jednotlivé antigeny jsou označeny čísly RH1 až RH56. Nejzávažnějším problémem při inkompatibilitě v Rh systému je tvorba IgG protilátek, které mají potenciál způsobit velmi těžké, až život ohrožující hemolytické onemocnění novorozence, ale také mají za následek mírné až těžké pozdní hemolytické potransfuzní reakce.

6.3.1 Historie

Krevní skupinový systém Rh byl popsán před více než 60 lety. První zmínka související s Rh systémem byla v roce 1939, kdy došlo k závažné hemolytické potransfuzní reakci u ženy, již byla po porodu mrtvého dítětem transfundována krev jejího manžela. Jak se později ukázalo, v jejím séru byla zjištěna protilátka, se schopností aglutinovat červené krvinky přibližně 85% AB0 kompatibilních jedinců, a to i darované krvinky manžela. Z tohoto důvodu bylo později potvrzeno, že za úmrtím

nenarozeného plodu a potranfuzní reakcí stojí dosud neznámá protilátka reagující s neznámým antigenem červených krvinek. Následující rok provedli dva významní lékaři Karl Landsteiner a Alexander Wiener experiment, ve kterém získali protilátky pomocí imunizace králíků a morčat krvinkami opice *Macacus rhesus*. Protilátka v séru králíků v dalších pokusech aglutinovala jak většinu opičích tak i zhruba 85% lidských erytrocytů, a tentýž rok byla pojmenována anti-Rhesus. Přestože se později ukázalo, že lidská a zvířecí protilátka mají odlišnou specificitu, lidské protilátce zůstalo vžitě, nicméně nesprávné označení anti-Rh, zatímco zvířecí protilátka je označována jako anti-LW. Jedinci, jejichž červené krvinky reagovaly s anti-Rh protilátkou pozitivně, neboli aglutinací, byli označováni jako Rh-pozitivní (Rh+), zatímco jedinci, u nichž k aglutinaci nedošlo, byli označeni jako Rh-negativní (Rh-). Toto původní značení jedinců Rh pozitivní/negativní v dnešní době odpovídá značení přítomnosti antigenu RhD na erytrocytech vyšetřovaných osob, tudíž jsou užívány pojmy RhD pozitivní nebo RhD negativní. [5, 6]

6.3.2 Názvosloví a klasifikace

K popisu antigenů, proteinů a genů Rh systému bylo do dnešní doby vytvořeno několik rozdílných klasifikací. Za základní nomenklaturu se v běžné praxi považuje alfabetská, ve které se antigeny zapisují v pořadí DCE (např. antigen D). Méně často používanou avšak za základní a tradiční se považuje numerická ISBT klasifikace. Mimo to lze Rh systém zapisovat i pomocí dvou historických klasifikací, první z nich je pomocí Fischerova „třígenového“ CDE systému, který popisuje tři páry alel a tím popis celkově 8 možných haplotypů a dále pak Wienerův „faktorový“ RhHr systém. Obě zmíněné klasifikace jsou popsány v tabulce č. 1. [2]

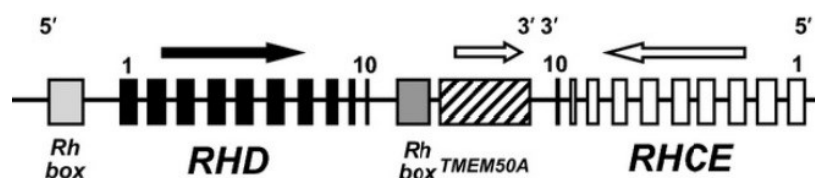
Pokud je v zápisu Rh systému zapsáno malé písmenko „d“, jedná se o zápis RhD-negativního fenotypu (absence D antigenu). Dvě základní formy genu *RHD* a *RHCE* a jejich tři páry alel *D/d*, *C/c* a *E/e* kódují celkově 8 haplotypů - DCE, dce, Dce, dCe, DcE, dcE, DCE a dCE, známější pod kratším zápisem R_1 , r , R_0 , r' , R_2 , r'' , R_z a r^y , a umožňují vznik kombinaci 36 odlišných genotypů. Zápis velkého písmena R se používá, pokud je antigen D exprimován na erytrocytech vyšetřované osoby, v případě zápisu malého písmena r nikoliv. Tento zápis se v praxi transfuzní služby již standartně nepoužívá. V současné době je na transfuzních přípravcích fenotypové označení (např. CC_{ee} K-) a u pacientů se rovněž používá fenotypové značení nebo Fischerův systém. [2]

Tabulka 1: Haplotypy Rh systému (převzato: zdroj č. 3)

Fischerův „trigenový“ CDE systém	Wienerův „faktorový“ Rh/Hr systém	ISBT klasifikace
DCe	R ₁	RH*1,2-3,4,5
DcE	R ₂	RH*1,-2,3,4,5
Dce	R ₀	RH*1,-2,-3,4,5
DCE	R _z	RH*1,2,3,-4,-5
dce	r	RH*-1,-2-3,4,5
dCe	r ^c	RH*-1,2,-3,-4,5
dcE	r ^{cc}	RH*-1,-2,3,4,-5
dCE	r ^y	RH*-1,2,3,-4,-5

6.3.3 Molekulární genetik a proteiny Rh systému

Molekulárním podkladem Rh systému je bigenický lokus zahrnující *RHD* a *RHCE* gen. Tyto navzájem vysoce strukturně homologní geny (93.8%) jsou situovány v tandemovém uspořádání (5'*RHD*3'-3'*RHCE*5') na dlouhém raménku chromozomu 1 v oblasti p34-36. Každý gen obsahuje 10 exonů a celková sekvence DNA činí 75 kilo bází (kb). Vzájemně jsou oba Rh geny odděleny malým genem *SMPI* (Small membrane protein 1), který je mezi nimi rozptýlen v těsné blízkosti 3'konce *RHCE* genu. *RHD* gen je z každé strany ohraničen vysoce homologním segmentem DNA (98,6%) dlouhým 9 kb označovaném jako upstream 5'(přední) a downstream 3'(následný) Rhesus box. [6] Oba geny systému Rh se mohou vzájemně ovlivňovat. V případě, že jsou oba na stejném chromozomu a jeden gen působí na druhý tak, že výsledkem je zvýšení či snížení množství vznikajícího antigenu kódovaného druhým genem, jde o cis efekt. O trans efekt se jedná ve chvíli, pakliže každý z těchto genů leží na jiném homologním chromozomu. Příkladem může být zeslabení antigenu D, jestliže se alela C nachází v pozici trans oproti alele D (Dce/dCe). [2, 7]



Obrázek 1: Schéma struktury RHD a RHCE genu (převzato: zdroj č. 16)

Dalším z genů, jehož přítomností je podmíněná existence Rh systému, je gen *RHAG* kódující RhAG protein (Rh asociovaný glykoprotein). *RHAG* gen nacházející se na chromozomu 6 v oblasti 6p11-p21 sdílí identickou exonovou strukturu spolu s hlavní oblastí sekvenční identity s *RHD/RHCE* geny. [5] RhAG protein byl identifikován v roce 2008 a současně byl systém RHAG zařazen mezi krevně skupinové systémy pod číslem 30 (ISBT 030). Pro expresi Rh polypeptidů je tento protein nezbytný, jelikož Rh proteiny nesoucí Rh antigeny jsou vyjádřeny na povrchu erytrocytové membrány pouze v případě, je-li RhAG protein přítomen. Sekvenční homologie proteinů Rh a RhAG je necelých 40% a společně tvoří takzvaný „Rh komplex proteinové rodiny“. Komplex rodiny Rh proteinů je určen na základě vytvořeného tetramerického komplexu skládajícího se z 2 molekul RhAG proteinu a 2 molekul RhCcEe nebo RhD proteinu stabilizovaného oběma N-koncovými nebo C-koncovými doménami. [5]

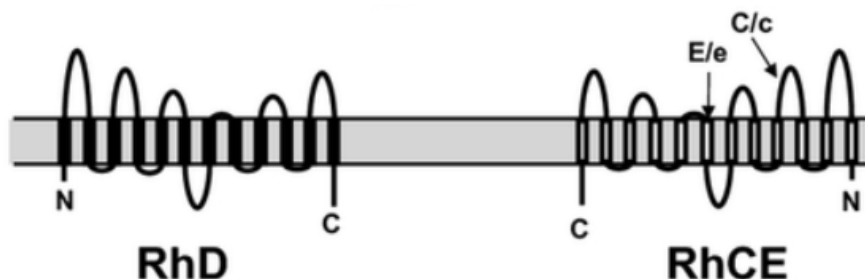
Vyjma Rh a RhAG proteinů se na povrchu membrány erytrocytu nachází i další proteinové struktury, a tím celkový Rh komplex tvoří:

- Rh proteiny nesoucí Rh antigeny
- LW glykoprotein
- Integrin asociovaný protein
- Glykoforin B
- Fy glykoprotein
- Bílkovina pásu 3 neboli anion exchanger (AE1)

Vysoce polymorfní gen *RHD* má za následek tvorbu RhD proteinu. V dnešní době je známo více než 200 *RHD* alel a existence velkého počtu alel je výsledkem velkého množství fenotypových variant antigenu RhD. Převážná část alel je charakterizována jednonukleotidovým polymorfismem označeným jako SNP (single nukleotid polymorphism) nebo jsou prezentovány jako hybridní *RHD/RHCE* alely. Nicméně v mnoha Rh genech lze nalézt bodové mutace, různá přeskupení a výměny mezi a

RHCE geny. Identifikací jednotlivých nukleotidů v obou genech bylo zjištěno, že většina hybridních genů vzniká konverzí obou genů. [6, 8, 9]

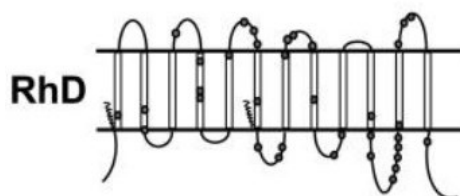
Gen *RHCE* udává vznik RhCcEe proteinu.



Obrázek 2: Schéma membránové exprese RhD a RhCE proteinů (převzato: zdroj č. 16)

Oba geny se navzájem liší 40 nukleotidy, přičemž tato odlišnost vyúsťuje 35 aminokyselinovými substitucemi. [6] Proteiny RhD a RhCE jsou velmi strukturně podobné. Protein RhD se s proteinem RhCcEe shoduje v prvních 41 N-koncových aminokyselinách, tudíž se protein RhD liší od běžných forem RhCcEe proteinu pouze 30 až 35 aminokyselinami podél celého proteinu z celkového počtu 417 aminokyselin. RhD a RhCcEe proteiny jsou vysoce hydrofobní a každý obsahuje 12 transmembránových proteinových domén ukotvených v membráně erytrocytů a šest extracelulárních/intracelulárních smyček, na nichž se Rh antigeny nacházejí. [3, 7] Obě, amino (-NH₃) i karboxylová skupina (COOH) jsou lokalizovány uvnitř buňky. [10]

Pozice aminokyselin, jimiž se liší RhD a RhCE proteiny, jsou na obrázku č. 3 vyobrazeny jako tmavé kruhy na proteinu RhD. [11]



Obrázek 3: Umístění Rh proteinů v membráně erytrocytu (převzato: zdroj č. 11)

RhD protein exprimuje D antigen, zatímco RhCcEe protein zajišťuje expresi C, c nebo E, e antigenům. Těchto pět antigenů je považováno za nejvýznamnější antigeny

tohoto systému. Navzdory vysokému stupni homologie žádný z forem RhCcEe proteinů neexprimuje D antigen a ani RhD protein neexprimuje C/c nebo E/e antigeny. [3]

Nicméně, velmi podstatnou úlohu struktury RhD a RhCE proteinu plní aminokyseliny, které se nacházejí v extracelulární části Rh kanálku, tvořeného transmembránovými oblastmi. Velký počet změn aminokyselin ve vstupní části kanálku má za následek změnu molekulární struktury antigenu, která vede k tvorbě anti-D protilátky u jedinců fenotypově RhD negativního po expozici RhD pozitivním erytrocytům. Jelikož jsou antigeny rovněž závislé na konformaci Rh proteinů v buněčné membráně, mohou mít za následek interakci dvou nebo více extracelulárních smyček. [7, 11]

Tabulka 2: Rh geny, korespondující antigeny a výsledné značení fenotypu (převzato: zdroj č. 2)

Haplotyp	Geny	Antigeny	Fenotyp
R ¹	<i>RHD, RHCE</i>	D, C, e	R ₁
r	<i>RHce</i>	c, e	r
R ²	<i>RHD, RHcE</i>	D, c, E	R ₂
R ⁰	<i>RHD, RHce</i>	D, c, e	R ₀
r [‘]	<i>RHCe</i>	C, e	r [‘]
r ^{‘‘}	<i>RHcE</i>	C, E	r ^{‘‘}
R ^z	<i>RHD, RHCE</i>	D, C, E	R _z
r ^y	<i>RHCE</i>	C, E	r ^y

6.3.4 Dědičnost Rh systému

Antigeny z pohledu dědičnosti podléhají autozomálně dominantnímu typu, přičemž se dědí set genů jednoho chromozomu od otce a jednoho od matky. Jsou závislé na třech párech genů nebo alel – *D/d*, *C/c* nebo *E/e*. Alely *C/c* a *E/e* jsou navzájem kodominantní a kombinace alel se dědí neoddělitelně od sebe. Nejčastější genotypy v kavkazské populaci jsou genotypy *CDe/cde* a *CDe/CDe*, které představují zhruba 55% všech genotypů. [2, 5]

6.3.5 Funkce komplexu Rh proteinů

Rh proteiny tvoří komplex jádra, který zprostředkovávají klíčové interakce s cytoskelem vlivem interakce s proteiny spektrinem a ankyrinem. Všechny proteiny „Rh rodiny“ jsou tak důležité pro výslednou strukturu a zachování mechanických vlastností membrány erytrocytů. Funkce komplexu Rh je nejen rozhodující pro strukturu erytrocytové membrány, ale také pro suspektní transmembránový přenos O_2/CO_2 a dalších látek. Taktéž glykoprotein RhAG přispívá k výměně plynů skrz plazmatickou membránu.

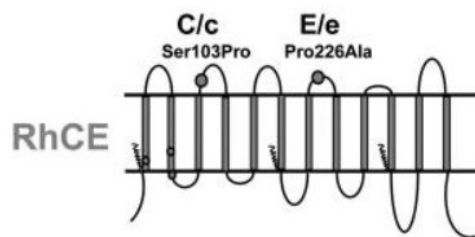
Proteiny systému Rh jsou z 20 % homologicky shodné s transportéry methylaminpermeasa (Mep) a amoniiových iontů (Amt) nacházejících se v kvasinkách, bakteriích a jednoduchých rostlinách. Předpokládá se, že transport NH_4^+ se uplatňuje pomocí Rh systému pouze u nižších živočichů, nicméně Rh proteiny se v lidském organismu nenacházejí pouze na erytrocytech, ale ne-erytroidní homology RhBG a RhCG lze nalézt i v mnoha dalších tkáních, především v ledvinách a játrech, tedy v místech, kde běžně dochází k produkci a eliminaci amoniaku. RhAG může být příčinou celkově nízké hladiny amoniaku v plazmě, díky jeho zachycení uvnitř erytrocytů, jelikož jsou celkové hodnoty amoniaku v plazmě ve srovnání s jeho obsahem v erytrocytech třikrát nižší. Suspektně se tedy předpokládá, že proteiny RhAG, RhBG a RhCG mohou zprostředkovávat transport amoniaku skrz buněčnou membránu a přispívat tak k regulaci acidobazické rovnováhy. [11, 12]

6.4 *RhD* antigen

Antigen D je charakterizován jako soubor více než 30 různých epitopů na povrchu extramembranózní části RhD proteinu, závislých na konformaci celého RhD proteinu. Z imunologického hlediska se jedná o antigen s velmi silnou imunogenicitou, z důvodu tvorby Rh protilátek u jedinců RhD negativních po transfuzi erytrocytů RhD pozitivních dárců. Výsledkem této reakce je, že se u přibližně 80% zdravých D negativních příjemců neboli RhD negativních osob (RhD-) po kontaktu s RhD pozitivními erytrocyty RhD pozitivních dárců (RhD+) začnou ve velkém množství tvořit anti-D protilátky. U nemocných, léčených či krvácejících osob je riziko imunizace po transfuzi RhD pozitivních erytrocytů řádově nižší. Imunitní systém RhD negativních osob

rozpoznává a reaguje na přítomnost RhD pozitivní erytrocytů. Fenotyp D negativních osob je zapříčiněn absencí RhD proteinu, a tak tito jedinci mají pouze RhCcEe proteiny zakotvené v buněčné membráně erytrocytů. V kavkazské populaci je RhD- výsledkem delece *RHD* genu, zatímco v africké a asijské populaci je *RHD* gen u většiny osob přítomen, avšak s alteracemi, které expresi antigenu D znemožňují. [3]

Protein RhCE má ve druhé extracelulární smyčce umístěn epitop pro antigen C nebo c a ve smyčce čtvrté se nachází epitop pro antigen E nebo e. Množství nukleotidových substitucí v genu *RHCE* je klíčové, neboť je příčinou řady změn v aminokyselinách proteinu RhCcEe. Na obrázku č. 4 jsou vyznačeny dva významné polymorfismy, z důvodů produkce polymorfních antigenů na daném proteinu (např. polymorfismus S103P – exprese C nebo c antigenu; polymorfismus P226A – produkce antigenu E nebo e). [13]



Obrázek 4: Substituce aminokyselin zodpovědné za polymorfismy C/c a E/e (převzato: zdroj č. 11)

Povrch fyziologického RhD pozitivního erytrocytu nese přibližně 10 000 až 30 000 antigenů D, na rozdíl od slabého antigenu D - RhD weak, u kterého se antigenní hustota pohybuje mezi 70 až 4 000 antigenů D na buňku. Naopak u erytrocytů, kterým chybí některé nebo všechny C/c a E/e antigeny, dosahují počty antigenu D až 200 000 na buňku. Počty antigenů D na erytrocyt jsou rovněž závislé na genotypovém a fenotypovém uspořádání, dále na homo- nebo heterozygocii pro daný antigen. [3, 14]

6.4.1 Frekvence výskytu

U kavkazské populace je četnost výskytu RhD pozitivního fenotypu 82-88%, v černošské populaci je to zhruba 95%, zatímco na Dálném východě (oblast Pacifiku, východní Asie) je výskyt tohoto vysokofrekventního antigenu téměř 100%. Ve východní Asii, konkrétně v Japonsku a Číně, je více než 99% obyvatel klasifikováno pomocí klasických sérologických metod vyšetření jako RhD+. Zbylé procento obyvatel, je klasifikováno jako RhD-, přičemž až 30% z celkového počtu D- jedinců má velmi slabý D fenotyp označovaný jako DEL (D_{el}). [1, 3, 5]

Tabulka 3: Frekvence výskytu RhD fenotypu u populací (převzato: zdroj č. 3, 13)

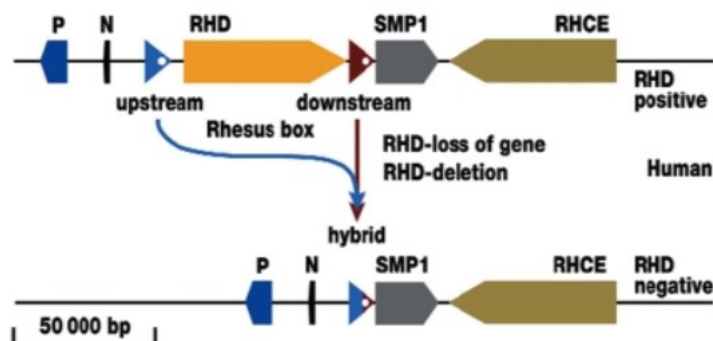
Antigen	Fenotyp	Kavkazská populace	Černošská populace	Asijská populace
D	RhD pozitivní	82-88%	90-95%, obyvatelé pacifické oblasti a indiáni 100%	99%
	RhD negativní	12-18%	8%	1%
C		65-70%	27%	téměř 100% - východní Asie
c		80-85%	96%	47%
E		25-30%	22%	39%
e		98%	92%	96%
G		85%		
Ce = f		64%		
Cw		1-2%		
Cx		0,1-0,3%		

6.4.2 RhD negativní fenotyp

Rozdíl mezi RhD pozitivním a RhD negativním fenotypem spočívá v přítomnosti nebo naopak absenci RhD proteinu v erytrocytové membráně. Tento specifický genetický znak přispívá k silné imunogenicitě D antigenu neboť většina světové populace je RhD pozitivní, tedy RhD protein je zabudovaný v membráně erytrocytů. Z toho důvodu může docházet k tvorbě anti-D protilátky u RhD- příjemce při kontaktu s RhD+ krví dárce.

V případě nerovnoměrného crossing-over (výměna části DNA mezi dvěma homologními chromozomy) v průběhu profáze v I. meiotickém dělení mezi upstream a downstream Rhesus boxem na dvou různých chromozomech, dojde k deleci *RHD* genu na RH lokusu. Výsledkem crossing-overu je takzvaný „hybrid Rhesus box“, který vzniká spojením 5' konce upstream Rhesus Boxu a 3' konce downstream Rhesus Boxu. Nerovnoměrný crossing-over nastává v případě dvou vysoce homologních segmentů DNA jak je tomu u Rhesusova boxu, který lze aplikovat jako účinný marker k zachycení delece *RHD* genu. RhD negativní fenotyp se vyskytuje u 41% světové populace. U černošské populace za vznikem D negativního fenotypu stojí přítomnost inaktivního *RHD* pseudogenu. V daném případě je sice kompletní *RHD* gen přítomen, ale v inaktivní formě, která nekóduje RhD protein a nedochází tak ani ke tvorbě D antigen. Za vznikem stojí tvorba alespoň jedné kopie *RHD* ψ (66%), kdy je antigen D inaktivován duplikací 37 páru bází v exonu 4 a existence nesmyslné mutace v exonu 6. Další z možností je vznik *RHD-CE-D* hybridního genu (15%) nebo také úplné vyšťípení *RHD* genu (18%). [9, 10, 15]

I přes existenci velkého počtu dalších mutovaných *RHD* genů a hybridních genů zodpovědných za D negativní fenotyp, jehož výskyt je velmi vzácný, je nejčastější příčinou D negativních genotypů vznik homozygotních nebo heterozygotních sloučenin *RHD* delece, *RHD** ψ nebo *RHD-CE-D*. [16]



Obrázek 5: Delece *RHD* genu (převzato: zdroj č. 9)

6.4.3 Atypické a variantní formy RhD antigenu

Přestože je fenotyp osob RhD pozitivní nebo RhD negativní, existují i rozdílné variantní D antigeny – slabý (RhD weak), částečný (RhD variant/parcial) D antigen a DEL, které se navzájem liší množstvím a kvalitou antigenních míst na erythrocytu a změnami jednotlivých D epitopů. Tyto změny jsou příčinou rozličných změn v *RHD* genu a vyskytují se u 1-2% RhD+ osob. Kromě zmíněných forem D antigenů se rozlišuje i mezi atypickými formami D antigenu, kde se řadí Rh_{null}, Rh_{mod}, D-- a Rh fenotypové získané změny. Počet D antigenních míst na jeden erythrocyt se pohybuje u D weak fenotypu od cca 60 do 3800, u varianty D kategorie VI typu 2 okolo 3000 až po 33 000 u varianty D kategorie III. [16]

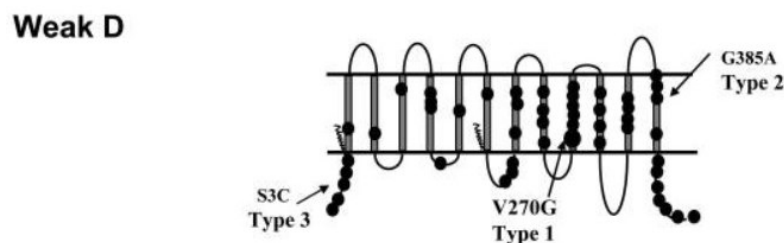
Expresi D antigenu na povrchu erythrocytu lze rozlišit kvantitativně od nejsilnější exprese u D--fenotypu, přes slabší expresi u RhD weak až po extrémně zeslabenou expresi u DEL fenotypu. Klesající sílu D antigenu možno vyjádřit pořadím fenotypům: DcE/DcE > Dce/DcE > Dce/Dce > DcE/dce > Dce/dce. [2]

Na vzniku D variantních antigenů se podílejí dva molekulární podklady. V prvním případě nastane jedna nebo více nukleotidových změn v *RHD* genu vedoucí k aminokyselinovým substitucím v RhD proteinu a v druhém případě stojí za vznikem D variant produkt genetické rekombinace (pravděpodobně důsledkem konverze genu), který vede ke vzniku *RHD-CE-D* genu. V daném genu je část *RHD* nahrazena odpovídající částí z *RHCE* genu a daná část může obsahovat část exonu/celý exon, anebo i několik exonů *RHCE*.

Příkladem lze uvést variantu DHAR, ve které došlo k odstranění *RHD*, přičemž exon 5 genu *RHCE* je nahrazen exonem 5 genu *RHD*, jenž je zodpovědný za expresi některých D epitopů. [16]

6.4.3.1 *RhD slabý (weak)*

Kvantitativní varianta antigenu D vedoucí k zeslabenému vyjádření D antigenu je označována jako slabý D antigenen - RhD weak (D weak). Příčinou vzniku slabých antigenů je bodová mutace genu *RHD* vedoucí k záměně aminokyselin RhD proteinu v jeho intracelulární nebo transmembránové části. Aminokyselinové substituce jsou příčinou znesnadnění integrace proteinu do cytoskeletonu membrány erytrocytů během procesu sbalování proteinů. Výsledný antigen je sice kompletní, nicméně dochází k redukci počtu exprimovaných antigenních míst na povrchu zralého erytrocytu (méně než 5 000 D antigenů na jeden erytrocyt), a proto se úplný D antigen nejeví jako imunogenní. Celkový počet rozličných D weak antigenů včetně jejich podtypů v dnešní době přesahuje 80 typů s několika podtypy, konkrétně je k roku 2017 v databázi Rhesus uvedeno celkově 147 D weak typů. [17] Všechny slabé D typy nelze sérologicky rozlišit i přes rozdílné stupně jejich síly, a tak počet vzorků klasifikovaných jako slabý D antigen závisí na charakteristice použité sérologické typizační reagentie. Mezi nejčastěji vyskytující se typy D weak antigenu v každé evropské či kavkazské populaci patří typ 1, 2, 3 a 4.0/4.1. Představují více než 95% všech detekovaných typů. V africké populaci je nejhojněji zastoupen D weak typ 4.2. Na obrázku č. 6 jsou zobrazeny tři nejčastější mutace u evropské populace, které společně reprezentují většinu vyskytujících se slabých D fenotypů. [11]



Obrázek 6: Tři nejčastější aminokyselinové substituce v *RhD* proteinu u *D weak* fenotypu (převzato: zdroj č. 11)

Do dnešní doby, i více než 15 let po charakterizaci D weak fenotypu na molekulární úrovni, nebyl zaznamenán jakýkoliv nosič D weak typu 1-4.1, který by byl aloimunizován a následně by u něj došlo k produkci allo-anti-D protilátek. Dárce, příjemce i těhotné ženy s fenotypem D weak typu 1, 2 a 3 lze považovat a zároveň s nimi zacházet jako s RhD⁺ bez rizika tvorby anti-D protilátky. [3, 9, 11, 16, 17]

Tabulka 4: Nejčastěji zastoupené typy slabého RhD: Nukleotidové změny, proteinové sekvence, poloha v exonu, asociovaný haplotyp RHCE (převzato: zdroj č. 5)

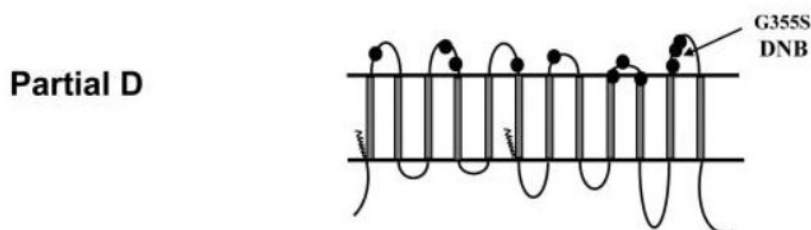
Název	Nukleotidová změna (SNP)	Proteinová sekvence	Exon	RHCE
D weak typ 1	809T>G	<i>RHD</i> Val270Gly	6	Ce
D weak typ 2	1154G>C	<i>RHD</i> Gly385Ala	9	cE
D weak typ 3	8C>G	<i>RHD</i> Ser3Cys	1	Ce
D weak typ 5	446C>A	<i>RHD</i> Ala149Asp	3	cE
D weak typ 15	845G>A	<i>RHD</i> Gly282Asp	6	cE

6.4.3.2 RhD částečný (variant)

Kromě kvantitativní změny antigenu existují i kvalitativní rozdíly charakterizované jako částečný D antigen - RhD variant (D variant). Za vznikem antigenu RhD variant stojí bodová mutace v *RHD* genu, která zapříčiní substituci alespoň jedné extracelulárně lokalizované aminokyseliny v polypeptidovém řetězci v extracelulárních smyčkách, jejichž výsledkem je vznik nekompletního antigenu, kterému chybí část původní epitopové mozaiky - jeden nebo více D epitopů. Testováním variantních erytrocytů s anti-D protilátkou produkovanou D variálními jedinci, bylo rozlišeno celkem 6 D kategorií (DII až DVII) a více než 50 variant, které představují podmnožinu všech dílčích D antigenů. Varianty DII a DVII jsou způsobeny substitucí jedné extracelulární

aminokyseliny, zatímco varianty DIII, DIV, DV a DVI jsou výsledkem rekombinace genů *RHD* a *RHCE* se vznikem hybridního genu *RHD-CE-D*. [2, 3]

Využitím pokročilejších analýz s využitím monoklonálních protilátek a následně i sekvenováním genů kódujících antigenů bylo objeveno množství částečných antigenů D, které jsou označeny jako DNB, DBT, DFR a DHAR. Nejčastější a klinicky nejdůležitější varianta v kavkazské populaci je varianta DVI. Jedinci s touto variantou antigenů D disponují možnou tvorbou protilátky alo-anti-D proti chybějícím epitopům, které jejich erythrocyty nemají a v neposlední řadě u nich dochází k těžkým případům hemolytického onemocnění novorozence a potransfuzních reakcí. Pokud není u jedince s D variantou blíže specifikován její typ, je považován za RhD negativního, protože nositelé variantních D antigenů jsou vystaveni riziku aloimunizace při expozici D⁺ erythrocytů. Toto však neplatí u dárců krve, kteří jsou v systému vedeni jako RhD⁺. Těhotným ženám je nutno v průběhu těhotenství a po porodu podávat Rh imunoprofylaxi. [9, 16]



Obrázek 7: D varianta: Aminokyselinové substituce v RhD proteinu u D variant znázorněny jako kruhy (převzato: zdroj č. 11)

Tabulka 5: Nejčastěji zastoupené typy parciálního RhD: Nukleotidové změny, proteinové sekvence, poloha v exonu, asociovaný haplotyp RHCE (převzato: zdroj č. 5)

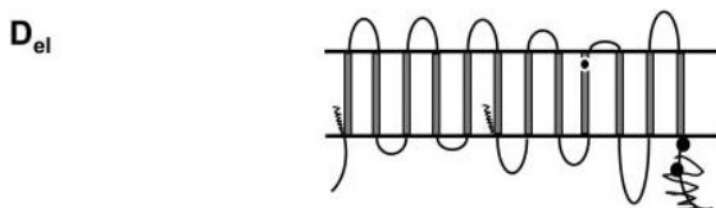
Název	Nukleotidová změna (SNP)	Proteinová sekvence	Exon	RHCE
D II	1061C>A	Ala354Asp	7	
D VI typ 1	505A>C 509T>G 514A>T 544T>A 577G>A 594A>T	Met169Leu Met170Arg Ile172Phe Ser182Thr Glu193Lys Lys198Asn	4, 5	cE

	602C>G 667T>G 697G>C 712G>A 733G>C 744C>T 787G>A 800A>T	Thr201Arg Phe223Val Glu233Gln Val238Met Val254Leu Silent Gly263Arg Lys267Met		
D VI typ 2	505A>C 509T>G 514A>T 544T>A 577G>A 594A>T 602C>G 667T>G 697G>C 712G>A 733G>C 744C>T 787G>A 800A>T 916G>A 932A>G	Met169Leu Met170Arg Ile172Phe Ser182Thr Glu193Lys Lys198Asn Thr201Arg Phe223Val Glu233Gln Val238Met Val254Leu silent Gly263Arg Lys267Met Val306Ile Tyr311Cys	4, 5, 6	Ce
D VII	329T>C	Leu110Pro	2	
DFR1	505A>C 509T>G 514A>T	Met169Leu Met170Arg Ile172Phe	4	
DCS1	667G>T 676G>C	Phe223Val Ala226Pro	5	
DHMi	848C>T	Thr283Ile	6	
DNB	1063G>A	Gly355Ser	7	
DAR 3.1 (weak partial D 4.0)	602C>G 667T>G 819G>A	Thr201Arg Phe223Val Silent	4, 5, 6	
DAR 4 (weak D 4.1)	48G>C 602C>G 667T>G 819G>A	Trp16Cys Thr201Arg Phe223Val Silent	1, 4, 5, 6	

6.4.3.3 DEL (*Del*)

Tento antigen je natolik zeslabený, že jej rutinními sérologickými technikami nelze detekovat a lze jej prokázat pouze DNA diagnostikou nebo adsorpčními a elučními testy. Počet exprimovaných antigenních míst na povrchu erytrocytu představuje 200 a méně kopií D antigenu. Antigen DEL je výsledek mutace *RHD* genu způsobující redukci syntézy v 3'oblasti RhD proteinu. Na obrázku č. 8 řzná čára naznačuje ztrátu 3'oblasti, která je charakteristická pro asijské mutace.

Fenotyp se vyskytuje především ve východní Asii (až 30% RhD- osob), u Evropanů je jeho výskyt méně častý (0,027%). I přes minimální obsah D antigenu byl v minulosti zaznamenán případ imunizace RhD negativní osoby po podání transfuzního přípravku DEL- pozitivního dárce (DEL-pozitivní dárce jsou neúmyslně značeni jako RhD-negativní). Fenotyp DEL u plodu a novorozence není nepovažován za rizikový z hlediska možného výskytu hemolytického onemocnění plodu a novorozence. [9, 11, 18]



Obrázek 8: *Del* fenotyp: Ztráta 3'oblasti charakteristická u asijské populace (převzato: zdroj č. 11)

6.4.3.4 *Rh*_{null}

Fenotyp *Rh*_{null} je charakterizován úplnou absencí exprese všech Rh antigenů (D, C, c, E a e) na erythrocytech, přičemž dochází k výraznému zvýšení počtu antigenu D, a to ze zhruba 30 000 D na 200 000 D na erytrocyt. Nedostatek RhD a RhCE proteinů může být zapříčiněn dědičností dvou nefunkčních alel *RHCE* genu na pozadí haplotypu deletovaného genu *RHD*. Z lékařského hlediska se jedná o velmi vzácnou genetickou poruchu s výsledným Rh-deficitním fenotypem, jelikož pacienti s *Rh*_{null} fenotypem trpí takzvaným *Rh*_{null}ovým syndromem. *Rh*_{null}ový syndrom je onemocnění, které je

doprovázeno tvorbou velmi křehkých erytrocytů z důvodů jejich osmotické fragility (v periferní krvi se nacházejí sférocyty a stomatocyty), chronickou hemolytickou anémií s různou intenzitou průběhu, asymetrií fosfolipidů v buňce, a zvýšenou aktivitou Na⁺/K⁺ ATPázy. Při expozici Rh antigenům dochází u osob s tímto fenotypem k tvorbě alo-anti Rh protilátek.

Existují dva základní typy Rh_{null}: amorfní a regulátorový. Amorfní typ je způsoben mutací v genu RHCE, která zabrání správné transkripci a translaci a následně tak dochází k zábraně exprese RhCcEe proteinu. Naproti tomu u regulátorového typu dochází k mutaci v genu RHAG, a tím ke znemožnění exprese RhAG proteinu, a tím také k nemožné výstavbě Rh komplexu. Oba genotypy mají za následek stejný klinický stav pacienta. [2, 3, 9, 19]

6.4.3.5 D--

Molekulárním podkladem D-- je homozygocie pro abnormální RH haplotypy, z důvodu mutace v obou alelách genu RHCE nebo díky jeho přestavbám. Vzniklá mutace brání expresi všech nebo pouze některým antigenům RhCcEe proteinu na membráně erytrocytů. Absence exprese proteinu RhCcEe může mít za následek zesílení exprese antigenu RhD. [1, 3, 20]

6.4.3.6 Rh_{mod}

Forma Rh_{mod} patří do vzácných Rh-deficitních fenotypů je zapříčiněna inkompletní supresí genů Rh. Výsledné Rh antigeny jsou na rozdíl od Rh_{null} na erytrocytu přítomny, avšak jejich exprese je výrazně zeslabena a prokázat je lze pouze výběrem nejcitlivějších metod. [3]

6.4.3.7 Rh fenotypově získané změny

V ojedinělých případech jsou popisovány získané změny Rh fenotypu, při kterých dochází k abnormální expresi některých Rh antigenů a v periferní krvi pacienta tak

vzniká obraz mozaiky. Nález mozaiky lze pozorovat u pacientů s klonálními poruchami erythropoézy a myeloproliferacemi (např. chronická myeloidní leukémie, polycytemie vera nebo primární myelofibróza), kdy se v jejich krvi nachází dvojí populace erytrocytů s různým Rh fenotypem. V některých případech je ztráta Rh antigenů spojována s chromozómovými aberacemi. Objevují se i nálezy Rh mozaicismu u zdravých osob suspektně související se somatickou mutací. [1, 5, 7]

6.5 Antigeny C, c, E, e

RHCE gen má čtyři alely: *RHCE*, *RHCe*, *RHcE* a *RHce*. Antigeny C, c, E, e jsou důsledkem změn RhCE proteinu, konkrétně změnou polohy pěti aminokyselin a jejich počty na erytrocyt se pohybují mezi 20 000 - 85 000. Alely *C/c* a *E/e* jsou navzájem kodominantní a v případě přítomnosti obou alel dojde k vyjádření obou alel. *C/c* antigeny jsou přímými produkty alel *RHCE* genu. Frekvence výskytu se u genu C pohybuje okolo 68 %, zatímco c dosahuje 81 % v kavkazské populaci. U černošské populace je daleko častější výskyt genu c oproti C, ve východní Asii se incidence C blíží 100 %. Polymorfismus C a c je obvykle spojován s šesti nukleotidovými substitucemi v *RHCE* vedoucí k záměně 4 aminokyselin proteinu RhCcEe (Cys16Trp, Ile60Leu, Ser68Asn a Ser103Pro).

Jsou popsány i méně četné antigeny C^w a C^x , jejichž vznik spočívá v nukleotidových změnách genu *RHCE* a následné změny aminokyselin zapříčiní konformační změnu konečného proteinu. Výsledkem mohou být kvalitativní a kvantitativní abnormality C antigenu. C^w+ erytrocyty se ve většině případů jeví jako C+, i přestože je na nich antigen C slaběji exprimován. V kavkazské populaci je antigen C^w detekován s variabilní prevalencí. Frekvence výskytu ve Finsku činí 2%, zatímco v České republice je jeho výskyt zjišťován s frekvencí 6-7 %. Výskyt C^x antigenu je oproti C^w antigenu mnohem vzácnější (výskyt 0,1 %). V ojedinělých případech může alela C^w zcela nahradit alelu C ve všech genových komplexech Rh. [3, 6]

Antigeny E a e jsou rovněž kódovány *RHCE* genem. Ve všech světových populacích je incidence antigenu e (98 %) významně větší než frekvence antigenu E (29 %). Polymorfismus E/e antigenů spočívá v substituci jediné aminokyseliny, prolinu za valin (Pro226Ala) v RhCcEe proteinu. V případě, že RhCE alela kóduje aminokyselinu

prolin, dochází k expresi antigenu E. V případě, že nastane substituce aminokyseliny prolinu za valin, dojde k expresi antigenu e. Mezi vzácněji frekventované antigeny patří antigen E^u, který je formou zeslabeného E antigenu nebo raritní E^w.

V případě, že je antigen C v pozici cis vůči E v poměrně vzácném DCE haplotypu, výsledná exprese antigenu C je velmi zeslabená. Polymorfismus C/c zřejmě nemá žádný vliv na expresi antigenu E. Páry antigenů C/c a E/e nejsou antitetické, jelikož jde o konečný důsledek aminokyselinových substitucí na různých místech. Na základě toho se vyskytují čtyři možné kombinace rozdílných incidencí mezi Evropany: Ce > ce > cE > CE.

V porovnání s antigenem D jsou antigeny C/c a E/e slabší ve své antigenní síle. [2, 3, 5, 7, 10]

6.5.1 Složené CE antigeny

Ke vzniku složených CE antigenů dojde v případě, že antigeny c a e, C a e, C a E nebo C a E jsou produktem stejného genu *RHCE*. Jsou schopny společně indukovat imunizaci a tvorbu protilátek, které s danými antigeny reagují pouze v případě, zdali jsou v jednom společném komplexu v poloze cis. Ke společným antigenům patří antigen ce (také označován f), Ce, CE, cE. Protilátky proti těmto sloučeninám antigenů jsou pravděpodobně schopny rozpoznat jednotlivé konformační rozdíly v RhCcEe proteinu, který je výsledkem aminokyselinových substitucí souvisejících s polymorfismy C/c a E/e. [5]

6.5.2 Antigen V a VS

Současný výskyt dvou málo frekventovaných antigenů VS a V je dán jednou aminokyselinovou substitucí (Leu245Val), u které se předpokládá, že je součástí transmembránové domény. Definované antigeny jsou velmi často exprimovány na erytrocytech černošské populace, zatímco na červených krvinkách jiných populací je jejich výskyt velmi raritní. Výskyt protilátky anti-V byl poprvé hlášen v roce 1955, o pět let později byla popsána protilátka anti-VS. Antigen VS je výsledkem haplotypu Dces, dces a d(C)ces, kdežto antigen V je produktem haplotypu Dces a dces. [5, 7]

6.5.3 Antigen G

Na proteinech RhD a RhC se rovněž nachází antigen G, který je téměř vždy přítomen na erythrocytech s exprimovaným C nebo D antigenem. Existence G antigenu je připisována k vysvětlení neočekávaných reakcí erythrocytů, jako v případě dárce krve bílé rasy, jehož fenotyp byl C-D- a přesto došlo k reakci s většinou anti-CD sér. Tento velmi vzácný fenotyp je prezentován jako rGr (rG/dce). Pozitivní reakce se všemi druhy anti-CD séry (anti-D+G, anti-C+D+G nebo anti-C+G) spočívá v přítomnosti anti-G složky. Složku anti-G lze ze séra izolovat pomocí adsorpce a eluce z rGr krvinek. Objasněním G antigenu lze vysvětlit, z jakého důvodu u některých žen s fenotypem dce/dce, jež byly imunizované těhotenstvím, docházelo k tvorbě anti-C+D protilátky, přestože jejich manželé byli C negativní - u daných žen docházelo k tvorbě anti-D+G protilátky. Protilátka anti-C+G může být příčinou lehkého typu hemolytického onemocnění novorozence. [5, 7]

6.6 Protilátky Rh systému

Protilátky Rh systému zpravidla vznikají imunizací těhotenstvím nebo chybně zvolenou transfuzí. Patří ke klinickým významným protilátkám, zřídka kdy jsou nalézány jako přirozené (autoprotilátky způsobující autoimunní hemolytickou anémii). Antigen D vykazuje silnou imunogenicitu a vyvolává imunitní odpověď u 80 % RhD-negativních osob již při podání několika ml RhD pozitivních erythrocytů.

Klinický význam protilátek Rh systému spočívá v jejich silném potenciálu destruovat erythrocyty a způsobit tak hemolytické potransfuzní reakce při neshodně v Rh antigenech mezi dárce a příjemcem krve nebo hemolytické onemocnění plodu i novorozence (HON) při inkompatibilitě Rh mezi matkou a dítětem. Většinou se jedná o imunoglobuliny třídy IgG (IgG₁ a IgG₃), méně často IgM. Mohou se vyskytovat i protilátky třídy IgA. Při vzniku IgG protilátek nedochází k aktivaci komplementu, nýbrž dochází k extravaskulární hemolýze. [5]

Mezi nejčastější typy aloprotilátek patří anti-D, anti-C, anti-E, anti-c. Některé druhy Rh protilátek mohou mít i povahu autoprotilátek, mezi něž jsou řazeny protilátky anti-e a anti-Ce. Na základě porovnání síly jednotlivých protilátek, je nejdůležitější protilátka anti-D. Způsobuje hemolytické potransfuzní reakce a v některých případech i těžké hemolytické onemocnění novorozence. V současné době není výskyt hemolytického onemocnění plodu a novorozence běžný, a to především z důvodu

včasné prenatální péče. Jedinci se vzácným fenotypem Rh_{null} disponují okamžitou tvorbou významných aloprotilátek - protilátka anti-Rh29 (protilátka proti „celkovému“ Rh systému), anti-Rh17 (protilátka proti proteinu RhCcEe, dále pak anti-D i anti-C).

Protilátka anti-C se převážně nachází u D-negativních jedinců, doprovázena protilátkou anti-D. Anti-E protilátka se vyskytuje častěji než anti-C a občas je nalézána zejména u těhotných žen. Protilátku anti-E v některých případech provází poměrně vzácná protilátka anti-c, kterou jsou schopni tvořit jen jedinci s antigenem C v homozygotní formě. [5]

Tabulka 6: Přehled klinicky nejvýznamnějších imunních protilátek anti-Rh (převzato: zdroj č. 3)

Specifická protilátka	Výskyt
Anti-D	90-95% anti-Rh, cca 30% obsahuje složku anti-C a 1-2% složku anti-E
anti-C	V kombinaci s anti-D, -e, -Cw
Anti-c	Druhá klinicky nejvýznamnější protilátka (často společně s anti-E)
Anti-E	Současná tvorba anti-c
Anti-e	Společně s anti-Ce nebo anti-ce
Anti-G	Současně s anti-D a nebo Anti-C (nejčastější výskyt u genotypu dce/dce)
Anti-Cw	V České republice poměrně častá

6.7 Klinický význam Rh systému pro transfuzní lékařství a klinickou praxi

Přesné a správné určení RhD antigenu jako klinicky nejvýznamnějšího antigenu hned po AB0 antigenech má velký význam při prevenci hemolytických potransfuzních reakcí a hemolytického onemocnění novorozence. U všech RhD negativních dárců krve, těhotných žen a novorozenců se provádí vyšetření RhD weak/variant (detekce slabší

alely antigenu D). Základem vyšetření je použití diagnostického séra IgG v nepřímém antiglobulinovém testu (NAT).

6.7.1 Hemolytické potransfuzní reakce

Nežádoucí reakce v souvislosti s transfuzí lze rozdělit dle charakteru a rozsahu klinických projevů na závažné a ostatní, dále pak ve vztahu k časovému kontextu s transfuzí na reakce akutní, projevující se do 24 hodin od počátku zahájení krevního převodu, či pozdní, s nástupem obtíží 5 až 7 dnů po transfuzi. Hemolytické potransfuzní reakce způsobené inkompatibilitou v Rh antigenech se řadí mezi pozdní hemolytické potransfuzní reakce.

Příčinou jsou protilátky IgG namířené proti antigenům Rh systému (především D, ale i E a c). Reakce se vyskytuje u pacientů, kteří již byli v minulosti imunizováni (předchozí inkompatibilní transfuze či těhotenství) a principiálně jde o důsledek sekundární imunitní odpovědi po opětovném podání antigen-pozitivních erytrocytů. Koncentrace těchto protilátek je pod mezí detekce, a tak je nelze detekovat předtransfuzním vyšetřením. Podáním erytrocytů s komplementárními antigeny příjemci vede k degranulaci žírných buněk a extravaskulární hemolýze. Anti-D protilátky (či ostatní) v určitém množství setrvávají v séru pacienta, avšak jejich koncentrace může v čase významně klesnout tak, že je nelze rutinními předtrasfuzními vyšetřeními detekovat. [2, 21]

6.7.2 Hemolytické onemocnění novorozence

Hemolytické onemocnění novorozence (HON) je onemocnění charakterizované zkráceným přežíváním erytrocytů plodu a novorozence, jehož Rh antigeny se neshodují s Rh antigeny matky. Erytrocyty plodu, jež zdědily antigen od otce, mohou při fetomaternální krvácení, které většinou nastává například ve vyšším gestačním stádiu, především v období porodu, proniknout do krevního oběhu matky a navodit tvorbu protilátek s následnou imunitní odpovědí. Tvořené protilátky IgG (nejčastěji IgG₁ a IgG₃) mohou díky placentárním receptorům pro imunoglobuliny pronikat placentou a vázat se na fetální či novorozenecké specifické antigeny. Transfer protilátek se zvyšuje od 24. týdne těhotenství, kdy hladina protilátek může být u plodu daleko vyšší než u matky. Antigen D lze detekovat na fetálních krvinkách od 5. - 6. týdne těhotenství a protilátky přetrvávají dobu delší 6 - 38 let. V případě, že se jedná o protilátku

s klinickým významem a dostatečně silnou účinností, dochází ke zkrácenému přežívání takto senzibilizovaných erytrocytů a následné hemolýze. Riziko onemocnění roste s počtem těhotenství, z důvodu vyšší frekvence fetomaternálního krvácení, a proto se HON jen výjimečně vyskytuje již při prvním těhotenství. V současné době je anti-D stále jednou z nejčastějších protilátek detekovaných u těhotných žen, dále pak protilátka anti-K, anti-c a anti-E. Z demografického pohledu, zahrnující rozdíly mezi rasou a pohlavím, byl zjištěn 10% výskyt inkompatibility v Rh systému u bělošské a černošské populace, zatímco u asijské populace je tato inkompatibilita velmi vzácná. [22]

Hlavním profylaktickým opatřením HON bylo zavedení rutinního podávání anti-D imunoglobulinu RhD- ženám v průběhu těhotenství a po porodu RhD+ dítěte. Výsledek makedonské studie z roku 2015, ve které od roku 2004 do roku 2014 probíhalo testování aplikace anti-D Ig u celkem 22 009 těhotných žen, poukázal na výskyt aloimunizace v rozmezí od 0,4 do 2,7% ve sledované skupině. [24] Podle údajů ze Spojených států amerických z roku 2017 ročně HON postihuje od 3 do 80 osob na 100 000 pacientů. Po zavedení moderní profylaktické terapie rizikových žen se výskyt RhD senzibilizace snížil ze 45 případů na 10 000 živě narozených dětí na 10,2 případů. [22, 23]

RHD genotypizace je doporučena k objasnění nejasného sérologického výsledku RhD u těhotných žen. Na základě výsledku lze rozhodnout o nutnosti podání profylaktického anti-D imunoglobulinu. Odhaduje se, že zhruba 0,6 až 1 % bělošských žen vykazuje v sérologickém testu D weak fenotyp, z čehož se u přibližně 80 % předpokládá D weak typ 1, 2 nebo 3. Tyto ženy lze brát jako RhD pozitivní, ale pouze sérologickým vyšetřením nelze zhodnotit případnou potřebu imunoprofylaxe Rh. [25]

6.7.3 Autoimunitní hemolytické anémie

Autoimunitní hemolytická anémie (AIHA) patří mezi relativně neobvyklé onemocnění s hlášeným výskytem u kavkazské populace na 1 jedince ze 100 000 obyvatel. Toto onemocnění je způsobeno autoprotiátkami třídy IgG (především podtřídy IgG₁ spolu s IgG₃) namířenými proti vlastním erytrocytům. AIHA je charakterizována zkráceným přežíváním erytrocytů, které postupně vede k jejich extravaskulární hemolýze v retikuloendotelovém systému (slezina a v menší míře i játra). Na podkladě teplotní reaktivity protilátek lze autoimunitní hemolytické

onemocnění rozdělit do čtyř kategorií - AIHA s tepelnými protilátkami, s chladovými protilátkami, smíšený typ AIHA (s chladovými i tepelnými protilátkami) a polékový typ AIHA. Autoprotilátky tepelné AIHA, tvořící až 80 % všech hlášených výskytů AIHA, jsou ve většině případů zaměřeny proti epitopům antigenů krevního systému Rh, nejčastěji antigenu e. [26, 27]

6.8 Diagnostika RhD antigenu

6.8.1 Sérologické metody

Základem vyšetření RhD antigenu jsou sérologické metody fungující na principu hemaglutinace, při které dochází k reakci známé specifické protilátky, jež se nachází v diagnostickém séru, se specifickým antigenem nacházejícím se na vyšetřovaných erythrocytech. Výsledkem této reakce je aglutinace (shluk erythrocytů). Podle charakteru použité protilátky dochází k přímé nebo nepřímé aglutinaci. V dnešní době se v imunohematologické diagnostice využívají monoklonální a polyklonální diagnostická séra. Mezi používané metody patří zkumavkové testy, metoda gelové sloupcové aglutinace, metoda použití pevné fáze, mikrotitrační destičky nebo sklíčka a v neposlední řadě i metoda laterálního průtoku využívající interakce antigen-protilátka během boční difuze. Vyjma metod pomocí zkumavek je většina metod uskutečnitelná manuálně nebo pomocí automatizovaných systémů. [28, 29]

Konkrétní určení fenotypu RhD má velmi velký význam v transfuzní medicíně. Existence velkého počtu polymorfismů *RHD* genu a množství variantních RhD fenotypů společně s širokou škálou dostupných metod a reagensů k vyšetření potvrzuje nutnost správného a přesného určení Rh fenotypu.

Antigen RhD je vždy vyšetřován dvěma monoklonálními IgM diagnostickými séry anti-D různých klonů proti odlišným epitopům metodou přímé aglutinace. V případě, že je zaznamenán nejasný, diskrepantní výsledek či výrazně zeslabená reakce, je pacient považován za D weak/variant do doby, než je jednoznačně určen fenotyp. Monoklonální diagnostická séra mohou vykazovat rozdílnou schopnost detekce slabých a variantních D antigenů. K detekci variantních D antigenu (D weak/variant) se používají polyklonální protilátky anti-D IgG nebo monoklonální sérum IgG/IgM nepřímým antiglobulinovým testem. [3, 29]

Nejlepších výsledků dle brazilské studie z roku 2015 [30] k detekci variantních D antigenů lze dosáhnout výlučně použitím gelových karet s protilátkou anti-D IgG. Erytrocyty varianty DVI nelze výlučně detekovat použitím protilátky anti-D IgM, zatímco protilátkou anti-D třídy IgG ano. Na základě studie z roku 2011, která porovnávala sérologické a molekulárně genetické výsledky vyšetření dárců krve v Brazílii [31], bylo prokázáno, že RhD weak typu 2 a 6 a některé D varianty v gelovém prostředí NAT některými anti-D činidly nemusí reagovat z důvodu rozdílné schopnosti monoklonální protilátky anti-D třídy IgG a směsi protilátek IgG a IgM detekovat slabé D fenotypy. Závěrem lze potvrdit, že neexistuje přesně vymezená hranice mezi slabým a částečným D fenotypem, které slabě exprimují antigen D na erytrocytech, a právě z tohoto důvodu by u těchto variant mělo následovat vyšetření *RHD* genotypizace pomocí polymerázové řetězové reakce. [31]

Volba diagnostického séra má odlišný význam při vyšetřování pacientů (včetně těhotných žen) či dárců krve. K typování antigenu RhD u příjemců transfuze a těhotných žen se nesmí užívat diagnostika anti-D reagující s erytrocyty parciálního fenotypu DVI, jelikož je varianta DVI nejčastějším typem variantního D antigenu v kavkazské populaci. Daní jedinci by při použití tohoto diagnostika mohli být falešně určeni jako RhD+ a při kontaktu s RhD+ erytrocyty by mohli tvořit anti-D protilátku proti chybějícím epitopům. Antigen D sestává z více epitopů a v případě RhD variant kategorie DVI jsou některé exony normálního genu *RHD* nahrazeny exony genu *RHCE*. To znamená, že jedinci s fenotypem DVI mohou tvořit protilátku anti-D proti chybějícím epitopům po kontaktu s RhD+ erytrocyty během gravidity nebo po transfuzi. Z tohoto důvodu jsou erytrocyty DVI u příjemců a těhotných žen označeny jako „RhD negativní“. Naproti tomu typizace krve dárců vyžaduje citlivější techniky a činidla, a proto jsou vzorky testovány s protilátkou anti-D, která detekuje DVI a jedinci jsou označeni „RhD pozitivní“. Jejich krev lze použít k léčbě RhD pozitivních pacientů. [28]

Převážná většina sérologických testů D weak fenotypů u kavkazské populace vyjadřuje molekulárně definované RhD weak typy 1, 2, 3. V případě, že je výsledek sérologických metod pozitivní (suspektně je zjištěn D weak nebo D variant), následuje vyšetření *RHD* genotypizace molekulárně genetickými metodami. [32]

6.8.2 Molekulárně genetické metody

První zmínky o existenci molekulárního základu jednotlivých erytrocytových antigenů krevních skupin se datují mezi lety 1980 – 1990 spolu s rozpoznáním kódujících genů potřebných ke vzniku jednotlivých antigenů. Molekulární úroveň antigenů byla objasněna během 90. let 20. století a prvního desetiletí 21. století, a tím došlo k urychlení vývoje a následného užití molekulárně genetických metod v transfuzní medicíně.

Od dob klonování genu *RHD* a objasnění molekulárního podkladu D polymorfismu se konfirmace D fenotypu využitím genomové DNA stala běžnou součástí transfuzní medicíny. Charakteristické genové varianty Rh systému, ovlivňující krevně skupinovou diverzitu, jsou jednonukleotidové polymorfizmy a taktéž delece/duplikace, které jsou výsledkem interakce mezi *RHD* a *RHCE* genem. Molekulární genotypizace je jedním z důležitých a stále se vyvíjejících aspektů transfuzní služby a pro její účely byly vyvinuty techniky s nízkým, středním a vysokým rozlišením.

Převážná část metod s nízkou účinností je založena na principu polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) využívající genomovou deoxyribonukleovou kyselinu (deoxyribonucleic acid, DNA). Nicméně, PCR je výchozím bodem dalších metod k analýze genotypu, od modifikace PCR až po sekvenování DNA. [3, 9, 16]

Správná identifikace a rozlišení RhD antigenu má velmi značný význam pro pacienty k rozlišení weak nebo variantní formy D nebo k rozhodnutí, zdali je těhotné ženě opravdu nutno podat anti-D profylaxi, a v neposlední řadě z hlediska prevence výskytu hemolytického onemocnění novorozenců. Standardně se testují dárci krve a pacienti s nejasným či diskrepantním sérologickým výsledkem vyšetření. [28, 33]

6.8.2.1 *Techniky s nízkým rozlišením (low-throughput techniques)*

Nejčastěji používané molekulárně genetické metody v imunohematologické laboratoři jsou metody založené na principu PCR s následnou vizualizací a detekcí vzniklých PCR produktů separovaných na základě své rozdílné délky pomocí agarozové gelové elektroforézy. PCR je velmi účinná metoda, jejímž cílem je rychlé zmnožení

(amplifikace) vybraného úseku DNA ohraničeného tzv. primery (oligonukleotidy), neboli fragmenty DNA o délce 20-25 nukleotidů, jež jsou komplementární ke sledovanému úseku. Amplifikace DNA probíhá v termocykléru, v opakujících se cyklech, které se skládají ze tří kroků:

- Denaturace
- Annealing (navázání primerů)
- Extenze (polymerace)

Při denaturaci templátu (výchozí izolované nukleové kyseliny) dochází k zahřátí směsi na 95 °C po dobu 2-5 minut, při němž se dvoušroubovice DNA rozplétá na dvě jednotlivá vlákna, čímž se umožní nasednutí primerů. K hybridizaci - nasednutí dvou primerů ke dvěma jednotlivým řetězcům DNA dochází při snížené teplotě 55-56 °C po dobu 30-90 sekund. Posledním krokem probíhajícím v termocykléru je polymerace primerů při 72°C 45-90 sekund, kdy nově vytvořené krátké úseky dvouvláknové DNA vzniklé přichycením primerů slouží jako „startovací pozice“ pro teplotně stabilní Taq polymerázu, která postupně přidává komplementární nukleotidy ke vzoru a nově syntetizovaný templát slouží jako vzor pro další cykly. Všechny tři kroky se cyklicky opakují a pro dostatečnou amplifikaci původní molekuly DNA je obvykle nutno 25-35 cyklů PCR reakce. [34]

Mezi techniky s nízkým rozlišením patří modifikace metody PCR, a to „polymorfismus délky restričních fragmentů“ (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) a „alelově specifická PCR“ (ASA – PCR) primárně označovaná jako PCR se sekvenčně specifickými primery (Sequence-Specific Priming, PCR-SSP). Rozdíl těchto dvou metod spočívá ve způsobu značení hledaného úseku DNA. PCR-RFLP k rozeznání a značení dané oblasti DNA využívá restriční enzymy, zatímco PCR-SSP využívá primery specifické k cílové sekvenci DNA (skupině alel), ve které se nachází hledaný SNP.

6.8.2.1.1 Molekulární genotypizace RHD metodou PCR-SSP

Sérologicky odlišitelné varianty RhD antigenu jsou známy již od roku 1946. V dnešní době je identifikováno více než 200 variant D antigenu, které lze ve většině případů prokázat pouze použitím molekulárně genetických metod. Z klinického hlediska je především nutné identifikovat slabé D typy 1, 2 a 3 za účelem uchování

zásob D negativních transfuzních přípravků a zamezit zbytečné podávání anti-D imunoglobulinu, jelikož tyto jedince lze považovat za D pozitivní. [16]

Genotypizace *RHD* včetně určení jeho slabých forem pomocí metody PCR-SSP byla rutinně zavedena ve Fakultní nemocnici v Ulmu, Německu v roce 1998 k určení nutnosti podání anti-D profylaxe u konkrétních prenatálních a poporodních případech. [35]

Testování založené na polymerázové řetězové reakci se sekvenčně specifickými primery umožňuje detekci, upřesnění a potvrzení neočekávaných nebo nejasných výsledků sérologických testů, včetně konfirmačního rozlišení Dweak/Dvariant. [35, 36] Jedná se o velmi užitečnou doplňkovou metodu, která má proti tradičním sérologickým metodám mnoho výhod, avšak z finančního a časového hlediska nelze v současné době v našich podmínkách PCR-SSP zařadit do rutinního provozu imunohematologických laboratoří.

Základním materiálem pro *RHD* genotypizaci je purifikovaná leukocytární DNA. Metoda PCR-SSP využívá sekvenčně specifické primery, kdy 3'-konec jednoho z primerů je plně komplementární k definované sekvenci DNA, v níž se nachází právě hledaný SNP. PCR produkt vznikne pouze v případě, že se daný SNP nachází ve vyšetřované DNA. Výsledné amplikony se pomocí agarózové gelové elektroforézy a ethidium bromidu separují na jednotlivé fragmenty a po ozáření UV světlem následuje vyhodnocení a odečet výsledků. [37]

Hlavní nevýhodou metody PCR-SSP je nutnost vizualizace konečných PCR produktů toxickým a mutagenním fluorescenčním barvivem Ethidiem bromidem. Každá reakce musí být optimalizována, jelikož primery jsou vždy zacíleny na rozdílné oblasti genů, a hlavní překážkou je volba teploty annealingu. Každý primer má své teplotní optimum a najít správné nastavení termocykléru pro všechny primery je velmi obtížné. Metoda je rovněž časově náročná a nelze ji automatizovat z důvodu subjektivního hodnocení výsledku. [3]

Příklady dalších aplikací metody PCR-SSP [35]:

- Genotypizace příjemců transfuze po vícečetných krevních převodech
- Genotypizace u pacientů po transplantaci krvetvorných buněk při neshodě v AB0 mezi dárce a příjemcem

- Genotypizace RhD- dárců krve s antigeny C nebo E k vyloučení přítomnosti *RHD* genu a tím zabránit anti-D aloimunizace u příjemců s velmi slabým typem částečného D fenotypu
- Identifikace genotypu u dárců v případě slabé exprese RhD
- Konfirmace RhD weak genotypu u příjemců k zamezení nepotřebného použití RhD- transfuzí
- Kontrola kvality sérologických metod
- Externí kontrola kvality

V roce 2012 na základě výsledků svého průzkumu vytvořily pracovní skupiny CAP (College of American Pathologists) a TMRC (Transfusion Medicine Resource Committee) jednotné celostátní postupy k rutinnímu zavádění *RHD* genotypizace metodou PCR-SSP u sérologických výsledků vyšetření RhD weak/variant. [38] Po vytvoření pracovní skupiny *RHD* genotypizace byl vydán závěr, že zavedením rutinní genotypizace RhD weak/variant lze zlepšit přesnost výsledku vyšetření Rh antigenu a zároveň dojde k redukci nepotřebného podání anti-D imunoglobulinu ženám s D weak fenotypem a sníží se i množství podaných RhD- transfuzí pacientům s D weak fenotypem. [39].

V současné době je genotypizace *RHD* metodou PCR-SSP prováděna u prvodárců krve, těhotných žen, novorozenců a potenciálních příjemců transfuze se sérologicky slabým či variantním D antigenem. Každý pacient, jehož genotyp *RHD* předpokládá RhD weak antigen typu 1, 2 nebo 3 by měl být komplexně léčen jako RhD pozitivní, ať už se jedná o výběr transfuzí nebo při rozhodování zda podat či nepodat anti-D Ig profylaxi. [39, 40]

6.8.2.2 *Techniky se středním až vysokým rozlišením (Medium to high-throughput techniques)*

Metody se střední až vysokou účinností jsou založeny na bázi real-time PCR a společně s metodami testování beadchip, microarray a liquid array, jejímž společným znakem je možnost rychlého a hromadného testování více rozdílných SNP současně.

6.8.2.2.1 *Real-time PCR*

U této metody je reakční směs PCR obohacena o interkalační barviva schopné fluorescence nebo o fluorescenční sondy, které při PCR reakci hybridizují k řetězcům nově vznikajících amplikonů. Záznam amplifikace je založen na principu fluorescence, neboť k emisi fluorescenčního záření dochází pouze v případě, že proběhla amplifikace templátové DNA. Kvantifikaci požadovaného úseku DNA lze sledovat v průběhu procesu, neboli v reálném čase a není potřeba následné elektroforetické detekce vzniklých PCR produktů. Reakce probíhá v termocykléru, který je oproti klasické verzi PCR navíc vybaven zdrojem záření (LED dioda, xenonová lampa nebo laser) a příslušným typem detektoru, jenž zaznamenává výslednou intenzitu fluorescence jako počet dopadajících fotonů. Fluorescenční sondy lze rozdělit na hydrolyzační sondy nebo hybridizační sondy. V současné době nejsou v imunohematologii metody založené na principu real-time PCR příliš využívány, lze je využít k detekci fetálního genotypu z plazmy matky. [41, 42]

6.8.2.2.2 *BeadChip microarray technologie*

BeadChip (BloodChip) genotypizace je metoda založená na mikroskopických čípech, které jsou využívány jako screeningová metoda k vyhledávání *RHD* a *RHCE* alelových variant, slabých a variantních D antigenů. Tato technologie poskytuje multiplexní analýzu amplifikovaných DNA fragmentů, díky které lze rozlišit až 80 genů variantních RhD antigenů. Princip metody spočívá v elongaci použité sondy navázané na barevné kuličce, která využívá PCR produkt jako svou matici. Podkladem pro čip bývá mikroskopické podložní sklo nebo plast, křemík či nověji i grafen. Sondy, jejímž zdrojem jsou syntetické jednořetězcové molekuly nukleové kyseliny, jsou na povrch čipu chemicky navázány pomocí barevně odlišitelných imobilizovaných kuliček nebo jsou přímo na povrchu čipu vyrobeny. Každá sonda je komplementární k různým úsekům DNA, a tím dochází k simultánní detekci specifických SNP. Výsledné PCR produkty na základě komplementarity hybridizují k oligonukleotidovým sondám. Každá kulička má průměr zhruba 3 μm a je obarvena unikátní barvou, která odpovídá konkrétní alele v dané metodě. Detekce je založena na snímání fluorescenčních signálů pomocí fluorescenčního mikroskopu. [3, 28, 43]

Kromě zmíněné microarray technologie patří mezi techniky se středním až vysokým rozlišením také sekvenování Sangerovou metodou, pyrosekvenování a sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS). U těchto metod dochází k sekvenaci DNA, díky které lze mapovat všechny cílové geny současně, a zároveň mohou být odhaleny dosud nepopsané mutace v genech systému Rh. Z důvodu finanční stránky, časové náročnosti a nedostatku komerčně dostupných metod nejsou v rutinní praxi transfuzní medicíny tyto metody k vyšetření Rh variantních D antigenů využívány.

Molekulární analýzy jsou metodou volby zásluhou jejich nejpřesnějšího určování komplexního Rh antigenního systému. Příslušné molekulární principy přispívají k prevenci inkompatibility krevních skupin při transfuzi, k vyloučení rizika aloimunizace a hemolytických potransfuzních reakcích. Odstraněním těchto rizik dojde k optimálnímu a dostatečnému přežití červených krvinek u osob s imunitním onemocněním, jejichž léčba vyžaduje pravidelné transfuze. [16]

7. PRAKTICKÁ ČÁST

V praktické části diplomové práce bylo hodnoceno a porovnáno zastoupení jednotlivých typů slabých a částečných RhD antigenů v souboru 220 vzorků vyšetřených na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové (FNHK). RhD fenotyp byl nejprve u všech vzorků určen sérologickou metodou, přičemž v případě diskrepance bylo indikováno molekulárně genetické vyšetření genotypu metodu PCR-SSP (firmy BAGene Health Care).

Retrospektivně získaná data byla rozdělena do 2 souborů - „Dárci krve a krevních složek“ a „Pacienti“, zahrnující všechny pacienty v předtrasfuzním vyšetření, pacienty v indikaci k možné transfuzi, transfudované pacienty, novorozené děti a těhotné ženy. Oba soubory byly následně rozděleny do kategorií podle pohlaví na muže a ženy. Počet všech vyšetřených vzorků v jednotlivých souborech a kategoriích je shrnut v Tabulce č. 7. Testování vzorků dárců probíhalo od ledna 2016 do prosince 2018 a vzorky pacientů byly shromažďovány od října 2015 do února 2019. Všechna hodnocená data byla získána z informačního systému Transfuzního oddělení a zpracována pomocí programu Microsoft Excel.

Tabulka 7: Souhrn počtu všech vyšetřených vzorků

	Dárci krve a krevních složek		Pacienti	
	Muži	Ženy	Muži	Ženy
	21	11	62	126
	32		188	
Celkem	220			

Výsledky jsou tvořeny porovnáním jednotlivých typů D weak/variant mezi muži a ženami v jednotlivých souborech a určením jejich procentuálního zastoupení v rámci sledovaného období. Případy, u kterých D weak/variant nebyl zjištěn, jsou okomentovány zvlášť v rámci samostatných podkapitol.

7.1 Sérologické metody

Na úseku sérologie Transfuzního oddělení FNHK jsou na automatickém analyzátoru pomocí diagnostických reagensů duplicitně vyšetřeny vzorky dárců krve. Vzorky pacientů a novorozenců jsou vyšetřovány na úseku expedice. Rozdíl mezi vyšetřením dárců krve a pacientů spočívá v povinnosti testovat dárce na přítomnost variantních D antigenů (D weak/variant) v nepřímém antiglobulinovém testu.

Vzorky pacientů a novorozenců byly testovány metodou sloupcové gelové aglutinace pomocí gelových karet DG Gel Newborn/Confirm firmy Grifols, určených k detekci či confirmaci krevního skupinového systému AB0 a Rh. Vzorky pacientů byly vyšetřeny gelovými kartami, jejíž mikrozkušavky obsahují polymerizovaný dextran v pufovaném médiu (obsahující specifické protilátky k dosažení aglutinace), s přidavkem konzervačních látek smíšených s diagnostickými séry. Pro vyšetření antigenů se do karet aplikuje 5% suspenze erytrocytů. Karty určené k vyšetření novorozenců fungují na obdobném principu, avšak s rozdílem v aplikaci 1% suspenze erytrocytů. [44]

7.1.1 Vzorky dárců krve a krevních složek

Vzorky dárců krve jsou vždy duplicitně vyšetřeny využitím automatického analyzátoru Galileo Neo (Immunocor, USA) pomocí dvou monoklonálních diagnostických antisér. První vzorek je vyšetřen pomocí NOVACLONE™ monoklonálního anti-D séra, směsí IgM + IgG protilátek k detekci D^{VI} varianty a IMUNOCLONE® monoklonálního anti-D rapid IgM, klonu RUM-1. U druhého vzorku je použito diagnostické sérum IMUNOCLONE® monoklonální anti-D rapid IgM, klonu RUM-1 a IMUNOCLONE® monoklonální anti-D duo, směsí IgM + IgG protilátek, klony TH28+MS26. [45]

7.1.2 Vzorky pacientů a novorozenců

Vzorky pacientů byly vyšetřeny pomocí gelových karet DG Gel Confirm (Grifols) a v mikrotitračních destičkách na automatickém imuno hematologickém analyzátoru Galileo Neo (firmy Immunocor, USA). Gelové karty slouží ke confirmaci krevních skupinových systémů AB0 a RhD metodou sloupcové (gelové) aglutinace. Každý vzorek se vyšetřuje dvojmo s využitím rozdílných monoklonálních IgM diagnostických

sér anti-D (panely monoklonálních protilátek zaměřené proti různým epitopům). K detekci se vždy využívá kombinace vyšetření pomocí gelových karet a analyzátoru Galileo Neo (firmy Immunocor, USA) nebo zkumavková metoda u pacientů před plánovanou operací nebo v případě nutnosti rychlého poskytnutí výsledku lékaři - vitální indikace, spolu s gelovými kartami. Negativní reakce s anti-D reagensy musí být vždy ověřena pomocí jiných diagnostických sér a technik, které jsou schopny detekovat různé varianty D antigenu.

Gelová karta obsahuje celkem 8 mikrozkušavek, které jsou tvořeny gelovým sloupcem, reakční/inkubační komůrkou. Na kartě se nacházejí 2 x 4 mikrozkušavky - mikrozkušavka A, B, D a kontrolní (Ctl.) k vyloučení falešně pozitivních výsledků. Mikrozkušavka D obsahuje monoklonální anti-D diagnostické sérum tvořené směsí IgG + IgM protilátek lidského původu, klony P3x290, P3x35, P3x61 a P3x21223 B10 detekující slabé D antigeny a částečné D varianty D antigenu, včetně DVI varianty. [44]

Vyšetřením D antigenu lze získat 3 rozdílné výsledky:

- **RhD pozitivní (+)** - proužek aglutinovaných erytrocytů na vrcholu gelového sloupce (jasně pozitivní reakce se všemi použitými diagnostickými séry anti-D).
- **RhD negativní (-)** - proužek erytrocytů na dně gelového sloupce bez viditelných aglutinátů ve sloupci (jasně negativní reakce se všemi použitými diagnostickými séry anti-D).
- **RhD^{w/v} (slabý D antigen/varianta D antigenu)** - v případě slabší reakce se všemi použitými diagnostickými séry anti-D nebo při pozitivitě v jedné reakci, zatímco druhá reakce je negativní, při rozdílu v síle reakcí použitých diagnostických sér, v případě, že se v séru pacienta, u kterého je předpoklad přítomnost RhD antigenu nachází, anti-D protilátka.

V případě neuzavřeného či diskrepantního výsledku je u všech vzorků pacientů indikována *RHD* genotypizace pomocí molekulárně genetických metod.

Gelová karta DG Gel Newborn (Grifols) je určená ke stanovení antigenů systému RhD a přímého Coombsova testu u novorozenců sloupcovou technikou. Karta je tvořena 8 mikroskopickými kádrami. Kromě mikroskopických kádrů A, B, AB určených ke stanovení krevního systému AB0, kontrolní mikroskopická kádra (Ctl.) a mikroskopických kádrů IgG a AHG, obsahuje karta 2 mikroskopické kádry k detekci Rh systému. Mikroskopická kádra D^{VI-} nedetekující variantu D^{VI+} obsahuje monoklonální anti-D IgM protilátku lidského původu, klonů P3x61. Druhá mikroskopická kádra D^{VI+} je tvořena monoklonální anti-D, směsí IgM protilátek lidského původu, klonů RUM-1 a ESD-1M. Tato monoklonální anti-D reagentie je určena k detekci slabých a částečných RhD antigenů, včetně varianty D^{VI-}. Výsledky se odečítají po centrifugaci karet. V případě pozitivní reakce (+) dojde na vrcholu gelového sloupce k vytvoření proužku aglutinovaných erytrocytů, zatímco při negativní reakci (-) se proužek erytrocytů nachází ve spodní části gelové karty. Interpretace výsledku vyšetření, respektive RhD antigenu je znázorněna v tabulce č. 8. [44]

Tabulka 8: Interpretace výsledku vyšetření RhD antigenu

Mikroskopická kádra D ^{VI-}	Mikroskopická kádra D ^{VI+}	Kontrolní mikroskopická kádra	Interpretace výsledku
+	+	-	D pozitivní
-	-	-	D negativní
+	-	-	D weak/D variant
-	+	-	

V případě diskrepantního výsledku v mikroskopických kádrách DVI- a DVI+ je výsledek interpretován jako nejasný – neuzavřený výsledek (slabý RhD antigen nebo varianta RhD antigenu - D weak/variant) a je indikována RHD genotypizace metodou PCR-SSP s cílem analyzovat, o jakou expresi RhD antigenu se jedná.

7.2 Molekulárně genetické metody

K *RHD* genotypizaci vzorků byla použita metodika PCR-SSP s následnou detekcí získaných PCR amplikonů horizontální agarózovou gelovou elektroforézou. Komerčně dodávaná testovací souprava BAGene RH-TYPE slouží k molekulárně genetické typizaci standardních *RHD/RHCE* alel spolu s typizací několika existujících RhD variant (D kat. VI, D kat. IV typ III, RHD ψ), DEL typu, a mnoha dalších. V případě, že ve výsledku vychází skupina RhD, měly by být provedeny další testy pomocí soupravy BAGene Parcial a Weak D-TYPE k vyloučení bodových mutací jako možné příčiny daných výsledků. Vyšetření probíhalo pomocí certifikované diagnostické molekulárně-genotypizační soupravy BAGene DNA-SSP kit firmy Health Care, registrované jako in-vitro diagnostikum, mající CE označení. Celá souprava se skládá z PCR destiček nebo proužků (stripů) spolu se sušenými barevnými reakčními směsmi obsahující alelově specifické primery, vnitřní amplifikační kontrolu - primery (specifické k *HGH* genu - Human Growth Hormone, nebo komplementární k sekvenci prvního chromozomu) a nukleotidy. Dále je součástí kitu PCR pufr, krytky PCR stripů, návod k použití soupravy, pracovní listy a vyhodnocovací diagramy. [46]

Průběh vyšetření metodou PCR-SSP a hodnocení horizontální gelovou elektroforézou

Základním materiálem určeným k typizaci pomocí BAGene DNA-SSP je purifikovaná leukocytární DNA. Použitím sekvenčně specifických primerů, které jsou specificky navrženy pro danou sekvenci DNA, dojde v případě jejich dokonalého nasednutí k amplifikaci a tvorbě amplikonů, které se následně vizualizují pomocí horizontálně uspořádané gelové elektroforézy. V prvním kroku testování dochází k cílené amplifikaci vyšetřovaného vzorku DNA pomocí DNA polymerázy společně s použitím firemně dodávané směsi sekvenčně specifických primerů. Poté následuje separace získaných amplikonů DNA o rozdílné velikosti v elektrickém poli pomocí gelové elektroforézy a barviva ethidium bromidu. Závěrečným krokem analýzy je identifikace velikosti amplikonů po UV ozáření gelu v transiluminátoru a konečná interpretace výsledků pomocí odečítacího diagramu. Výsledek analýzy je znám do 4 hodin od počátku vyšetření. [46, 47]

Princip PCR-SSP

Metoda využívající komerčně dodávané předsušené směsi primerů, které jsou speciálně navrženy pro konkrétní oblast sekvence DNA (skupinu alel). Principem je namnožení DNA, opakováním tří teplotních kroků. Prvotně dochází k denuraci (oddělení vláken dvoušroubovice DNA - dsDNA), následně k navázání - annealing primerů na základě komplementarity s templátem DNA a posledním krokem je extenze neboli prodlužování nového vlákna DNA. [47]

Princip ELFO

Elektromigrační separační metoda probíhající v 2 - 2,5% agarózovém gelu slouží k separaci získaných ampliconů DNA. Metoda je založena na principu migrace elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Elektrické pole se vytvoří vložením konstantního stejnosměrného napětí mezi dvě elektrody umístěné v elektrolytu, díky kterému je zajištěna vodivost celého systému. Po zapojení celého systému ke zdroji kationty migrují k zápornému pólu a anionty ke kladnému. Na základě odlišných rychlostí migrace získaných ampliconů DNA, z důvodu rozdílných velikostí, dojde v průběhu separace k vytvoření oddělených zón jednotlivých PCR produktů. Po skončení elektroforézy se gel obarví v roztoku fluorescenčního, interkalačního barviva ethidium bromidu (EtBr) ke zviditelnění separovaných fragmentů DNA. Barvivo se vmezeřuje = interkaluje mezi vlákna DNA a po ozáření UV transiluminátorem při vlnové délce 260-360 nm dojde k vyzáření fluorescence. [47, 48]

Princip UV transiluminátoru

Transiluminátor je zařízení, které se využívá k detekci separovaných ampliconů PCR. Po ozáření vloženého agarózového gelu obarveného barvivem ethidium bromidem UV světlem, nastane excitace fluorescenčního barviva navázaného v genomové DNA a současně dochází k emisi detekovatelného záření. Výsledný obraz je snímán kamerou a analyzován příslušným zobrazovacím softwarovým programem. Velikost jednotlivých svítících proužků = bandů, které svědčí o pozitivní reakci, se

porovnává s délkovým standardem. Výsledek vyšetření se posléze vyhodnotí pomocí odečítacího diagramu nebo počítačově s využitím aktuální verze softwaru. Délkový standard (velikostní standard) je komerční směs DNA fragmentů, tvořící pět bandů o známém počtu páru bází - 50, 200, 400, 850, 1500 bp. [49]

K detekci RhD variant byly použity testy pomocí soupravy BAGene Partial a Weak D-TYPE

- BAGene Partial D-TYPE umožňuje molekulárně geneticky stanovit D kategorie DII, DIII, DIV, DV, DVI, DVII spolu s částečným-D DAU, DBT, DFR, DHMi, DHMii, DNB, DHAR (Rh33).
- BAGene Weak D-TYPE umožňuje molekulárně genetické stanovení slabých D typů - D weak typ 1, 2, 3, 4.0/4.1, 4.2, 5, 11, 15 a 17.

Pracovní postup:

1. Izolace DNA:

Genomová DNA byla získána z 5 ml nesrážlivé krve odebrané do zkumavky obsahující protisrážlivé činidlo K₃EDTA. Vzorek DNA byl z krve extrahován pomocí komerčně dodávaného kitu QiAmp® DSP DNA blood firmy Qiagene. Součástí Mini Kitu jsou mimo kolonek určených k izolaci i roztok zásobního enzymu protézy určeného k lýze buněk erytrocytů. Dále se v balení nacházejí promývací pufr AW1 a AW2 určené k promytí a odstranění balastních látek z kolonky do sběrné zkumavky a v neposlední řadě eluční pufr AE a lyzační pufr AL. Posléze byla u extrahované dsDNA změřena výsledná koncentrace na fluorimetru Qubit®, a na základě koncentrace byl upraven vstupní objem DNA do reakční směsi „Master Mixu“ potřebného v PCR-SSP metodě (viz tabulka č. 9 ředění DNA). Vyextrahované vzorky genomové DNA byly ihned použity k analýze. [50]

V případě, že nelze DNA po izolaci bezprostředně vyšetřit, lze ji zamrazit při -20 °C a uchovat do doby, než je výsledek vyšetření uzavřen.

Tabulka 9: Ředění DNA [50]

Koncentrace DNA ng/μl	Ředění DNA v μl
do 20	neředit
21 - 40	3 μl DNA + 27 μl H ₂ O
41 - 130	2 μl DNA + 28 μl H ₂ O
> 600	1 μl DNA + 29 μl H ₂ O

2. PCR-SSP

Nejprve byly rozmrazeny příslušné mikrozkušavky se směsí připravených primerů a 10 x PCR pufr. Poté bylo připraveno konkrétní množství reakční směsi „Master Mix“ složené z uvedených složek v tabulce č. 10. K vyšetření bylo použito 8 bílých mikrozkušavek WEAK D-TYPE a 15 žlutých mikrozkušavek k vyšetření PARTIAL D-TYPE, do jehož poslední mikrozkušavky, která slouží jako negativní kontrola, bylo napipetováno 10 μl Master Mixu bez přídavku vzorku DNA. Následně byl k Master Mixu přidán příslušný objem DNA. Jednotlivé zkumavky byly umístěny do přístroje Thermal Cycler C1000TM firmy Bio-Rad, ve kterém probíhala amplifikace.

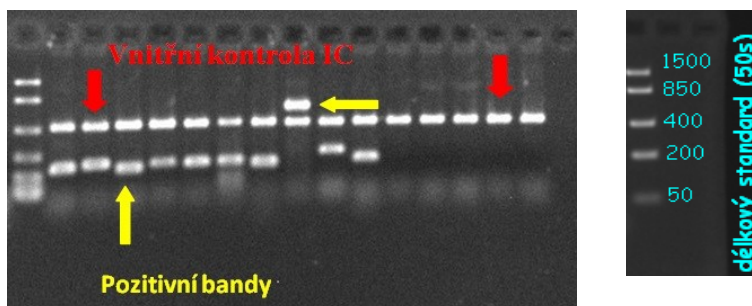
Tabulka 10: Příprava Master Mixu [50]

Reagencie	Množství v μl
Injekční voda	240
PCR pufr	30
Taq polymeráza	2,4
DNA	30

3. Detekce získaných PCR amplikonů a dokumentace výsledků

Do horizontální elektroforetické vany byl vložen gel s jamkami, do kterých byl pipetou nanášen celý objem 10 μl PCR amplikonů z mikrozkušavek, včetně negativní kontroly. Na každém gelu bylo pro jeden vzorek využito 26 jamek - 8 jamek k určení D weak typu, 15 jamek pro detekci D variant, 2 jamky pro aplikaci délkového standardu a 1 jamka negativní kontroly. Doprostřed gelu a do poslední jamky bylo vždy

napipetováno 5 μ l délkového standardu z důvodu kontroly velikosti jednotlivých PCR amplikonů. Poté bylo do elektroforetické vany přivedeno napětí 190 V a po dobu 17 minut probíhala separace. Posléze byl gel vyjmut z elektroforetické vany a následovalo uložení gelu do roztoku ethidium bromidu po dobu 10 minut. Po uplynuté době barvení byl gel umístěn na 20 minut do vany s destilovanou vodou z důvodu odbarvení. Posledním krokem bylo vložení gelu na pracovní plochu High Performance UV transiluminátoru Kodak Gel Logic 112 firmy Bio Tech. K fotodokumentaci ozářeného gelu slouží kamera s obrazovým softwarem připojená k počítači, kde se zhotovený obraz ukládá ve formě fotografie. Odečet a hodnocení pozitivních reakcí (svítících proužků) se provádí pomocí odečítacího diagramu nebo vyhodnocovacího softwaru, kde se porovnávají velikosti jednotlivých svítících proužků s délkovým standardem. Vyjma pozitivních reakcí musí být vždy na gelu (viz obrázek č. 9) a ve všech drahách přítomnost svítících proužků vnitřní kontroly bez specifických produktů jednotlivých alel o délce 434 bp spolu s negativní reakcí (nesvítící proužek) negativní kontroly.



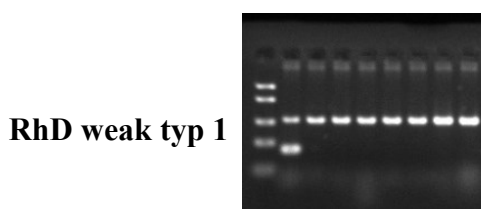
Obrázek 9: Výsledek PCR-SSP a délkový standard

Základ hodnocení výsledků tvoří vzniklé specifické proužky s odpovídající délkou, které byly odečítány pomocí vyhodnocovacích diagramů a pracovních listů Weak D-TYPE a Partial D-TYPE. V pracovních listech lze nalézt správnou, očekávanou velikost jednotlivých proužků. Hlavním krokem interpretace bylo zhodnocení přítomnosti svítících proužků (bandů) očekávané velikosti v konkrétní jamce gelu, svědčící o přítomnosti specifického PCR produktu konkrétních alel *RHD* = pozitivní reakce. Posouzením a odečtením délky proužků na gelu pomocí DNA délkového standardu, bylo určeno o jaký typ D weak/varianty se jednalo. Pouze proužky s odpovídající délkou (odečtenou podle délkového standardu DNA) byly hodnoceny jako pozitivní.

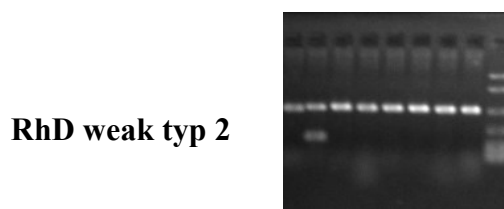
V případě RhD weak typu 1 byla zaznamenána pozitivní reakce v první jamce gelu, odpovídající velikosti 150 bp dle délkového standardu DNA, pozitivita RhD weak typu 1.1 odpovídá délce 250 a 150 bp. Záchyt RhD weak typu 2 odpovídá velikosti 126 bp, nacházející se ve druhé jamce gelu. D weak typ 3 byl vždy identifikován ve třetí jamce s velikostí bandu 165 bp.

V případě, že u dárce nebyl zachycen D weak ani D varianta, bylo pro uzavření výsledku RhD pozitivní/negativní rozhodující, zda jsou přítomny specifické PCR produkty v prvních 10 jamkách gelu za délkovým standardem potvrzující přítomnost alely *RHD*. Daná část gelu za délkovým standardem je tvořena 16 jamkami, které jsou určeny k detekci variant částečného D antigenu (15 jamek k zachycení specifických produktů alel, 16. jamka slouží jako negativní kontrola). Pozitivní reakce v 10 drahách svědčí o přítomnosti alely *RHD*01*, výsledek je uzavřen jako RhD pozitivní. Zaznamenáním positivity do pracovních listů Weak D-TYPE a Partial D-TYPE bylo určeno, jaký typ slabého D antigenu byl zachycen. Vzory pracovních listů, včetně příkladů vyhodnocených pracovních protokolů jsou uvedeny v Přílohách.

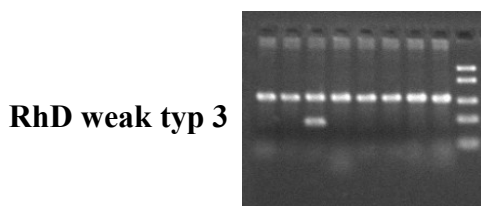
Na obrázcích č. 10 - 13 je vyfocena část gelu s pozitivní reakcí v příslušné jamce gelu, připadající konkrétnímu typu slabého D antigenu. Na obrázku gelu č. 13 nebyl žádný typ slabého D antigenu zachycen.



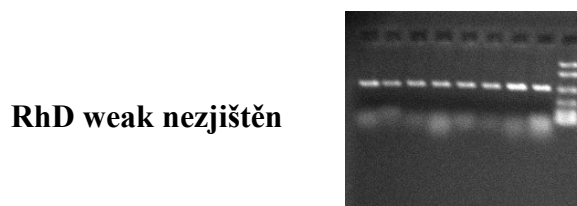
Obrázek 10: D weak typ 1



Obrázek 11: D weak typ 2



Obrázek 12: D weak typ 3

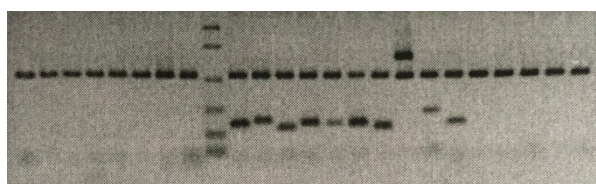


Obrázek 13: D weak nezjištěn

Na obrázcích č. 14 a 15 jsou zobrazeny dva rozdílné vzorky gelů, lišící se v konečné interpretaci výsledků vyšetření. U obou vzorků nebyl zachycen D weak ani D variant. Výsledek vyšetření u vzorku na obrázku č. 14 byl hodnocen jako RhD pozitivní, zatímco vzorek na obrázku č. 15 byl hodnocen RhD negativní, jelikož je zde patrná absence specifických proužků v prvních 10 jamkách za délkovým standardem, a na gelu jsou tak patrné pouze proužky interní kontroly. Z toho důvodu je výsledek vyšetření uzavřen jako RhD negativní.

RhD weak nezjištěn, D varianta nezjištěna

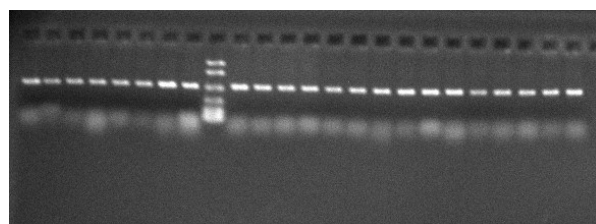
Závěr vyšetření: RhD pozitivní (RhD+)



Obrázek 14: Závěr vyšetření: D weak/varianta nezjištěna, RhD pozitivní

RhD weak nezjištěn, D varianta nezjištěna

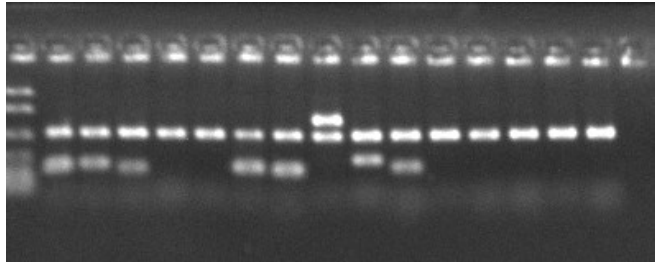
Závěr vyšetření: RhD negativní (RhD-)



Obrázek 15: Závěr vyšetření: D weak/varianta nezjištěna, RhD negativní

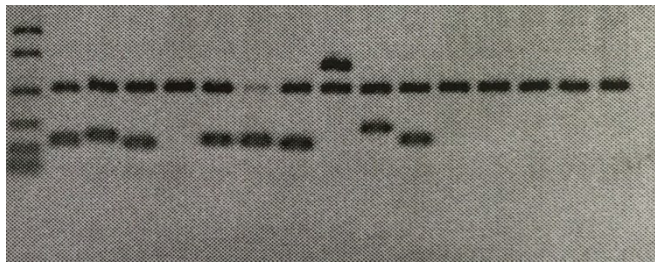
V případě, že je na gelu zachycena RhD varianta DVI, rozdíl mezi typy DVI varianty (typ 1 a typ 2) je viditelný již na gelu. Oba dva typy varianty DVI se liší v počtu pozitivních reakcí a také v jamkách, ve kterých pozitivitu nedetekujeme. V případě DVI typu 1 je pozitivita viditelná v osmi jamkách, přičemž v jamce č. 4 a 5 chybí. U varianty DVI typu 2 je pozitivita detekována v sedmi jamkách, vyjma jamek 3, 4 a 5.

RhD varianta DVI typ 1



Obrázek 16: RhD varianta DVI typ 1

RhD varianta DFR or RHD ψ



Obrázek 17: RhD varianta DFR or RHD ψ

8. VÝSLEDKY

Ve sledovaném období bylo na Transfuzním oddělení FNHK vyšetřeno celkem 20 902 vzorků prvodárců krve, novorozenců, pacientů a těhotných žen. Z daného počtu bylo celkem 220 vzorků odesláno k molekulárně genetické typizaci *RHD* z důvodu nejasného výsledku sérologického vyšetření. Tabulka č. 11 znázorňuje získané výsledky obou skupin společně, spolu se závěrem vyšetření, doporučením anti-D imunoprophylaxe u těhotných žen a procentuálním zastoupením jednotlivě zachycených atypických D antigenů napříč soubory, vztažených k souhrnnému počtu dat.

Tabulka 11: Celkový přehled získaných výsledků mezi dárci a pacienty

	Počet dárců + pacientů	Závěr vyšetření	RhIg profylaxe	Procentuální zastoupení
D weak typ 1	165	RhD pozitivní	Ne	75,0 %
D weak typ 1.1	1	RhD pozitivní	Ne	0,45 %
D weak typ 2	10	RhD pozitivní	Ne	4,5 %
D weak typ 3	28	RhD pozitivní	Ne	12,7 %
D weak nezjištěn, varianta nezjištěna	13	RhD pozitivní	Ne	6 %
<hr/>				
varianta DVI typ 1	1	RhD negativní	Ano	0,45 %
varianta DVI typ 2	1	RhD negativní	Ano	0,45 %
varianta DFR or RHD ψ	1	RhD negativní	Ano	0,45 %

8.1 Soubor výsledků „Dárci krve a krevních složek“

Ve sledovaném období od října 2015 do února roku 2019 bylo na Transfuzním oddělení FNHK celkově vyšetřeno 2 857 vzorků prvodárců krve a krevních složek, z toho 1 415 mužů a 1 443 žen. Z celkového počtu byl u 32 dárců sérologickými metodami zachycen D weak/variant, a dané vzorky byly následovně odeslány k vyšetření *RHD* genotypizaci metodou PCR-SSP k uzavření výsledků. Daný počet odpovídá 1,12 % celkovému výskytu RhD weak/variant v daném souboru za sledované období.

8.1.1 Výsledky *RHD* genotypizace u souboru „Dárci krve a krevních složek“

V rámci celého souboru prvodárců byl nejčastěji detekován D weak typ 1, a to u 20 dárců. Druhým nejčastějším typem D weak antigenu byl typ 3 s celkovým zastoupením u 7 dárců. D weak typ 2 byl prokázán pouze u dvou dárců.

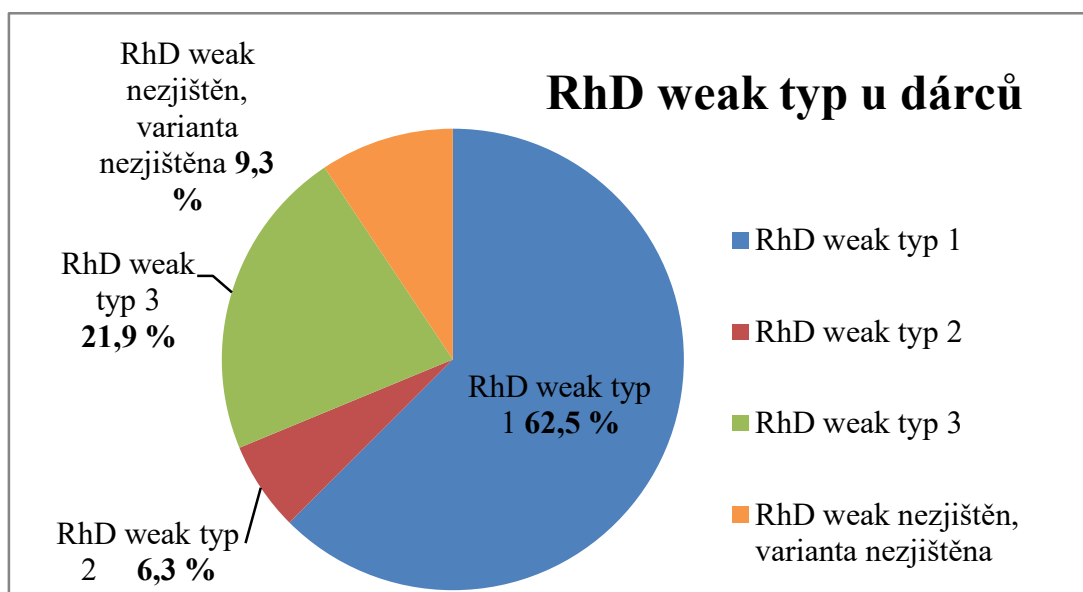
Výsledky všech 32 dárců krve a krevních složek byly uzavřeny a interpretovány jako RhD pozitivní. U tří dárců, u kterých nebyl zjištěn D weak ani D variant, bylo vyšetření uzavřeno jako RhD pozitivní, jelikož u nich byla prokázána přítomnost alely *RHD*01*.

Nejčastěji byl v rámci obou pohlaví zachycen D weak typ 1 s celkovým výskytem 62,5 %. Druhým nejčastějším detekovaným typem s frekvencí výskytu 21,3 % byl D weak typ 3. D weak typ 2 byl zachycen v 6,3 % případů. V 9,3 % případů nebyl D weak prokázán. U žádného dárce nebyl zjištěn variantní D antigen.

Tabulka č. 12 spolu s grafem č. 1 uvádí procentuální zastoupení všech detekovaných typů slabého D antigenu v daném souboru.

Tabulka 12: Soubor "Dárci krve a krevních složek": Zastoupení jednotlivých typů slabých D antigenů dle pohlaví

	Muži	Ženy
D weak typ 1	76,2 %	36,4 %
D weak typ 2	4,7 %	9,1 %
D weak typ 3	14,3 %	36,4 %
D weak typ nezjištěn, varianta nezjištěna	4,8 %	18,1 %



Graf 1: Zastoupení slabých D antigenů u dárců krve a krevních složek v období od ledna 2016 - prosince 2018

Soubor dárců byl rozdělen na muže a ženy, u kterých bylo posléze hodnoceno, v jakém zastoupení a procentu se vyskytují jednotlivé typy slabého nebo variantního D antigenu.

8.1.2 Dárci krve a krevních složek - Muži

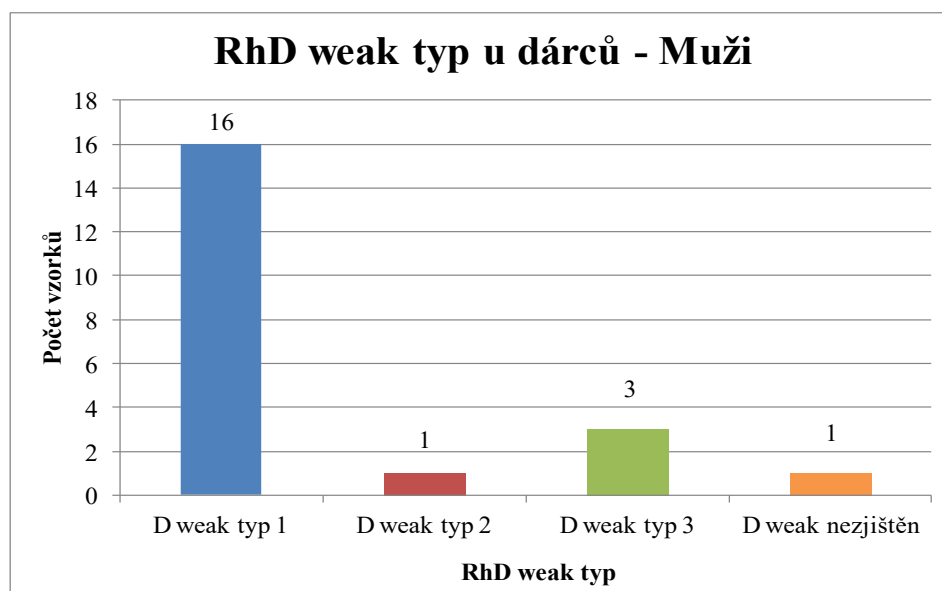
Tabulka 13: Soubor "Dárci krve a krevních složek – Muži": Počet vyšetření v období říjen 2015 - únor 2019

Pořadí	Číslo vzorku	Pohlaví	Ročník narození	RhD weak typ	RhD variant typ	Interpretace výsledku
1.	D - 0007/16	M	1995	1	-	RhD pozitivní
2.	D - 0006/16	M	1992	1	-	RhD pozitivní
3.	D - 0066/16	M	1992	1	-	RhD pozitivní
4.	D - 0083/16	M	1997	1	-	RhD pozitivní
5.	D - 0092/16	M	1993	1	-	RhD pozitivní
6.	D - 0098/16	M	1996	1	-	RhD pozitivní
7.	D - 0123/16	M	1993	1	-	RhD pozitivní
8.	D - 0163/16	M	1998	3	-	RhD pozitivní
9.	D - 0166/16	M	1953	1	-	RhD pozitivní
10.	D - 0261/16	M	1956	2	-	RhD pozitivní

11.	D - 0317/16	M	1969	1	-	RhD pozitivní
12.	D - 0058/17	M	1987	-	-	RhD pozitivní
13.	D - 0107/17	M	1980	1	-	RhD pozitivní
14.	D - 0161/17	M	1970	3	-	RhD pozitivní
15.	D - 0165/17	M	1993	1	-	RhD pozitivní
16.	D - 0216/17	M	1984	1	-	RhD pozitivní
17.	D - 0232/17	M	1949	3	-	RhD pozitivní
18.	D - 0231/17	M	1984	1	-	RhD pozitivní
19.	D - 0238/17	M	1957	1	-	RhD pozitivní
20.	D - 0089/18	M	1999	1	-	RhD pozitivní
21.	D - 0210/18	M	1997	1	-	RhD pozitivní

Tabulka č. 13 uvádí vyšetřené vzorky dárců krve mužského pohlaví. Průměrný věk dárců byl 35 let. U 20 vzorků byla detekována exprese slabého D antigenu = D weak. Z celkového počtu 21 vzorků byl v 16 případech zachycen D weak typ 1, v jednom případě zachycen D weak typ 2 a D weak typ 3 byl zjištěn u 3 vzorků. U jednoho vzorku nebyl zachycen žádný typ slabého D antigenu ani částečný D antigen.

Výsledky jsou barevně odlišeny a zobrazeny v grafu č. 2 a zastoupení detekovaných typů D weak antigenu je zaznačeno v tabulce č. 14.



Graf 2: Srovnání zastoupení jednotlivých RhD weak typů u dárců mužů

Tabulka 14: Soubor "Dárci krve a krevních složek – Muži": Početní a procentuální zastoupení jednotlivých typů RhD weak

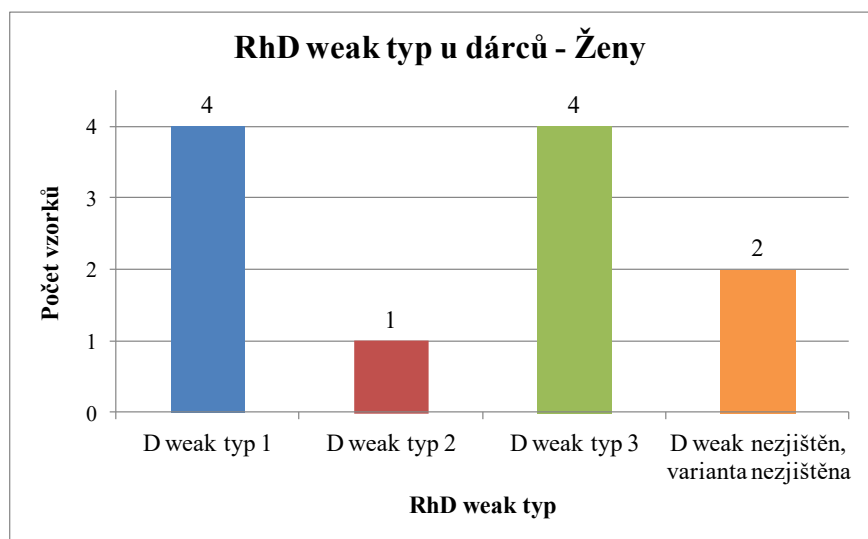
Dárci krve a krevních složek – Muži		
	Celkový počet	Procentuální zastoupení
D weak typ 1	16	76,2 %
D weak typ 2	1	4,7 %
D weak typ 3	3	14,3 %
D weak nezjištěn, varianta nezjištěna	1	4,8 %

8.1.3 Dárci krve a krevních složek – Ženy

Tabulka 15: Soubor "Dárci krve a krevních složek – Ženy": Počet vyšetření v období od října 2015 - února 2019

Pořadí	Číslo vzorku	Pohlaví	Ročník narození	RhD weak typ	RhD variant typ	Interpretace vyšetření
1.	D - 0246/16	Ž	1993	3	-	RhD pozitivní
2.	D - 0287/16	Ž	1991	-	-	RhD pozitivní
3.	D - 0368/16	Ž	1975	3	-	RhD pozitivní
4.	D - 0042/17	Ž	1960	-	-	RhD pozitivní
5.	D - 0091/17	Ž	1953	1	-	RhD pozitivní
6.	D - 0108/17	Ž	1993	1	-	RhD pozitivní
7.	D - 0168/17	Ž	1943	1	-	RhD pozitivní
8.	D - 0191/17	Ž	1999	3	-	RhD pozitivní
9.	D - 0193/17	Ž	1947	3	-	RhD pozitivní
10.	D - 0302/17	Ž	1985	2	-	RhD pozitivní
11.	D - 0328/17	Ž	1997	1	-	RhD pozitivní

V tabulce č. 15 jsou uvedeny vyšetřené vzorky dárců krve ženského pohlaví. Průměrný věk dáreků byl 41 let. U 9 vzorků, byly určeny typy slabého D antigenu. Z celkového počtu 11 vzorků byl ve 4 případech zachycen D weak typ 1, v jednom případě zjištěn D weak typ 2. Expres RhD weak typu 3 byla zachycena u 4 vzorků a u dvou vzorků nebyl zachycen D weak ani D variant. Graf č. 3 uvádí barevné srovnání jednotlivých D weak typů u dáreků.



Graf 3: Srovnání zastoupení jednotlivých RhD weak typů u dárců žen

Tabulka 16: Soubor "Dárci krve a krevních složek – Ženy": Početní a procentuální zastoupení jednotlivých typů RhD weak

Dárci krve a krevních složek - Ženy		
	Celkový počet	Procentuální zastoupení
D weak typ 1	4	36,4 %
D weak typ 2	1	9,1 %
D weak typ 3	4	36,4 %
D weak nezjištěn, varianta nezjištěna	2	18,1 %

8.2 Soubor „Pacienti - pacienti FNHK a těhotné ženy“

Soubor obsahující konečný počet všech vzorků pacientů ve sledovaném období od října 2015 do února 2019, kdy bylo na Transfuzním oddělení FNHK vyšetřeno celkově 18 045 pacientů FNHK. Soubor „Pacienti“, je tvořen 188 vzorky pacientů včetně novorozenců a těhotných žen, u kterých nebylo možné antigen RhD určit sérologickými metodami. Daný počet odpovídá 1,04% výskytu atypických forem RhD antigenu v daném souboru za sledované období.

8.2.1.1 Výsledky RHD genotypizace u souboru „Pacienti“

Výsledky RHD genotypizace u souboru, který zahrnuje pacienty FNHK (včetně příjemců transfuze), novorozence a těhotné ženy, jsou tvořeny 188 vzorky, z nichž u

175 vzorků bylo zjištěno různorodé zastoupení jednotlivých typů slabého D antigenu, u tří pacientů byly detekovány varianty D antigenu. U 10 pacientů nebyl detekován slabý ani variantní D antigen.

Shodně se souborem dárců krve byl nejčastěji detekován D weak typ 1, konkrétně u 145 pacientů. Antigen D weak typu 2 byl detekován u 8 pacientů a byl tak třetím nejčastějším zachyceným typem. D weak typ 3 byl prokázán u 21 pacientů. U jedné pacientky byl zachycen D weak typ 1.1 (vzorek D - 0061/17).

U tří pacientů byla zjištěna varianta D antigenu. Konkrétně se u vzorku D - 0193/16 jednalo o DVI variantu typu 2, u vzorku D - 0313/17 byla zjištěna varianta DVI typ 1 a jedenkrát byla, u vzorku D - 0131/18, zachycena varianta DFR or RHD ψ . U 9 pacientů nebyl zjištěn D weak ani žádný variantní D antigen, přesto byly výsledky čtyř pacientů uzavřeny jako RhD pozitivní, jelikož u nich byla prokázána pozitivita v 10 jamkách gelu za délkovým standardem, prokazující přítomnost alely $RH*01 = RhD$ pozitivní. Vzorky zbývajících pěti pacientů byly hodnoceny jako RhD negativní z důvodu chybějící positivity této alely.

Výsledky RhD pozitivní byly uzavřeny a interpretovány u 180 pacientů, výsledky RhD negativní u 8 pacientů FNHK.

V rámci obou pohlaví byl nejvíce zastoupen D weak typ 1 s celkovým výskytem 77,1 %. Druhým nejčastěji detekovaným typem slabého D antigenu s celkovou incidencí výskytu 11,2 % v souboru byl D weak typ 3. D weak typ 2 byl zachycen u 4,2 % případů, a s frekvencí výskytu 5,3 % nebyly žádné typy slabého ani varianty D antigenu prokázány. Všechny dosažené výsledky slabého D antigenu jsou shrnuty v tabulce č. 17, tabulka č. 18 uvádí zastoupení detekovaných variant D antigenu.

Tabulka 17: Soubor "Pacienti" : Zastoupení jednotlivých typů slabých D antigenu dle pohlaví

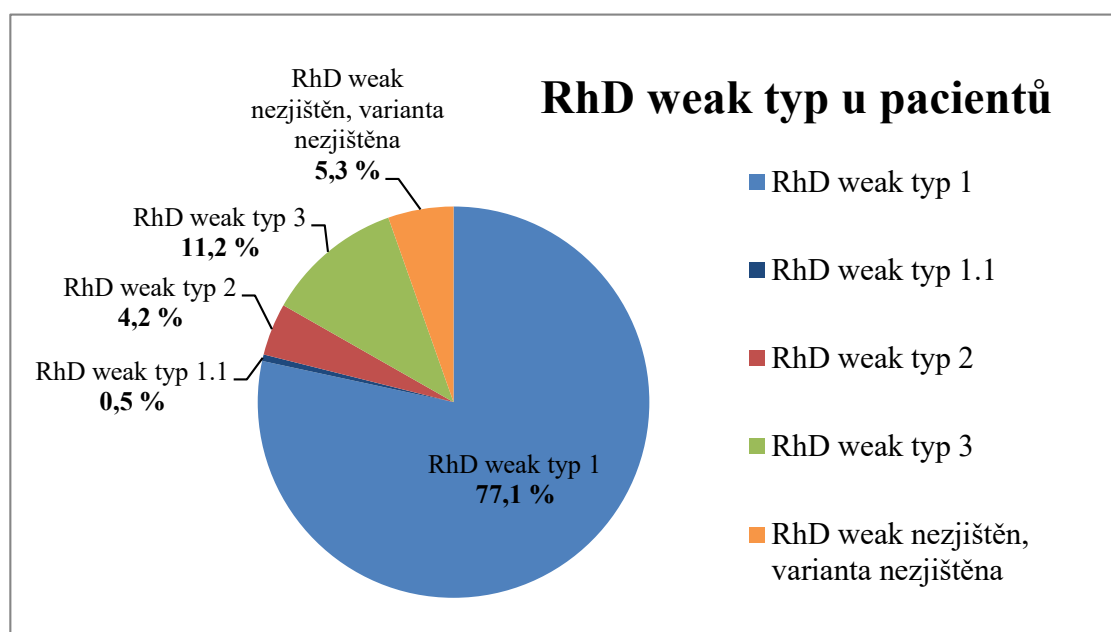
	Muži	Ženy
D weak typ 1	74,2 %	78,6 %
D weak typ 1.1	-	0,8 %
D weak typ 2	1,6 %	5,6 %
D weak typ 3	14,5 %	9,5 %
D weak typ nezjištěn, D varianta nezjištěna	6,5 %	4,7 %

V daném souboru byla jedenkrát zachycena varianta DVI typ 1, jedenkrát D varianta DVI typu 2 a v jednom případě byla detekována varianta DFR or RHD ψ . Varianta DFR or RHD patří mezi velmi raritně vyskytující se variantu částečného D antigenu a pro její rozlišení, zda se jedná o DFR nebo RHD ψ , by bylo potřeba vzorek dovyšetřit pomocí BAGene RH-TYPE kitu.

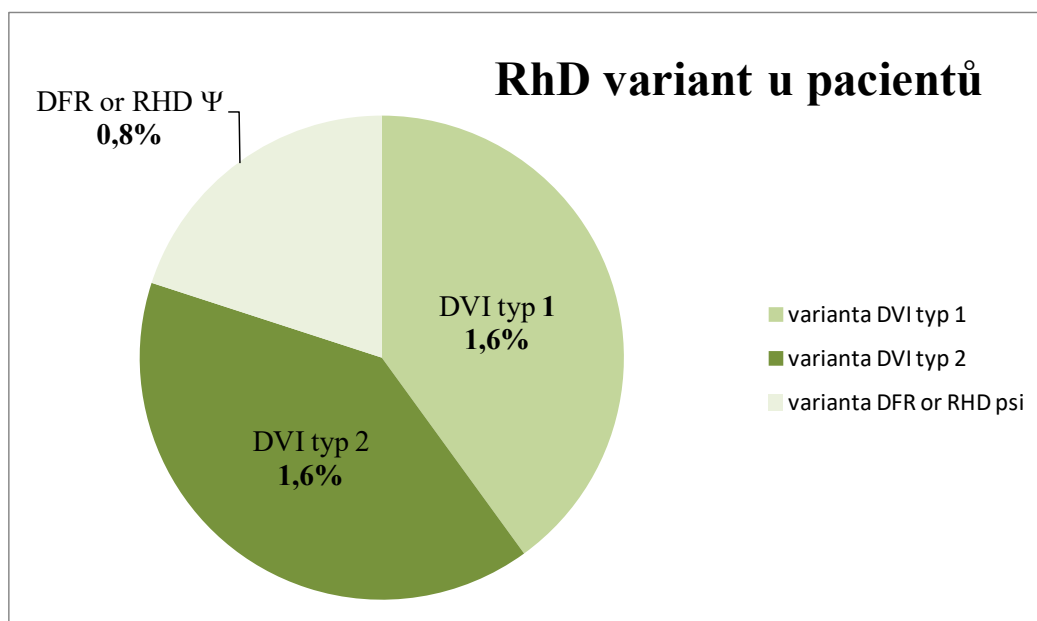
Tabulka 18: Soubor "Pacienti" : Zastoupení detekovaných variantních D antigenů dle pohlaví

	Muži	Ženy
D varianta - DVI typ 1	1,6 %	-
D varianta - DVI typ 2	1,6 %	-
D varianta - DFR or RHD ψ	-	0,8 %

Graf č. 4 uvádí zastoupení typů D weak antigenů u napříč celým souborem pacientů. Míra záchytu D variant u pacientů je uvedena v grafu č. 5.



Graf 4: Zastoupení slabých typů D antigenu u pacientů FNHK v období od října 2015 - února 2019



Graf 5: Zastoupení detekovaných variant D antigenu u pacientů FNHK v období od října 2015 - února 2019

Soubor „Pacienti“ je stejně jako Soubor „Dárci krve a krevních složek“ rozdělen na muže a ženy.

8.2.2 Pacienti - Muži

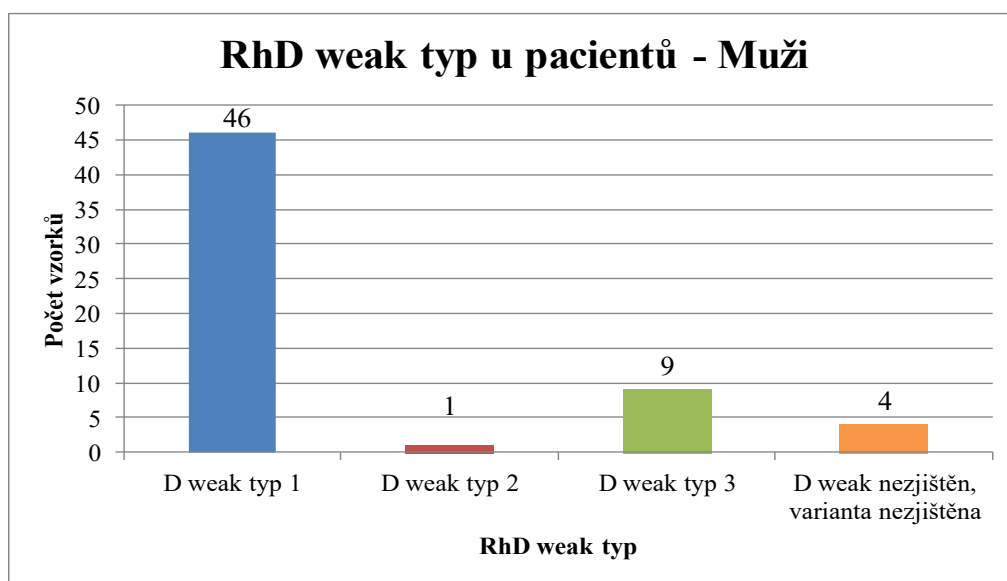
Tabulka 19: Soubor "Pacienti – Muži": Počet vyšetření v období od října 2015 - února 2019

Pořadí	Číslo vzorku	Pohlaví	Ročník narození	RhD weak typ	RhD variant typ	Interpretace vyšetření
1.	D - 0454/15	M	2015	1	-	RhD pozitivní
2.	D - 0499/15	M	2015	1	-	RhD pozitivní
3.	D - 0507/15	M	2015	1	-	RhD pozitivní
4.	D - 0512/15	M	1931	-	-	RhD negativní
5.	D - 0513/15	M	2015	1	-	RhD pozitivní
6.	D - 0016/16	M	1955	1	-	RhD pozitivní
7.	D - 0024/16	M	1941	1	-	RhD pozitivní
8.	D - 0046/16	M	1955	1	-	RhD pozitivní
9.	D - 0105/16	M	1959	3	-	RhD pozitivní
10.	D - 0121/16	M	2016	1	-	RhD pozitivní
11.	D - 0135/16	M	2016	1	-	RhD pozitivní
12.	D - 0193/16	M	1955	-	D VI type 2	RhD negativní
13.	D - 0219/16	M	2016	3	-	RhD pozitivní
14.	D - 0245/16	M	1997	1	-	RhD pozitivní

15.	D - 0267/16	M	1988	1	-	RhD pozitivní
16.	D - 0327/16	M	1956	3	-	RhD pozitivní
17.	D - 0330/16	M	1972	1	-	RhD pozitivní
18.	D - 0339/16	M	2016	1	-	RhD pozitivní
19.	D - 0023/17	M	1973	-	-	RhD pozitivní
20.	D - 0028/17	M	2017	1	-	RhD pozitivní
21.	D - 0095/17	M	1948	1	-	RhD pozitivní
22.	D - 0111/17	M	1974	1	-	RhD pozitivní
23.	D - 0126/17	M	1984	1	-	RhD pozitivní
24.	D - 0194/17	M	1972	3	-	RhD pozitivní
25.	D - 0207/17	M	1976	1	-	RhD pozitivní
26.	D - 0234/17	M	1943	1	-	RhD pozitivní
27.	D - 0289/17	M	1948	1	-	RhD pozitivní
28.	D - 0290/17	M	2013	1	-	RhD pozitivní
29.	D - 0298/17	M	1939	3	-	RhD pozitivní
30.	D - 0313/17	M	2017	-	D VI type 1	RhD negativní
31.	D - 0013/18	M	2018	1	-	RhD pozitivní
32.	D - 0019/18	M	1969	1	-	RhD pozitivní
33.	D - 0024/18	M	1930	1	-	RhD pozitivní
34.	D - 0042/18	M	2018	1	-	RhD pozitivní
35.	D - 0077/18	M	1956	1	-	RhD pozitivní
36.	D - 0088/18	M	2014	1	-	RhD pozitivní
37.	D - 0105/18	M	2018	1	-	RhD pozitivní
38.	D - 0121/18	M	1958	1	-	RhD pozitivní
39.	D - 0126/18	M	1950	1	-	RhD pozitivní
40.	D - 0145/18	M	1933	2	-	RhD pozitivní
41.	D - 0151/18	M	1940	1	-	RhD pozitivní
42.	D - 0157/18	M	1948	3	-	RhD pozitivní
43.	D - 0170/18	M	1953	3	-	RhD pozitivní
44.	D - 0180/18	M	2018	1	-	RhD pozitivní
45.	D - 0186/18	M	1961	1	-	RhD pozitivní
46.	D - 0197/18	M	2018	-	-	RhD negativní
47.	D - 0199/18	M	1949	1	-	RhD pozitivní
48.	D - 0201/18	M	2018	3	-	RhD pozitivní
49.	D - 0204/18	M	2018	1	-	RhD pozitivní
50.	D - 0206/18	M	2018	1	-	RhD pozitivní
51.	D - 0208/18	M	1937	1	-	RhD pozitivní
52.	D - 0212/18	M	2018	1	-	RhD pozitivní
53.	D - 0216/18	M	2018	1	-	RhD pozitivní
54.	D - 0218/18	M	2018	1	-	RhD pozitivní
55.	D - 0224/18	M	1981	1	-	RhD pozitivní
56.	D - 0242/18	M	1990	1	-	RhD pozitivní
57.	D - 0262/18	M	2018	1	-	RhD pozitivní
58.	D - 0280/18	M	2018	1	-	RhD pozitivní
59.	D - 0281/18	M	1993	-	-	RhD pozitivní
60.	D - 0282/18	M	2018	3	-	RhD pozitivní

61.	D - 0010/19	M	1967	1	-	RhD pozitivní
62.	D - 0027/19	M	1942	1	-	RhD pozitivní

Přehled všech vzorků mužského pohlaví u pacientů FNHK uvádí tabulka č. 19. Průměrný věk pacientů je 32 let. Z celkového počtu 62 vzorků byl u 56 pacientů detekován konkrétní typ slabého D antigenu. RhD weak typ 1 byl prokázán ve 46 případech, u 1 pacienta se jednalo o D weak typ 2, u 9 pacientů byl zachycen D weak typ 3. Ve 4 případech nebyl prokázán žádný typ D weak ani D varianty, viz graf č. 6.



Graf 6: Srovnání zastoupení jednotlivých RhD weak typů u pacientů mužů

U vzorku D - 0193/16 (pořadí č. 12) a D - 0313/17 (pořadí č. 30) byly detekovány varianty D antigenu. V prvním případě se jednalo o variantu D kategorie VI typ 2, ve druhém o variantu DVI typ 1.

Tabulka 20: Soubor "Pacienti – Muži": Početní a procentuální zastoupení jednotlivých typů slabého D antigenu a variant částečného D antigenu

Pacienti (novorozenci, pacienti, příjemci transfuze) – Muži		
	Celkový počet	Procentuální zastoupení
D weak typ 1	46	74,2 %
D weak typ 2	1	1,6 %
D weak typ 3	9	14,5 %
D weak nezjištěn,	4	6,5 %
D varianta DVI typ 1	1	1,6 %
D varianta DVI typ 2	1	1,6 %

8.2.3 Pacienti - Ženy

Soubor žen zahrnuje vzorky pacientek, novorozenců, příjemkyň transfuze a těhotných žen.

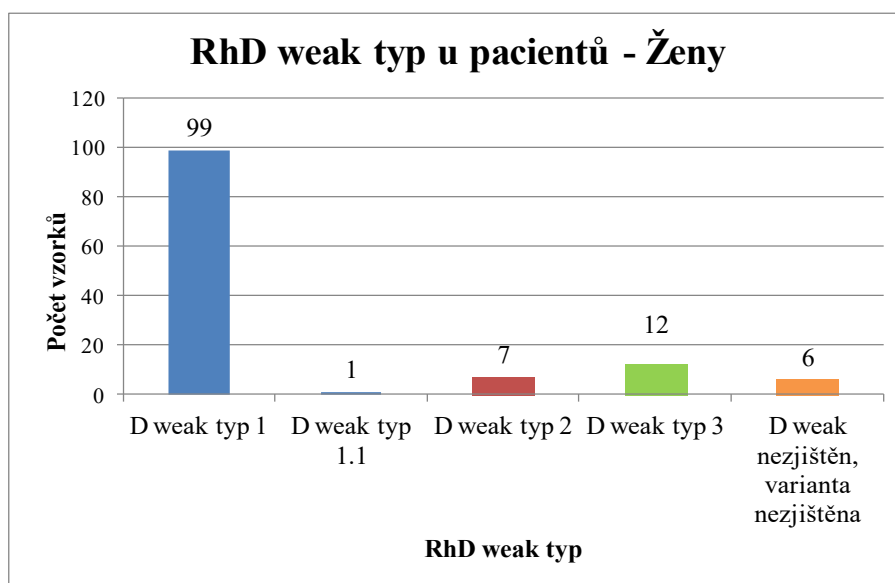
Tabulka 21: Soubor "Pacienti – Ženy": Počet vyšetření v období od října 2015 - února 2019

Pořadí	Číslo vzorku	Pohlaví	Ročník narození	RhD weak typ	RhD variant typ	Interpretace vyšetření
1.	D - 0452/15	Ž	1986	3	-	RhD pozitivní
2.	D - 0455/15	Ž	1983	1	-	RhD pozitivní
3.	D - 0458/15	Ž	1978	1	-	RhD pozitivní
4.	D - 0473/15	Ž	1987	-	-	RhD pozitivní
5.	D - 0500/15	Ž	1987	1	-	RhD pozitivní
6.	D - 0505/15	Ž	1986	3	-	RhD pozitivní
7.	D - 0014/16	Ž	1985	1	-	RhD pozitivní
8.	D - 0025/16	Ž	2016	-	-	RhD negativní
7	D - 0036/16	Ž	1985	1	-	RhD pozitivní
10.	D - 0040/16	Ž	1997	1	-	RhD pozitivní
11.	D - 0047/16	Ž	1989	2	-	RhD pozitivní
12.	D - 0073/16	Ž	1987	3	-	RhD pozitivní
13.	D - 0075/16	Ž	2016	1	-	RhD pozitivní
14.	D - 0078/16	Ž	1992	1	-	RhD pozitivní
15.	D - 0080/16	Ž	1990	1	-	RhD pozitivní
16.	D - 0104/16	Ž	1950	1	-	RhD pozitivní
17.	D - 0109/16	Ž	1994	1	-	RhD pozitivní
18.	D - 0110/16	Ž	1951	1	-	RhD pozitivní
19.	D - 0134/16	Ž	1998	1	-	RhD pozitivní
20.	D - 0152/16	Ž	1993	1	-	RhD pozitivní
21.	D - 0155/16	Ž	2016	1	-	RhD pozitivní
22.	D - 0165/16	Ž	1986	3	-	RhD pozitivní
23.	D - 0235/16	Ž	2001	1	-	RhD pozitivní
24.	D - 0237/16	Ž	1938	1	-	RhD pozitivní
25.	D - 0251/16	Ž	1990	2	-	RhD pozitivní
26.	D - 0258/16	Ž	1955	1	-	RhD pozitivní
27.	D - 0281/16	Ž	2016	1	-	RhD pozitivní
28.	D - 0295/16	Ž	1962	1	-	RhD pozitivní
29.	D - 0305/16	Ž	1929	1	-	RhD pozitivní
30.	D - 0315/16	Ž	1953	1	-	RhD pozitivní
31.	D - 0352/16	Ž	1984	1	-	RhD pozitivní
32.	D - 0359/16	Ž	1935	3	-	RhD pozitivní
33.	D - 0357/16	Ž	1998	1	-	RhD pozitivní
34.	D - 0364/16	Ž	1987	1	-	RhD pozitivní
35.	D - 0005/17	Ž	1995	3	-	RhD pozitivní
36.	D - 0010/17	Ž	1998	1	-	RhD pozitivní
37.	D - 0013/17	Ž	2017	1	-	RhD pozitivní

38.	D - 0018/17	Ž	1987	1	-	RhD pozitivní
39.	D - 0030/17	Ž	1988	1	-	RhD pozitivní
40.	D - 0043/17	Ž	1985	1	-	RhD pozitivní
41.	D - 0061/17	Ž	1986	1.1()	-	RhD pozitivní
42.	D - 0062/17	Ž	1992	1	-	RhD pozitivní
43.	D - 0066/17	Ž	1993	1	-	RhD pozitivní
44.	D - 0102/17	Ž	1990	2	-	RhD pozitivní
45.	D - 0125/17	Ž	1985	1	-	RhD pozitivní
46.	D - 0149/17	Ž	1960	1	-	RhD pozitivní
47.	D - 0155/17	Ž	1982	1	-	RhD pozitivní
48.	D - 0162/17	Ž	1992	1	-	RhD pozitivní
49.	D - 0192/17	Ž	1988	1	-	RhD pozitivní
50.	D - 0197/17	Ž	2017	1	-	RhD pozitivní
51.	D - 0198/17	Ž	1982	1	-	RhD pozitivní
52.	D - 0208/17	Ž	1986	1	-	RhD pozitivní
53.	D - 0215/17	Ž	2017	1	-	RhD pozitivní
54.	D - 0233/117	Ž	1997	1	-	RhD pozitivní
55.	D - 0235/17	Ž	1989	1	-	RhD pozitivní
56.	D - 0248/17	Ž	1942	-	-	RhD pozitivní
57.	D - 0273/17	Ž	1991	1	-	RhD pozitivní
58.	D - 0287/17	Ž	1986	1	-	RhD pozitivní
59.	D - 0306/17	Ž	1972	1	-	RhD pozitivní
60.	D - 0310/17	Ž	1986	1	-	RhD pozitivní
61.	D - 0320/17	Ž	1990	1	-	RhD pozitivní
62.	D - 0325/17	Ž	1993	1	-	RhD pozitivní
63.	D - 0343/17	Ž	1924	3	-	RhD pozitivní
64.	D - 0349/17	Ž	1992	1	-	RhD pozitivní
65.	D - 0001/18	Ž	1985	1	-	RhD pozitivní
66.	D - 0002/18	Ž	1988	1	-	RhD pozitivní
67.	D - 0008/18	Ž	1976	3	-	RhD pozitivní
68.	D - 0014/18	Ž	1992	1	-	RhD pozitivní
69.	D - 0025/18	Ž	1998	1	-	RhD pozitivní
70.	D - 0026/18	Ž	1990	1	-	RhD pozitivní
71.	D - 0033/18	Ž	1990	1	-	RhD pozitivní
72.	D - 0039/18	Ž	1988	2	-	RhD pozitivní
73.	D - 0058/18	Ž	1988	1	-	RhD pozitivní
74.	D - 0060/18	Ž	1985	1	-	RhD pozitivní
75.	D - 0061/18	Ž	1988	1	-	RhD pozitivní
76.	D - 0062/18	Ž	1953	1	-	RhD pozitivní
77.	D - 0066/18	Ž	1992	1	-	RhD pozitivní
78.	D - 0067/18	Ž	1996	1	-	RhD pozitivní
79.	D - 0076/18	Ž	2000	1	-	RhD pozitivní
80.	D - 0090/18	Ž	1999	1	-	RhD pozitivní
81.	D - 0091/18	Ž	1986	1	-	RhD pozitivní
82.	D - 0101/18	Ž	1952	1	-	RhD pozitivní
83.	D - 0131/18	Ž	1939	-	DFR or RHD	RhD negativní

84.	D - 0138/18	Ž	1999	1	-	RhD pozitivní
85.	D - 0149/18	Ž	1971	2	-	RhD pozitivní
86.	D - 0150/18	Ž	2018	1	-	RhD pozitivní
87.	D - 0154/18	Ž	2018	1	-	RhD pozitivní
88.	D - 0165/18	Ž	1995	1	-	RhD pozitivní
89.	D - 0168/18	Ž	1983	1	-	RhD pozitivní
90.	D - 0169/18	Ž	1994	3	-	RhD pozitivní
91.	D - 0171/18	Ž	1990	1	-	RhD pozitivní
92.	D - 0174/18	Ž	1990	1	-	RhD pozitivní
93.	D - 0176/18	Ž	1981	1	-	RhD pozitivní
94.	D - 0181/18	Ž	1989	1	-	RhD pozitivní
95.	D - 0189/18	Ž	1992	1	-	RhD pozitivní
96.	D - 0192/18	Ž	1986	1	-	RhD pozitivní
97.	D - 0209/18	Ž	1957	1	-	RhD pozitivní
98.	D - 0214/18	Ž	1992	1	-	RhD pozitivní
99.	D - 0217/18	Ž	1991	1	-	RhD pozitivní
100.	D - 0219/18	Ž	2004	1	-	RhD pozitivní
101.	D - 0220/18	Ž	1996	1	-	RhD pozitivní
102.	D - 0221/18	Ž	1993	1	-	RhD pozitivní
103.	D - 0222/18	Ž	1946	-	-	RhD negativní
104.	D - 0223/18	Ž	1976	1	-	RhD pozitivní
105.	D - 0230/18	Ž	1991	1	-	RhD pozitivní
106.	D - 0231/18	Ž	1988	1	-	RhD pozitivní
107.	D - 0232/18	Ž	1992	1	-	RhD pozitivní
108.	D - 0238/18	Ž	1991	1	-	RhD pozitivní
109.	D - 0241/18	Ž	2001	1	-	RhD pozitivní
110.	D - 0245/18	Ž	1948	-	-	RhD negativní
111.	D - 0259/18	Ž	1985	2	-	RhD pozitivní
112.	D - 0261/18	Ž	1961	1	-	RhD pozitivní
113.	D - 0265/18	Ž	1954	2	-	RhD pozitivní
114.	D - 0267/18	Ž	1990	1	-	RhD pozitivní
115.	D - 0268/18	Ž	1984	3	-	RhD pozitivní
116.	D - 0274/18	Ž	1996	-	-	RhD pozitivní
117.	D - 0286/18	Ž	1980	1	-	RhD pozitivní
118.	D - 0290/18	Ž	2018	1	-	RhD pozitivní
119.	D - 0291/18	Ž	1990	1	-	RhD pozitivní
120.	D - 0292/18	Ž	1943	1	-	RhD pozitivní
121.	D - 0293/18	Ž	1994	1	-	RhD pozitivní
122.	D - 0005/19	Ž	2017	1	-	RhD pozitivní
123.	D - 0008/19	Ž	1993	3	-	RhD pozitivní
124.	D - 0011/19	Ž	1947	3	-	RhD pozitivní
125.	D - 0012/19	Ž	1990	1	-	RhD pozitivní
126.	D - 0019/19	Ž	1950	1	-	RhD pozitivní

Převážná většina, konkrétně 66 % vzorků, ve skupině „Pacienti“ byla tvořena vzorky pacientek, zahrnující vzorky těhotných žen. Průměrný věk souboru byl 33 let. Tabulka č. 21 uvádí všechny vyšetřené vzorky spolu s výsledky vyšetření a jeho interpretací. Z celkového počtu 126 vzorků byla v případě 99 vzorků zachycena pozitivní reakce v první jamce gelu, konfirmující RhD weak typ 1. Jedenkrát byl detekován RhD weak typ 1.1. RhD weak typ 2 byl zachycen u 7 pacientek, u 12 byl detekován D weak typ 3. U vzorku 6 pacientek nebyl detekován žádný typ slabého D antigenu ani žádný variantní D antigen.



Graf 7: Srovnání zastoupení jednotlivých RhD weak typů u pacientek

U vzorku D - 0131/18 (pořadí č. 83) byl detekován variantní D antigen, konkrétně varianta DFR or RHD ψ .

Tabulka 22: Soubor "Pacienti - Ženy": Početní a procentuální zastoupení jednotlivých typů slabého D antigenu a variant částečného D antigenu

Pacienti (novorozenci, pacientky, těhotné ženy a příjemkyně transfuze) – Ženy		
	Celkový počet	Procentuální zastoupení
D weak typ 1	99	78,6 %
D weak typ 1.1	1	0,8 %
D weak typ 2	7	5,6 %
D weak typ 3	12	9,5 %
D weak nezjištěn, D varianta nezjištěna	6	4,7 %
D varianta DFR or RHD ψ	1	0,8 %

9. DISKUZE

U obou analyzovaných souborů byl antigen RhD u všech vzorků nejprve určen sérologicky a teprve až v případě nejasných či diskrepantních výsledků bylo 220 vzorků odesláno k vyšetření D antigenu molekulárně genetickou metodou, konkrétně pomocí PCR-SSP metody s hodnocením na elektroforetickém gelu. Studie zveřejněná roku 2017 potvrdila, že mezi nejčastěji vyskytující se typy D weak antigenu v kavkazské populaci patří D weak typ 1, 2, 3 a z variant je nejčastěji zjištěna varianta DVI. [17]

Při statistickém zpracování retrospektivně získaných dat obou souborů se ukázalo, že incidence variantní formy D antigenu, zahrnující D weak/variant, dosahuje prevalence 1,05 % z celkového počtu 20 902 vyšetřených vzorků, zahrnující vzorky prvodárců krve, pacientů a těhotných žen za sledované období, což potvrzuje nejnovější literárně uváděný výskyt 1-2 % D weak/variant. [52] Při porovnání zjištěného výskytu s literárně uváděným výskytem lze konstatovat, že se výskyt variantních forem D antigenu v našem souboru pohybuje v uvedeném rozmezí.

V období říjen 2015 - únor 2019 bylo na Transfuzním oddělení FNHK vyšetřeno 2 857 vzorků dobrovolných prvodárců krve. Z daného počtu bylo 21 vzorků mužů (z celkového počtu 1 415 dárců) a 11 vzorků žen (z celkového počtu 1 443 dárců) odesláno k molekulární genotypizaci *RHD*. Ve skupině „Dárci krve a krevních složek“ (32 dárců) byla ve všech případech zjištěna slabá exprese D antigenu. Tento počet odpovídá 1,12 % výskytu slabého D antigenu napříč celkovým počtem všech prvodárců za dané období na Transfuzním oddělení FNHK.

Spektrum zastoupených typů D weak antigenu bylo velmi úzké, tvořené třemi nejčastějšími typy D weak typy 1-3. U 20 dárců (62,5 %) byl detekován D weak typ 1, u 7 dárců (21,9 %) D weak typ 3, u dvou dárců (6,3 %) byl zachycen D weak typ 2. U tří dárců (9,3 %) nebyl detekován žádný typ slabého D antigenu ani částečný D antigen. Všechny prokázané typy D weak antigenů umožnily výsledky dárců vyhodnotit a uzavřít jako RhD pozitivní. Z důvodu nízkého počtu vzorků prvodárců krve nelze zastoupení D weak antigenu srovnáním obou pohlaví objektivně zhodnotit, neboť soubor „Dárci krve – Muži“ obsahuje o 10 vzorků více než soubor „Dárci krve – Ženy“ i navzdory faktu, že v letech 2016 - 2018 bylo mezi dobrovolnými prvodárci krve o 28

víc žen. Tento fakt je nejen způsoben nízkým počtem zachytu D weak/variant a následné genotypizace, ale také z důvodu, že výskyt D weak/variant není vázán na pohlaví.

Dárcům krve a krevních složek, pacientům, těhotným ženám i ženám do 50 let věku s RhD weak typem 1, 2 nebo 3 lze podávat RhD pozitivní transfuzní přípravky a v případě těhotenství či po porodu není podání anti-D imunoglobulinu indikováno. U těchto jedinců není riziko vzniku anti-D protilátky. [16]

Soubor „Pacienti“ je tvořen pacienty FNHK, novorozenci a těhotnými ženami za období říjen 2015 - únor 2019. V časovém úseku bylo vyšetřeno celkem 18 045 vzorků pacientů sérologickými metodami k určení RhD fenotypu, z toho 188 vzorků bylo odesláno k *RHD* genotypizaci. Zastoupení odlišných forem D antigenu, zahrnující D weak/variant, v souboru „Pacienti“ odpovídá 1,04% výskytu, napříč všemi vyšetřenými vzorky za dané období. RhD weak má celkové zastoupení 0,97 %, RhD variant 0,02 % a u desíti pacientů - 0,05 % nebyl detekován D weak ani D variant. Soubor „Pacienti“ je oproti souboru „Dárci krve a krevních složek“ výsledkově rozmanitější, jelikož se vyznačuje širším spektrem získaných výsledků a jejich početním zastoupením.

Značnou část (98,4 %) dat tvoří shodně se souborem dárců krve jednotlivé typy slabého D antigenu, nejčastěji D weak typ 1, 2 a 3. Jedenkrát byl zjištěn D weak typ 1.1. Kromě slabých typů D antigenu byl v 1,6 % případů, konkrétně u tří pacientů, zachycen variantní D antigen. Dvakrát se jednalo o variantu D kategorie VI typu 1 a typu 2. Jedenkrát byla v souboru detekována varianta DFR or RHD ψ . Zda se jedná o DFR nebo RHD ψ variantu, může napovědět výsledek sérologického vyšetření. Pokud by se jednalo o variantu DFR, je výsledkem sérologie slabě pozitivní reakce s anti-D protilátkou. Varianta RHD ψ se pomocí sérologických metod vyznačuje hemi- nebo homozygotní negativní reakcí. V případě, že výsledky předem provedeného sérologického vyšetření nejsou známy, je možné pomocí BAGene RH-TYPE kitu identifikovat, o jaký typ variantního D antigenu se jedná. U daného vzorku nebylo vyšetření pomocí RH-TYPE kitu k upřesnění varianty provedeno.

S pacienty, kterým byl zjištěn D weak typ 1-3, je zacházeno jako s RhD pozitivními jedinci a je možno jim v případě nutnosti transfuze podat RhD pozitivní transfuzní přípravky.

Pacienti s variantním D antigenem jsou vystaveni riziku imunizace RhD antigenem, neboť disponují možnou tvorbou allo-anti-D protilátky při kontaktu s RhD⁺ erytrocyty. Síla exprese počtu kopií RhD proteinu u různých variant D antigenů je rozdílná, například u DVI typu 2 je na povrchu erytrocytu patrná značná redukce v počtu kopií. Pacientům, příjemcům transfuze i těhotným ženám by měly být podávány RhD negativní transfuzní přípravky. Těhotným ženám s variantním D antigenem jsou rovněž doporučena tatáž opatření jako RhD negativním ženám. V případě, že by pacientům s D variantou byla odebrána krev k výrobě transfuzních přípravků, nesly by vyrobené transfuzní přípravky označení RhD pozitivní.

Procentuální zastoupení D weak typů 1, 2 a 3 u obou souborů - „Dárci krve a krevních složek“ a „Pacienti“ odpovídá literárně uváděnému výskytu D weak typů 1-3 napříč kavkazskou populací z roku 2017, kdy se frekvence D weak antigenu pohybuje v rozmezí 0,2 – 1 %. Přičemž až 93 % všech detekovaných atypických forem D antigenů představuje záchyt D weak typů 1-3. [17] Pořadí výskytu typů 1-3 D weak antigenů se v rámci obou souborů zkoumaných v diplomové práci shoduje s uvedeným pořadím výskytu slabých D antigenů v odborném článku zabývajícím se výskytem D weak/variant antigenu v kavkazské populaci z roku 2013. [16] Na prvním místě v obou skupinách dominovala detekce D weak typ 1, na druhém místě D weak typ 3 a na třetím D weak typ 2.

Variantní D antigen byl detekován u 0,014 % osob ze všech vyšetřených vzorků ve sledovaném období na Transfuzním oddělení FNHK. Uváděný výskyt variantního D antigenu se dle studie z roku 2014 celosvětově liší, od frekvence 0,016 % u čínských dárců až po frekvenci 6,45 % u afrických dárců krve. [51]

V případě, že by nebylo možné pomocí metodiky PCR-SSP definovat variantu antigenu nebo by byl zachycen vzácně vyskytující se slabý typ D antigenu, např. D weak typ 15, jsou dané vzorky odeslány k došetření do Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKKT).

10. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit a vzájemně porovnat zastoupení jednotlivých typů D weak a D variantního antigenu mezi dvěma skupinami tvořenými dárci krve a pacienty. U všech vzorků byl RhD antigen vyšetřen metodou PCR-SSP s následnou elektroforetickou detekcí. Vzorky dárců krve a pacientů byly vyšetřeny na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové v období od října 2015 do února 2019. Obě skupiny byly podle původu vzorku rozděleny na muže a ženy. Z celkového počtu 20 902 přijatých a testovaných vzorků za dané období byl u 220 vzorku sérologicky detekován D weak/variant.

Incidence všech zjištěných variantních forem D antigenu zahrnující D weak/variant v rámci obou souborů a z celkového počtu vyšetřených vzorků za dané období dosáhla 1,05%.

V souboru zdravých prvodárců krve (32 dárců) byl u 29 vzorků detekován slabý typ D antigenu, u třech vzorků nebyl detekován slabý ani variantní D antigen.

U skupiny pacientů bylo na rozdíl od skupiny prvodárců krve získáno širší spektrum výsledků vyšetření. Z celkového počtu 188 vzorků byly kromě typů slabých D antigenu zachyceny i varianty D antigenu. Konkrétně se jednalo o DVI variantu typ 1, DVI variantu typ 2 a DFR or RHD ψ variantu.

Na základě molekulárně genetického vyšetření byl pacientům i transfuzním přípravkům přiřazen v souladu s používanými pravidly správný výsledek RhD. Správné určení RhD je významné pro každodenní transfuzní praxi.

Stanovené cíle práce byly splněny, zpracovaná data získaných souborů budou využita na Transfuzním oddělení FNHK.

11. POUŽITÉ ZKRATKY

AE1	Anion exchanger = bílkovina pásu 3
AIHA	Autoimunní hemolytická anémie
bp	base pair = párů bází
CAP	College of American Pathologists
DNA	Deoxyribonucleic acid = deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	double stranded DNA = dvouvláknová DNA
EtBr	ethidium bromid
FNHK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
HFA	High Frequency Antigen = vysokofrekvenční antigen
HGH	Human Growth Hormone
HON	Hemolytické onemocnění novorozence
Ig	Imunoglobulin
ISBT	International Society of Blood Transfusion = Mezinárodní společnost krevní transfuze
kb	kilobáze
LFA	Low Frequency Antigen = nízkofrekvenční antigen
NAT	Nepřímý antiglobulinový test
NGS	Next Generation Sequencing = sekvenování nové generace
PCR	Polymerase Chain Reaction = polymerázová řetězová reakce
PCR-ASA	Alelově specifická PCR
PCR-SSP	PCR-Sequence Specific Primering = PCR se sekvenčně-specifickými
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism = polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RhAG/BG/CG	Rh asociovaný glykoprotein
D ^{w/v}	D weak/variant
SMP1	Small Membrane Protein 1
SNP	Single Nucleotide Polymorphism = jednonukleotidový polymorfismus
TMRC	Transfusion Medicine Resource Committe

12. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Haplotypy Rh systému (převzato: zdroj č. 3).....	15
Tabulka 2: Rh geny, korespondující antigeny a výsledné značení fenotypu (převzato: zdroj č. 2).....	18
Tabulka 3: Frekvence výskytu RhD fenotypu u populací (převzato: zdroj č. 3, 13).....	21
Tabulka 4: Nejčastěji zastoupené typy slabého RhD: Nukleotidové změny, proteinové sekvence, poloha v exonu, asociovaný haplotyp RHCE (převzato: zdroj č. 5).....	25
Tabulka 5: Nejčastěji zastoupené typy parciálního RhD: Nukleotidové změny, proteinové sekvence, poloha v exonu, asociovaný haplotyp RHCE (převzato: zdroj č. 5).....	26
Tabulka 6: Přehled klinicky nejvýznamnějších imunních protilátek anti-Rh (převzato: zdroj č. 3).....	33
Tabulka 7: Souhrn počtu všech vyšetřených vzorků	44
Tabulka 8: Interpretace výsledku vyšetření RhD antigenu.....	47
Tabulka 9: Ředění DNA [50].....	51
Tabulka 10: Příprava Master Mixu [50]	51
Tabulka 11: Celkový přehled získaných výsledků mezi dárci a pacienti	56
Tabulka 12: Soubor "Dárci krve a krevních složek": Zastoupení jednotlivých typů slabých D antigenů dle pohlaví.....	57
Tabulka 13: Soubor "Dárci krve a krevních složek - Muži": Počet vyšetření v období říjen 2015 - únor 2019	58
Tabulka 14: Soubor "Dárci krve a krevních složek - Muži": Početní a procentuální zastoupení jednotlivých typů RhD weak	60
Tabulka 15: Soubor "Dárci krve a krevních složek - Ženy": Počet vyšetření v období od října 2015 - února 2019.....	60
Tabulka 16: Soubor "Dárci krve a krevních složek - Ženy": Početní a procentuální zastoupení jednotlivých typů RhD weak	61
Tabulka 17: Soubor "Pacienti" : Zastoupení jednotlivých typů slabých D antigenu dle pohlaví	62
Tabulka 18: Soubor "Pacienti" : Zastoupení detekovaných variantních D antigenů dle pohlaví	63
Tabulka 19: Soubor "Pacienti - Muži": Počet vyšetření v období od října 2015 - února 2019	64
Tabulka 20: Soubor "Pacienti - Muži": Početní a procentuální zastoupení jednotlivých typů slabého D antigenu a variant částečného D antigenu	66
Tabulka 21: Soubor "Pacienti - Ženy": Počet vyšetření v období od října 2015 - února 2019	67
Tabulka 22: Soubor "Pacienti - Ženy": Početní a procentuální zastoupení jednotlivých typů slabého D antigenu a variant částečného D antigenu	70

13. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma struktury RHD a RHCE genu (převzato: zdroj č. 16)	16
Obrázek 2: Schéma membránové exprese RhD a RhCE proteinů (převzato: zdroj č. 16)	17
Obrázek 3: Umístění Rh proteinů v membráně erytrocytu (převzato: zdroj č. 11)	17
Obrázek 4: Substitute aminokyselin zodpovědné za polymorfismy C/c a E/e (převzato: zdroj č. 11)	20
Obrázek 5: Delece RHD genu (převzato: zdroj č. 9)	23
Obrázek 6: Tři nejčastější aminokyselinové substitute v RhD proteinu u D weak fenotypu (převzato: zdroj č. 11)	24
Obrázek 7: D varianta: Aminokyselinové substitute v RhD proteinu u D variant znázorněny jako kruhy (převzato: zdroj č. 11)	26
Obrázek 8: Del fenotyp: Ztráta 3'oblasti charakteristická u asijské populace (převzato: zdroj č. 11)	28
Obrázek 9: Výsledek PCR-SSP a délkový standard	52
Obrázek 10: D weak typ 1	53
Obrázek 11: D weak typ 2	53
Obrázek 12: D weak typ 3	53
Obrázek 13: D weak nezjištěn	53
Obrázek 14: Závěr vyšetření: D weak/varianta nezjištěna, RhD pozitivní	54
Obrázek 15: Závěr vyšetření: D weak/varianta nezjištěna, RhD negativní	54
Obrázek 16: RhD varianta DVI typ 1	55
Obrázek 17: RhD varianta DFR or RHD ψ	55

14. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Zastoupení slabých D antigenů u dárců krve a krevních složek v období od ledna 2016 - prosince 2018	58
Graf 2: Srovnání zastoupení jednotlivých RhD weak typů u dárců mužů	59
Graf 3: Srovnání zastoupení jednotlivých RhD weak typů u dárců žen	61
Graf 4: Zastoupení slabých typů D antigenu u pacientů FNHK v období od října 2015 - února 2019	63
Graf 5: Zastoupení detekovaných variant D antigenu u pacientů FNHK v období od října 2015 - února 2019	64
Graf 6: Srovnání zastoupení jednotlivých RhD weak typů u pacientů mužů	66
Graf 7: Srovnání zastoupení jednotlivých RhD weak typů u pacientek	70

..

15. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Vzor pracovního protokolu Weak D-TYPE s vyhodnocovací tabulkou.....	85
Příloha 2: Vzor pracovního protokolu Partial D-TYPE s vyhodnocovací tabulkou.....	86
Příloha 3: Vzor výsledkové zprávy RHD genotypizace metodou PCR-SSP.....	87

16. POUŽITÁ LITERATURA

1. ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST. *Transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4534-3.
2. PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství II*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3460-6.
3. MASOPUST, Jiří a Martin PÍSAČKA. *Praktická imunohematologie: erytrocyty*. Praha: Mladá fronta, 2016. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-3740-2.
4. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology. *International Society of Blood Transfusion* [online]. Amsterdam, the Netherlands: ISBT Central Office, [2011] [cit. 2018-11-02]. Dostupné z: <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>
5. DANIELS, Geoff. *Human blood groups*. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Science, 2002. ISBN 06-320-5646-0.
6. HEMKER, M. B. *A study on weak D and the function of the Rh complex in red blood cells* [online]. Netherlands: Erasmus University Rotterdam, 2004 [cit. 2019-02-15]. Dostupné z: <https://repub.eur.nl/pub/51513/>
7. AVENT, Neil D. a Marion E. REID. The Rh blood group system: a review. *Blood Journal* [online]. 2000, **95**(2), 375-387 [cit. 2018-11-03]. ISSN 1528-0020. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/95/2/375.full.pdf?sso-checked=true>
8. AGRE, Peter a Jean-Pierre CARTRON. Molecular biology of the Rh antigens. *Blood Journal* [online]. 1991, **78**(3), 551-563 [cit. 2018-11-03]. ISSN 1528-0020. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/78/3/551.long?sso-checked=true>
9. FLEGEL, Willy A. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfusion and Apheresis Science* [online]. 2011, 28 Jan 2011, **44**(1), 81-91 [cit. 2019-02-04]. DOI: 10.1016/j.transci.2010.12.013. ISSN 14730502. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473050210002247>
10. FLEGEL, Willy A. The genetics of the Rhesus blood group system. *Blood Transfusion* [online]. 2007, Apr 2007, **5**(2), 50-57 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.2450/2007.0011-07. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2535884>
11. WESTHOFF, Connie M. The Structure and Function of the Rh Antigen Complex. *Seminars in Hematology* [online]. 2007, Jan 2007, **44**(1), 42-50 [cit. 2019-02-04]. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2006.09.010. ISSN 00371963. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0037196306002320>
12. VAN KIM, Caroline Le, Yves COLIN a Jean-Pierre CARTRON. Rh proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Reviews* [online]. 2006, **20**(2), 93-110 [cit. 2019-02-12]. DOI: 10.1016/j.blre.2005.04.002. ISSN 0268960X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268960X05000299?via%3Dihub>
13. DEAN, Laura. The Rh blood group. *Blood Groups and Red Cell Antigens* [online]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology

- Information (US), 2015, s. 54 [cit. 2019-02-04]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/pdf/Bookshelf_NBK2261.pdf
14. GU, Juan et al. Analysis of density and epitopes of D antigen on the surface of erythrocytes from DEL phenotypic individuals carrying the RHD1227A allele. *Blood Transfusion* [online]. 2014, Apr 2014, **12**(2), 244-249 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.2450/2013.0091-13. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4039708>
 15. KHOSROSHAHI, Behzad Nazel, Arezoo OODI, Saba NAMJOU, Tahereh GHOLAMALI a Naser AMIRIZADEH. RHD Genotyping by Molecular Analysis of Hybrid Rhesus box in RhD-Negative Blood Donors from Iran. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion* [online]. 2018, 1 August 2018, , 1-6 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.1007/s12288-018-0992-3. ISSN 0971-4502. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12288-018-0992-3>
 16. DANIELS, Geoff. Variants of RhD - current testing and clinical consequences. *British Journal of Haematology* [online]. 2013, **161**(4), 461-470 [cit. 2019-02-12]. DOI: 10.1111/bjh.12275. ISSN 00071048. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.12275>
 17. SANDLER, S. Gerald, Leonard N. CHEN a Willy A. FLEGEL. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *British Journal of Haematology* [online]. 2017, **179**(1), 10-19 [cit. 2019-02-05]. DOI: 10.1111/bjh.14757. ISSN 00071048. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bjh.14757>
 18. Rh systém s důrazem na klasifikaci a diagnostiku RhD antigenu. *Institut laboratorní medicíny* [online]. Praha, 2016, Zář 2016 [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: http://labin.cz/wp-content/uploads/lab.-listy_1624_Rh-syst%C3%A9m-s-d%C5%AFrazem-na-klasifikaci-a-diagnostiku-RhD-antigenu.pdf
 19. QURESHI, Adnan, Muhammad SALMAN a Bushra MOIZ. Rhnull: A rare blood group phenotype. *Journal of the Pakistan Medical Association* [online]. 2010, November 2010, **60**(11), 960-1 [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/50286441_Rhnull_A_rare_blood_group_phenotype
 20. FLATT, Joanna F., Rozi H. MUSA, Yasmin AYOB, et al. Study of the D-- phenotype reveals erythrocyte membrane alterations in the absence of RHCE. *British Journal of Haematology*[online]. 2012, May 2012, **158**(2), 262-273 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09149.x. ISSN 00071048. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22571328>
 21. CLEVENGER, Ben a Andrea KELLEHER. Hazards of blood transfusion in adults and children. *BJA Education* [online]. 2014, 1 June 2014, **14**(3), 112-118 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.1093/bjaceaccp/mkt042. ISSN 17431816. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1743181617300999>
 22. WAGLE, Sameer. Hemolytic Disease of the Newborn. *Medscape* [online]. New York (USA), 28 Dec 2017 [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/974349-overview#a6>
 23. JERKOVIĆ RAGUŽ, Marjana, Darinka ŠUMANOVIC GLAMUZINA, Jerko BRZICA a Tonći GRUICA. The Incidence and Effects of Alloimmunization in Pregnancy During the Period 2000–2013. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*[online]. 2017, 17 Jul 2017, **77**(07), 780-785 [cit. 2019-02-11].

- DOI: 10.1055/s-0043-109867. ISSN 0016-5751. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5514019/>
24. VELKOVA, Emilija. Correlation between the Amount of Anti-D Antibodies and IgG Subclasses with Severity of Haemolytic Disease of Foetus and Newborn. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* [online]. 2015, 30 May 2015, **3**(2), 293-297 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.3889/oamjms.2015.058. ISSN 1857-9655. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4877870/>
 25. VIRK, Mrigender a S. Gerald SANDLER. Rh Immunoprophylaxis for Women With a Serologic Weak D Phenotype. *Laboratory Medicine* [online]. 2015, **46**(3), 190-194 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.1309/LMUNUP4FJTUX2GCD. ISSN 0007-5027. Dostupné z:
<https://academic.oup.com/labmed/article-lookup/doi/10.1309/LMUNUP4FJTUX2GCD>
 26. PAHUJA, Sangeeta a Deepti VERMA. Autoimmune hemolytic anemia caused by anti “e”: A challenge: A case report with review of literature. *Asian Journal of Transfusion Science* [online]. 2017, **11**(2), 195-198 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.4103/ajts.AJTS_76_16. ISSN 0973-6247. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5613430/>
 27. BARCELLINI, Wilma. New Insights in the Pathogenesis of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* [online]. 2015, 7 Sep 2015, **42**(5), 287-293 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.1159/000439002. ISSN 1660-3796. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4678320/>
 28. SCHARBERG, E. A., E. RICHTER a P. BUGERT. Red cell antigen testing. In: *ISBT Science Series* [online]. 2015, 13 April 2015, **10**(S1), s. 5-11 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.1111/voxs.12134. ISSN 17512816. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1111/voxs.12134>
 29. ČERMAKOVÁ, Zuzana. *Transfuziologie: studijní opora*. Ostrava: Ostravská univerzita, 2014. ISBN 978-80-7464-619-5.
 30. SCHMIDT, Luciana Cayres, Lilian CASTILHO, Otavio Vinicius Neves VIEIRA, Emília SIPPERT, Ane Caroline GASPARDI, Marina Lobato MARTINS a Maria Clara Fernandes DA SILVA MALTA. Impact of a confirmatory RhD test on the correct serologic typing of blood donors. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* [online]. 2015, **37**(5), 302-305 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.1016/j.bjhh.2015.06.001. ISSN 15168484. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S151684841500105X#bib0135%20>
 31. CREDIDIO, Débora C. a Jordao PELLEGRINO JR. Serologic and molecular characterization of D variants in Brazilians: Impact for typing and transfusion strategy. *Immunohematology: American Red Cross* [online]. 2011, January 2011, **27**(1), 6-11 [cit. 2019-02-11]. Dostupné z:
<https://www.researchgate.net/publication/221853173>
 32. SANDLER, S. Gerald, Leonard N. CHEN a Willy A. FLEGEL. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *British Journal of Haematology* [online]. 2017, 16 May 2017, **179**(1), 10-19 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.1111/bjh.14757. ISSN 00071048. Dostupné z:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bjh.14757>

33. TELEN, Marylin. The Use of Genotyping in Transfusion Medicine. *The Hematologist: Ash News and Reports* [online]. 2014, 3 November 2014, **11**(6) [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <http://www.hematology.org/Thehematologist/Mini-Review/3317.aspx>
34. GIRI, Dhurba. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle, Procedure, Components, Types and Applications. *Laboratory Info*[online]. 2015, 27 January 2019 [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr/>
35. PRAGER, Martina. Molecular genetic blood group typing by the use of PCR-SSP technique. *Transfusion* [online]. 2007, **47**(s1), 54S-59S [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01311.x. ISSN 0041-1132. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1537-2995.2007.01311.x>
36. RIZZO, Claudia et al. Weak D and partial D: Our experience in daily activity. *Blood transfusion* [online]. 2012, **10**(2), 235-236 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.2450/2012.0060-11. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/221835036_Weak_D_and_partial_D_Our_experience_in_daily_activity
37. SYNKOVÁ, K., R. NOVÁKOVÁ a V. ŘEHÁČEK. *Vyšetření RHD genotypizace metodou PCR-SSP*. Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, 2016.
38. ANDLER, S. Gerald, Susan D. ROSEFF, Ronald E. DOMEN, Beth SHAZ a Jerome L. GOTTSCHALL. Policies and procedures related to testing for weak D phenotypes and administration of Rh immune globulin: results and recommendations related to supplemental questions in the Comprehensive Transfusion Medicine survey of the College of American Pathologists. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* [online]. 2014, **138**(5), 620-625 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.5858/arpa.2013-0141-CP. ISSN 1543-2165. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24786120>
39. FLEGEL, Willy A., Susan D. ROSEFF a Ashok THOLPADY. Phasing-In RHD Genotyping. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* [online]. 2014, **138**(5), 585-588 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.5858/2013-0509-ED. ISSN 0003-9985. Dostupné z: <http://www.archivesofpathology.org/doi/abs/10.5858/2013-0509-ED>
40. CREWS, W. RHD Genotyping for Patients with a Weak D Phenotype. *Carter BloodCare* [online]. 2016 [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <http://www.carterbloodcare.org/rhd-genotyping-for-patients-with-a-weak-d-phenotype-by-w-crews-m-d/>
41. BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.
42. PEYRARD, T. Molecular tools for investigating immunohaematology problems. *ISBT Science Series* [online]. 2015, **10**(S1), 31-38 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1111/voxs.12165. ISSN 17512816. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/voxs.12165>
43. HASHMI, Ghazala, Tasmia SHARIFF, Michael SEUL, et al. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion* [online]. 2005, **45**(5), 680-688 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.04362.x. ISSN 00411132. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1537-2995.2005.04362.x>

44. JIROUŠOVÁ, Hana. *Standardní operační postup č. II .3.4: Systém sloupcové aglutinace pro identifikaci antigenů a protilátek v imunohematologii*. Verze č. 5. Hradec Králové: Transfuzní oddělení FNHK, 2017.
45. *Blood Grouping Reagent NOVACLONE™ Anti-D IgM + IgG Monoclonal Blend: For slide, tube and microplate test*. Canada, 2017.
46. *BAGene DNA-SSP: Test kits for determination of ABO blood groups, RH types, Kell, Kidd and Duffy systems, MNS systems, rare blood group systems, HPA and HNA specificities on a molecular genetic basis*. 12/2018. Germany, 2018.
47. TRÁVNÍČKOVÁ, Kamila a Lucie JEŘÁBKOVÁ. *Standardní operační postup č. II .3.8.22: Typizace RHD variant (Partial D-TYPE) a slabých D typů (weak D-TYPE) metodou PCR-SSP*. Verze č. 5. Hradec Králové: Transfuzní oddělení FNHK, 2017.
48. TRÁVNÍČKOVÁ, Kamila a Lucie JEŘÁBKOVÁ. *Standardní operační postup technický č. IV .2.: Návod na obsluhu zařízení pro horizontální gelovou elektroforézu*. Verze č. 2. Hradec Králové: Transfuzní oddělení FNHK, 2017.
49. TRÁVNÍČKOVÁ, Kamila a Lucie JEŘÁBKOVÁ. *Standardní operační postup technický č. IV .3.: Návod na obsluhu UV transiluminátoru a dokumentačního zařízení*. Verze č. 2. Hradec Králové: Transfuzní oddělení FNHK, 2017.
50. TRÁVNÍČKOVÁ, Kamila a Lucie JEŘÁBKOVÁ. *Standardní operační postup technický č. IV .11.: Návod na obsluhu fluorimetru Qubit*. Verze č. 2. Hradec Králové: Transfuzní oddělení FNHK, 2017.
51. JAIN, Manjula, Ritu KUMARI, Shivani KUSHWAHA, Sangeeta PAHUJA, Meenu PUJANI a Neha SETHI. Frequency of variant D in Delhi, India. *Asian Journal of Transfusion Science* [online]. 2014, **8**(2), 142-143 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.4103/0973-6247.137459. ISSN 0973-6247. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4140062/?fbclid=IwAR0qVYDms90U8TiYzamcokHaRO92bd3MofSaQq5gwZeu05ZUzhhy_ves4IA
52. GUZIJAN, Gordana, Snezana JOVANOVIĆ SRZENTIC, Natasa PAVLOVIĆ JANKOVIĆ, Iva DJILAS a Marko LILIĆ. Implementation of Molecular RHD Typing at Two Blood Transfusion Institutes from Southeastern Europe. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* [online]. 2019, **46**(2), 114-120 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.1159/000496751. ISSN 1660-3796. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/496751>

PŘÍLOHY

Příloha 1: Vzor pracovního protokolu Weak D-TYPE s vyhodnocovací tabulkou

Weak D-TYPE

BAGene product line



IVD

CE

LOT 808WD1/1

REF 6647

12/2018

2020-01

Ergebnisprotokoll und Auswertetabelle

Worksheet and Evaluation diagram

Reaktions-Nr. / Reaction no.			1	2	3	4	5	6	7	8				
PCR-Produkt (Größe in bp)			250	150	126	165	101	130	83	112	198	83	255	153
weak D Allele / weak D alleles <i>(ISBT Nomenklatur / ISBT nomenclature)</i>			predicted phenotype			▲ Bitte die Ergebnisse mit dem BAGene RH-TYPE Kit zur Auswertung mit berücksichtigen. Please include the results with the BAGene RH-TYPE kit for the evaluation.								
RHD*weak D type 1	RHD*01W.1	Type 1	150											
RHD*weak D type 1.1	RHD*01W.1.1	Type 1.1	250	150										
RHD*weak D type 2	RHD*01W.2	Type 2			+									
RHD*weak D type 3	RHD*01W.3	Type 3				+								
RHD*weak partial 4.0, 4.1	RHD*09.03.01 (RHD*DAR3.01), RHD*09:04 (RHD*DAR4)	Type 4.0 (DAR3.01), Type 4.1 (DAR4)					+							
RHD*weak partial 4.2	RHD*09.01.00 (RHD*DAR1.00)	Type 4.2 (DAR1)					+	130						
RHD*weak D type 5	RHD*01W.5	Type 5							+					
RHD*weak partial 11 (haplotype cDe), RHD(M295I) (haplotype CD ₄₆) ▲	RHD*11	weak partial 11 or D _u									198			
RHD*weak partial 15	RHD*15	weak partial 15											153	
RHD*weak D type 20	RHD*01W.20	Type 20											255	
RHD*weak partial 15, RHD*weak D type 20	RHD*15, RHD*01W.20	weak partial 15, Type 20											255	153
RHD*weak D type 17	RHD*01W.17	Type 17						83			83			
RHD*weak partial 4.2, RHD*weak D type 17	RHD*09.01.00 (RHD*DAR1.00), RHD*01W.17	Type 4.2 (DAR1), Type 17				+	130	83			83			
RHD*weak partial 11, RHD(M295I), RHD*weak D type 17	RHD*11, RHD*01W.17	weak partial 11 or D _u , Type 17						83			198	83		
RHD pos. oder / or RHD neg.														

Ergebnis / Result	1	2	3	4	5	6	7	8

Mix 2 zeigt manchmal eine unspezifische Reaktion bei ca. 80bp. / Mix 2 shows sometimes an unspecific reaction at about 80bp.

Im Falle von RHD*weak D type 17 reagieren Mix 5 und 7 manchmal schwach. / In case of RHD*weak D type 17 mix 5 and 7 show sometimes a weak reaction.

Proben-ID / Sample ID: Name / Name: Geb.-Datum / Date of birth: Ergebnis / Result: Datum / Date: Unterschrift / Signature:	Gelbild / Gel picture:
---	------------------------

Version 7.0 – 01/2017

BAG Health Care GmbH
 Amtsgerichtsstraße 1-5
 35423 Lich / Germany
 Tel.: +49(0)6404/925-0
 Fax: +49(0)6404/925-250
 www.bag-healthcare.com
 info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
 Tel.: +49(0)6404/925-450
 Fax: +49(0)6404/925-460
 verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
 Tel.: +49(0)6404/925-125
 Fax: +49(0)6404/925-421
 service@bag-healthcare.com

Priloha 2: Vzor pracovniho protokolu Partial D-TYPE s vyhodnocovaci tabulkou

Partial D-TYPE

BAGene product line



IVD

CE

LOT 804PD1



2020-07

REF 6646

12/2018

WORKSHEET

- ◆ Eine fehlende Bande in Reaktion Nr. 4 weist auf DFR (serologisch schwach D-positiv) oder RHD psi (hemi- bzw. homozygot, serologisch D-negativ) hin. Bei fehlender Information zur Serologie kann RHD psi mit BAGene RH-TYPE bestätigt oder ausgeschlossen werden.
- ◆ In Gegenwart von weak D Typ 41 und 45 kann es zum Ausfall von Reaktion Nr. 9 kommen. Mutationen im Intron-Bereich können ebenfalls zum Ausfall von Mix Nr. 8 oder 9 führen.
- ◆ In Gegenwart von weak D Typ 20 kann eine sehr schwache positive Bande in Reaktion Nr. 10 auftreten.
- ◆ Die spezifische Bande in Mix 12 kann etwas schwächer ausfallen als Reaktionen in anderen Mixen.
- ◆ A missing band in reaction No. 4 may indicate DFR (weak positive with anti-D) or RHD psi (hemi- or homozygous, D-negative in serology). If serological information is lacking, confirmation or exclusion of RHD psi can be obtained using BAGene RH-TYPE.
- ◆ In presence of weak D type 41 and 45 a missing reaction in mix No. 9 may occur. Mutations of intron sections may also lead to missing reaction of mix No. 8 or 9.
- ◆ In presence of weak D type 20 a very weak positive band may occur in reaction No. 10.
- ◆ The specific band in mix 12 could be a little bit more weak than reactions in other mixes.
- ◆ Achtung! Attention: Neue Nomenklatur / New nomenclature <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/> und / and <http://www.rhesusbase.info/>

Reaktions-Nr. / Reaction no.																	
PCR-Produkt (Größe in bp) / PCR product (size in bp)																	
		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15															
		134 146 118 135 132 132 120 673 184 132 166 107 117 129 140															
		D ₁ D ₂ D ₃ D ₄ D ₅ D ₆ D ₇ D _{8a} D ₉ D ₁₀ D ₂ D ₆ D ₇ D ₇ D ₈															
Haplotyp Haplotype																	
* Mix 8 Intron 7 Exon 8																	
Spezifität / Specificity		Standard RHD															
RHD*01	RHD pos.	+ + + + + + + + + + + + + + + + +															
		RHD negative															
RHD*01N.01	RHD neg. cc	+ + + + + + + + + + + + + + + + +															
RHD*01N.01	RHD neg. Cc oder / or CC	+ + + + + + + + + + + + + + + + +															
		RHD Varianten / RHD Variants															
RHD*DII	RHD*02	CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DIIIc	RHD*03.03	CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DIIB ^{n.l}	RHD*03.02 ^{n.l}	cDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DIVa ^{n.l}	RHD*04.01 ^{n.l}	cDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DIVb, *DIV 5 ^{n.l}	RHD*04.05, *04.05 ^{n.l}	cDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DIV.3	RHD*04.03	CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DIV.4	RHD*04.04	CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DV.1 - *DV.10, RHD*DBS1, *DBS2	RHD*05.01 - *05.10, RHD*13.01, *13.02	CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DV1.1	RHD*06.01	cDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DV1.2	RHD*06.02	CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DV1.3	RHD*06.03	CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DV1.4	RHD*06.04	Cde	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DV1	RHD*07.01	CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DAR1.00 (weak D 4.2)	RHD*09.01.00	cDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DAR2.00, *DAR2.01	RHD*09.02.00, *09.02.01	cDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DAU0 - *DAU3, *DAU6 - *DAU15	RHD*10.00 - *10.03, *10.06 - *10.15	cDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DAU4, *DAU5 ^{n.l} , *DAU5.01 ^{n.l}	RHD*10.04, *10.05 ^{n.l} , *10.05.01 ^{n.l}	cDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DBT1	RHD*14.01	CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DBT2 ^{n.l}	RHD*14.02 ^{n.l}	CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DFR1 - *DFR3, *DFRS ◆ oder / or RHD*ψ	RHD*17.01 - *17.03, *17.03 oder / or RHD*08N.01	CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DHMI	RHD*19	cDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*DNB	RHD*25	CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHCE*ce-D(5)-ce (RH:33 (DHAR*))	RHCE*01.22	cDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*CE(1-9)-D	RHD*01N.02	cDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*CE(2-9)-D	RHD*01N.03	CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*D-CE(3-7)-D	RHD*01N.05	CDe oder / or (C)de ⁿ	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*D-CE(4-7)-RHD1	RHD*01N.07	cDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*D-CE(4-7)-RHD2	RHD*01N.07	cDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*D-CE(8-9)-D		Cde	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*(deE ⁿ) ◆		CDe	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*D-CE(10) ◆		Cde	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
RHD*(Q41X) ^{n.l}	RHD*01N.09	Cde	+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
DCS, [DFW, DHR, DIM, DMU] ^{n.l}	diverse, various		+ + + + + + + + + + + + + + + + +														
		n.t. / [] n.t. = not tested currently															
Genotyp / Genotype		Phänotyp / Phenotype															
			1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15														

Beispiel siehe Kurzanleitung / Please see short instructions for examples

Proben-ID / Sample ID: _____

Name / Name: _____

Geb.-Datum / Date of birth: _____

Ergebnis / Result: _____

Datum / Date: _____

Unterschrift / Signature: _____

Gelbild / Gel picture:

Version 5.0 - 07/2018

BAG Health Care GmbH Amtsgerichtsstraße 1-5 35423 Lich / Germany Tel.: +49 (0) 6404/925-0 Fax: +49 (0) 6404/925-250 www.bag-healthcare.com info@bag-healthcare.com	Auftragsannahme / Ordering: Tel.: +49 (0) 6404/925-450 Fax: +49 (0) 6404/925-460 verkauf@bag-healthcare.com	Customer Service: Tel.: +49 (0) 6404/925-125 Fax: +49 (0) 6404/925-421 service@bag-healthcare.com
---	---	---

Příloha 3: Vzor výsledkové zprávy RHD genotypizace metodou PCR-SSP

Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové - Nový Hradec Králové, IČO 00179906
Transfuzní oddělení, Laboratoř HLA systému a PCR diagnostiky
Zdravotnická laboratoř č. 8267 akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO 15189:2013
Vedoucí laboratoře: MUDr. Vít Řeháček, tel.: 495 833 445, e-mail: vit.rehacek@fnhk.cz
Kontakt: Mgr. K. Trávníčková, tel.: +420 495 833 562, fax: +420 495 832 025, e-mail: transhla@fnhk.cz

Výsledková zpráva

Žadatel: ██████████ Adresa: ██████████
Ordinující lékař: ██████████
IČP: ██████████ Odbornost: ██████████ Kontakt: ██████████

Pacient: ██████████	Pohlaví: Žena	Kód pojišťovny: 211	Diagnóza: D330
Identifikační číslo: ██████████			

Vzorky:	Číslo vyšetření:	Typ vzorku:	Datum a čas odběru:	Příjem do laboratoře:
██████████	D-0261/18	nesrážlivá krev - EDTA	6.11.2018 14:00:00	7.11.2018 7:11:30
	D-0261/18-1	izolovaná DNA	6.11.2018 14:00:00	7.11.2018 9:30:44

Typizace RHD variant (Partial D-type) a slabých D typů (Weak D-type) metodou PCR SSP - SOP II. 3. 8. 22.

RHD weak: Weak D type 1 D-0261/18-1
RHD variant: Nejistěno D-0261/18-1

Závěr:

Dop.: Možno podávat RhD pozitivní transfuzní přípravky.

Provedl: ██████████ Kontroloval: ██████████ Uvolnil: ██████████
Datum/Čas uvolnění: 7.11.2018 11:00:36