

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd



**Antigenní systém erytrocytů, vyšetřovací metody,
výskyt antigenů u dárců krve ve Fakultní nemocnici
Hradec Králové.
(bakalářská práce)**

Vedoucí bakalářské práce

MUDr. Vít Řeháček

Garant bakalářské práce

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Hradec Králové, 2007

Soňa Hubená

Úvodem bych chtěla poděkovat MUDr. Vítu Řeháčkovi, který se stal mým školitelem a pomohl úspěšně dokončit tuto práci. Zasloužil mě velice ochotně do problematiky imunohematologie a umožnil mi také zapojit se do provozu na transfuzním oddělení FN v Hradci Králové. Dále bych touto cestou ráda poděkovala Doc. RNDr. Petru Klemmerovi CSc., který mi pomohl se statistickým zpracováním.

Prohlašuji, že jsem na této bakalářské práci pracovala samostatně a že jsem použila jen uvedenou literaturu.

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část.....	9
2.1. Erytrocyty.....	9
2.2. Antigeny.....	10
2.3. Genetika krevních skupinových systém.....	11
2.4. Antigenní systém.....	11
2.4.1. AB0 systém.....	12
2.4.2. Rh systém.....	15
2.4.3. Kell systém.....	18
2.4.4. Lewis systém.....	19
2.4.5. Duffy systém.....	20
2.4.6. Kidd systém.....	21
2.4.7. Lutheran systém.....	22
2.4.8. MNSs systém.....	23
2.4.9. P systém.....	24
2.4.10. Ii systém.....	24
2.4.11. Globoside sbírka.....	25
2.4.12. Krevní skupiny vysoké frekvence.....	25
2.4.13. Krevní skupiny nízké frekvence.....	26
3. Vyšetřovací metody pro identifikaci antigenních struktur.....	28
3.1. Detekce protilátek prostřednictvím aglutinace erytrocytů.....	28
3.2. Aglutinace erytrocytů senzibilizovaných inkompletními protilátkami.....	32
3.2.1. Snížení hydratace a iontového mraku okolo erytrocytů.....	32
3.2.1.1. Albumin.....	33

3.2.1.2. Polybren.....	33
3.2.1.3. Proteolytické enzymy.....	34
3.2.2. Zesílení vazby mezi protilátkami a antigeny.....	34
3.2.2.1. PEG.....	35
3.2.2.2. LISS: snížení iontové síly v médiu.....	35
3.2.3. Spojení molekul protilátek: Antiglobulínový test.....	35
3.2.3.1. NAT.....	37
3.2.3.2. Faktory ovlivňující citlivost NAT.....	38
3.3. Testy k vyšetření protilátek erytrocytů: ze zkumavky do sloupce.....	39
3.4. Solid - phase metody na mikrotitrační destičce.....	41
4. Výsledky.....	43
4.1. Vyšetření skupinových systémů AB0, Rh a Kell ve zkumavkách.....	43
4.1.1. Princip.....	43
4.1.2. Materiály.....	43
4.1.3. Postup.....	44
4.1.4. Hodnocení.....	45
4.2. Vyšetření skupinových systémů AB0, Rh a Kell na mikrotitračních destičkách.....	45
4.2.1. Princip.....	45
4.2.2. Materiály.....	45
4.2.3. Postup.....	46
4.2.4. Hodnocení.....	47
4.3. Vyšetření skupinových systémů AB0, Rh a Kell panelovými krvinkami DIAMED na ID kartách.....	47
4.3.1. Princip.....	47
4.3.2. Materiály.....	47

4.3.3. Postup.....	48
4.3.4. Hodnocení.....	48
5. Závěr.....	55
6. Seznam použitých zkratek.....	57
7. Literatura.....	59

1. Úvod:

Význam antigenních systémů erytrocytů

Zařízení transfuzní služby jsou zodpovědná za odběr dárcovské krve, zpracování a testování na přítomnost infekčních chorob, které jsou přenosné krví (viry hepatitid, retroviry). Odebraná krev je dále zpracována na transfuzní přípravky (erytrocyty, trombocyty, plazmu), které jsou využívány k léčbě pacientů. Součástí zařízení transfuzní služby jsou imuno hematologické laboratoře, které provádí předtransfuzní vyšetření. Pro správné provedení předtransfuzního vyšetření je klíčová preanalytická fáze – správný odběr vzorku, jeho označení a transport za definovaných podmínek do příslušné laboratoře. V mnoha případech pomáhají imuno hematologické laboratoře řešit problémy, které mohou vzniknout během nebo po transfuzi (tzv. potransfuzní reakce). Jednou z příčin těchto reakcí může být výskyt protilátek v séru, které po reakci s antigenem erytrocytu mohou způsobit hemolýzu a následně poškození zdraví nebo i smrt pacienta.

U dárců krve se při každém odběru vyšetřuje krevní skupina a screening protilátek. Pokud je screening pozitivní, musí být protilátka určena (identifikována) dalšími testy. Obdobné vyšetření (krevní skupina, screening protilátek, popř. identifikace protilátek) se také provádí u pacienta, který se stane příjemcem transfuze. Součástí předtransfuzního vyšetření je také zkouška slučitelnosti (křížová zkouška, cross match test),

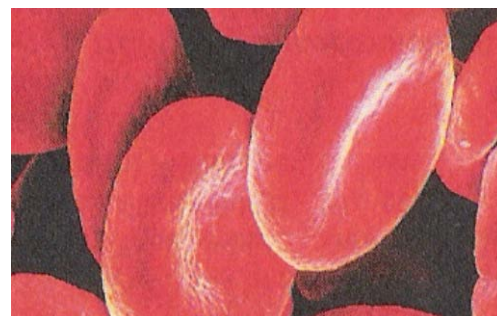
která potvrdí, že krev dárce je slučitelná s krví pacienta a že transfuze by měla proběhnout bez imunologických problémů.

Cílem této práce bylo zjistit četnost výskytu antigenních systémů AB0, Rh a Kell u dárců krve. Práce vznikla retrospektivním zpracováním výsledků vyšetření dárců, kteří darovali krev na transfuzním oddělení Fakultní nemocnice v Hradci Králové od 1. ledna do 31. prosince 2006.

2. Teoretická část:

2.1. Erytrocyty

Erytrocyt je bezjaderná buňka, v krvi nejpočetněji zastoupená. Neobsahuje většinu nitrobuněčných struktur, proto erytrocyt považujeme spíše za neúplnou buňku.



Jeho struktura je uzpůsobena tak, aby snesl opakované deformace z průměru kolem 7,2 μm ve velkých cévách na průměr kolem 2 μm v kapilárách.

Membrána erytrocytu je elastická a pevná, může do ní omezeně pronikat voda a některé anionty, ale zabraňuje úniku kationtů a bílkovin (hlavně hemoglobinu). V membráně se uskutečňuje výměna lipidů mezi erytrocyty a plazmou. Můžeme ji rozdělit na dvě základní složky:

- a) vnitřní stranu membrány: jsou k ní fixovány kontraktilní bílkoviny, které napomáhají udržet tvar erytrocytu.
- b) vnější stranu membrány: jsou v ní uloženy integrální molekuly glykoproteinů a glykolipidů, které jsou nositeli *antigenních vlastností červené krvinky* ⁴

2.2. **Antigeny**

Antigeny jsou látky, které mohou, po jejich zanesení do cizího organismu, vyvolat specifický obranný mechanismus. Biologická úloha antigenních látek je definovat imunologické "JÁ" prostřednictvím biochemické struktury. To má hlavní význam pro integritu a individualitu každého organismu.³ Cizorodé bílkoviny, které se do těla příjemce dostanou jinou cestou než trávicím traktem, rozpozná tělo jako cizí látky. Rozpoznání cizí bílkoviny vyvolá imunitní reakci organismu. Tato obrana se mimo celkové reakce projevuje tvorbou specifických protilátek, které působí proti dané cizí látce.¹ Bílkovinné antigeny obsahují obvykle několik oblastí, na něž se váží jednotlivé protilátky; hovoříme o antigenních determinantách neboli epitopech.³ Antigeny jsou buď rozpustné v různých tělních tekutinách nebo se vyskytují na povrchu buněk většinou zabudované do struktury membrány.¹

Antigeny krevních skupin patří ke třem různým biochemickým skupinám:

glykoproteiny - obsahují cukernou a bílkovinnou složku

glykolipidy - obsahují cukernou a lipidovou složku

lipoproteiny - obsahují lipidovou a bílkovinnou složku

Antigennost antigenů krevních skupin souvisí obvykle s cukernou nebo bílkovinnou částí molekuly, zatímco imunogenost souvisí s celou molekulou antigenu.¹

2.3. **Genetika krevních skupinových systémů**

Jako vlastnosti lidského těla se dědí i krevní skupinové systémy člověka. Krevní antigeny mají obvykle proteinovou složku, která je vytvářena procesem proteosyntézy. Člověk má pro každý krevní skupinový znak jeden gen tvořený dvěma úseky DNA, které jsou uloženy v lokusech chromozomového páru stejného chromozomu. Alely podle jejich schopnosti kódovat antigenní znak dělíme na:

- a) funkční (značíme je většinou velkým písmenem)
- b) němé (značíme je většinou malým písmenem).

Krevní skupinové znaky se dědí podle klasických pravidel genetiky. Tedy potomek získává jednu alelu z alelického páru od otce a druhou alelu z alelického páru od matky.¹

2.4. **Antigenní systémy**

V současnosti je známo více než 250 krevních skupin, které lze zařadit do 23 systémů. Mimo těchto systémů existují také sbírky krevních skupin (Globoside-sbírka), řady vysoké frekvence antigenů (HFA) a řady nízké frekvence antigenů (LFA).²

Podle přítomnosti protilátek a jim odpovídajících antigenů přísluší jedinci do různých krevních skupin, z nich jsou klinicky nejvýznamnější ABO a Rh.¹

Tab.1. Antigenní systémy podle nomenklatury ISBT ²

SYSTÉM	ISBT SYMBOL	ANTIGENY	POČET ANTIGENŮ
AB0	AB0	A, B, AB ¹ , A ¹	4
MNSs	MNS	M, N, S, s, U, Ena,...	38
P	P	PI	1
Rhesus	RH	D,C,E,c,e,C ^w ,...	45
Lutheran	LU	Lu ^a , Lu ^b , Lu ⁴ ,...	18
Kell	KEL	K, k, Kp ^a , Kp ^b , Js ^a , Js ^b ,...	21
Lewis	LE	Le ^a , Le ^b	3
Dyffy	FY	Fy ^a , Fy ^b , Fy ³ ,	6
Kidd	JK	Jk ^a , Jk ^b	3
Diego	DI	Di ^a , Di ^b , Wr ^a , Wr ^b	4
Cartwright	YT	Yt ^a , Yt ^b	2
Xg	XG	Xg ^a	1
Scianna	SC	Sm, Bu ³ , Sc ³	3
Dombrock	DO	Do ^a , Do ^b , Gy ^a , Hy, Jo ^a	5
Colton	CO	Co ^a , Co ^b	3
Land./Wiener	LW	Lw ^a , Lw ^b , Lw ^{ab}	3
Chido/Rogers	CH/RG	Ch1,Ch2,Ch3,Rg1,Rg2,WH	9
Hh	H	H	1
Kx	XK	Kx	1
Gerbich	GE	Ge2, Ge3, Ge4, Wb	7
Cromer	CROM	Cr ^a , Tc ^a , Tc ^b , Tc ^c , Dr ^a ,...	10
Knops	KNOPS	Kn ^a , Kn ^b , McC ^a , Si ^a , Yk ^a	5
Indian	IN	In ^a , In ^b	2

2.4.1. AB0 systém

První lidské antigeny systému AB0 objevil roku 1900 Karl Landsteiner.¹ Za tyto objevy krevních skupin, jimiž položil základy moderního transfuzního lékařství, byl Karl Landsteriner oceněn v roce 1930 Nobelovou cenou.²

Antigeny

Existují dva nejdůležitější antigeny – A a B. Geny, které kódují tyto antigeny, mají tři alely. Alely A a B jsou kodominantní, alela 0 je tichá, proto nevede k expresi antigenu. Jednu alelu člověk dědí po otci a druhou po matce a výsledkem je šest možných kombinací (genotypy AA, A0, BB, B0, AB a 00). Protože 0 je tichá alela, vede těchto šest kombinací ke čtyřem fenotypům krevních skupin: A, B, AB a 0.

Antigeny A a B jsou oligosacharidy obvykle umístěné ve velkém počtu na povrchu erytrocytů. Jsou tvořeny z prekurzoru (H antigen typ I nebo II), který má sám antigenní vlastnosti. H antigen je tvořen z jednoduché sloučeniny (základní látka). Tato základní látka nebo prekurzor je základem pro antigeny v Lewis, I a P systému. Antigeny AB0 systému jsou tvořeny hlavně z prekurzoru H II a jsou nejen na membráně erytrocytů, ale také volně v plazmě a sekretech (sliny, slzy).²

Antigeny tohoto systému se tvoří nepřímým procesem. Proteiny kódované alelami jsou vlastně enzymy - transferázy, které připojují galaktózu nebo galaktosamin k H antigenu a tím tvoří konečné antigeny krevních skupin. V ostatních systémech kódují geny přímo antigeny, které se nacházejí na proteinech kódovaných alelami genu.¹ Alely A a B přeměňují H-látku na A a B-antigen prostřednictvím enzymů, které je kódují. Alela 0 je tichá a tudíž H- látku nemění. V krevní skupině 0 se nachází na erytrocytech pouze H- látka.²

Tab.2. Různé kombinace genu u AB0 systému produkujících následující antigeny ¹

lokus 1	lokus 2	antigeny	skupina
A	A	A	A
A	0	A, H	A
A	B	A, B	A, B
B	B	B	B
B	0	B, H	B
0	0	H, H	0

Antigeny AB0 systému můžeme detekovat velmi brzo v embryonálním vývoji, ale při narození nejsou ještě maximálně vyvinuty. Počet A a B antigenů na erytrocytech novorozenců je menší než počet antigenů u dospělého člověka. Tento počet vzrůstá nejvíce v prvních letech života, dokud nedosáhne počtu dospělého jedince.

Podskupiny AB0 systému

Aglutinogeny A a B se nevyskytují ve všech erytrocytech ve stejné antigenní síle. Existuje několik kvantitativně i kvalitativně odlišitelných druhů antigenů A i B. ¹

A podskupiny

- A₁ 80%
- A₂ 20%
- A₃ 0,1 - 0,01%
- A_x skupiny s větší rozmanitostí
- A_m defektní skupiny

Rozlišení těchto skupin se děje postupným vysycováním aglutininu anti-A slabšími podskupinami.

B podskupiny

B_3, B_x, B_m ¹

Vyšetření krevní skupiny v ABO systému vždy zahrnuje:

- a) určení přítomnosti aglutinogenů (A, B nebo obou) na erythrocytech
- b) vyšetření protilátek (aglutininů) anti-A, anti-B v séru ¹

2.4.2. Rh systém

Landsteiner a Wiener objevili v roce 1940 králičí protilátky namířené proti opičím erythrocytům (Macac Rhesus), které také reagovaly s erythrocyty člověka (84%). ² Od tohoto pojmu je odvozen i název aglutinogenu a systému: *faktor Rhesus*. ¹ Osoby, které vykazovaly tuto reakci, byly popsány jako Rhesus-pozitivní a zbývajících 16% jako Rhesus-negativní. Antigeny, které králičí protilátky identifikovaly, byly označeny D. Později byl tento antigen popsán jako L/W (Landsteiner/Wiener). ²

Antigeny

RhD antigen byl objeven lidskou protilátkou a ukázal se jako velice důležitý pro systém krevních skupin. Tomuto systému zůstalo označení Rh (Rhesus) s D, C, c, E, e antigeny, které jsou v tomto systému nejdůležitější (nejvíce D antigen). Klasifikace D pozitivní a D negativní záleží na

přítomnosti či absenci D antigenu na erythrocytu. Ze všech antigenů tohoto systému je D nejvíce imunogenní a indukuje tvorbu protilátek u těch jedinců, kteří jsou D negativní. Přibližně 80% D negativních lidí tvoří protilátky po první transfuzi s D pozitivními krvinkami. Anti-D protilátky mohou způsobit vážné problémy po další transfuzi a během těhotenství. D pozitivní krev by neměla být podána D negativnímu pacientovi.

Molekulárně - biologický výzkum ukázal, že Rh systém obsahuje dva úzce propojené geny: CcEe gen a D gen, které jsou umístěny na prvním chromozómu. Alely C, c, E, e kódují antigeny C, c, E, e. Jsou tedy možné čtyři kombinace alel: CE, Ce, cE a ce. Alely C a c a alely E a e jsou kodominantní tím pádem jsou obě exprimovány. D gen kóduje D protein a když chybí D gen, říkáme, že jde o d alelu. To ale není alela, ale pouze označuje nepřítomnost D antigenu, takže d protein ve skutečnosti neexistuje. Oba geny D systému (D a CE) jsou úzce spjaty a dědí se společně.

D antigen tvoří velmi složitou strukturu, která souvisí s cytoskeletem erythrocytů a dalšími antigeny jako gp50 a CD47. Známe molekulární základ Rh genů a velkou podobnost mezi D a CcEe geny.

Různé Rh-alely na jednotlivých chromozómech spolu tvoří Rh-haplotyp. Existuje osm možných Rh-haplotypů: CDe (R_1), cDE (R_2), CDE (R_z), cDe (R_0), Cde (r'), cdE (r''), CdE (r_y), cde (r).

Rh geny jsou kodominantní a je tedy možné určit genotyp sérologicky, ale musíme si uvědomit, že Rhd antigen není.

D antigen erythrocytů může mít kvantitativní a kvalitativní variabilitu, mluvíme tedy o slabém a silném antigenu nebo o D variantě. Kvantitativní variace může znamenat vyšší nebo nižší počet D antigenů na membráně erythrocytu. Přítomnost C a E antigenu potlačuje expresi D antigenu. Kvalitativní variace (D-varianta) znamená, že antigen není kompletní, část molekuly, na které se antigen nachází, chybí.

RhD null označuje nulový genotyp, kdy chybí všechny antigeny. Tento genotyp se vyskytuje vzácně a může být způsoben absencí genů systému (amorfní typ). Další možností je špatná exprese genů (regulační typ).

Antigeny C, c, E, e jsou mnohem méně imunogenní než D antigeny. Imunogenita klesá v řadě od nejsilnějšího k nejslabšímu antigenu: D, c, E, C, e. Nejčastěji se tvoří protilátky anti-c a anti-E.

Další významný antigen je C^w, který byl objeven v roce 1946. Prakticky všechny erythrocyty, které jsou pozitivní na tento antigen, mají také antigen C. Má význam při screeningu protilátek.

G antigen byl objeven v roce 1958. Obvykle se vyskytuje společně s D nebo C antigenem. Prakticky všichni, kdo jsou D nebo C pozitivní, jsou také G pozitivní. Tento antigen má význam při určování otcovství.

V této chvíli známe 48 Rh antigenů a velký počet jejich kombinací. Ty nacházíme, když jsou dvě alely na jednom chromozómu (cis).²

Tab.3. Rh komplexy¹

<u>CDE nomenklatura</u> geny: CDE	<u>Wienerova nomenklatura</u> geny: R
CDe	R ₁
cde	r
cDE	R ₂
cDe	R ₀
Cde	r'
cdE	r''
CDE	R _z
CdE	r _y

Antigeny Rh se objevují u plodu již v časném stádiu vývoje embrya.

Určování Rh skupin se provádí:

- na destičkách
- ve zkumavkách
- na gelech jako sloupcová aglutinace ¹

2.4.3. Kell systém

Systém byl pojmenován po pacientovi (Kelleher), u kterého Coombs a spolupracovníci v roce 1946 objevili protilátky proti neznámému antigenu. Zjistilo se, že tento systém má obrovský klinický význam.²

Antigeny

Základ pro Kell systém tvoří tři geny umístěné na sedmém chromozómu v lokusu Kell. Tyto geny jsou dědičně spjaty, ale jejich produkce závisí taktéž na genech z XK lokusu na X chromozómu. V této chvíli známe 23 alel Kell systému. Nejdůležitější antigeny jsou: K, k, Kp^a, Kp^b, Kp^c, Js^a, Js^b.⁵ Tento systém obsahuje hlavně antigeny nízké frekvence výskytu (LFA) a antigeny vysoké frekvence výskytu (HFA). Kell systém se nachází na membráně erytrocytů v podobě glykoproteinu.

K antigen je silně imunogenní, v klinické významnosti stojí těsně za antigeny AB0 a Rh systémů. Antigeny K a k vznikají v časně fázi vývoje, nacházíme je u již v 10. týdnu těhotenství, plně jsou vyvinuty na erytrocytech při narození.

Kp^a -antigen je antigen vysoké frekvence, zatímco Kp^b je antigen nízké frekvence. Kp^a -antigen se vyskytuje častěji v bělošské populaci.

Js^b - antigen je antigen vysoké frekvence, zatímco Js^a je nízké frekvence. Js^a -antigen se častěji vyskytuje v negroidní populaci.²

2.4.4. Lewis systém

Lewis systém není pravým krevním skupinovým systémem. Jeho antigeny se navazují na povrch erytrocytu až sekundárně tzv. absorpcí z plazmy. Ale asi 30% Le substance se neabsorbují a zůstávají rozpuštěno v plazmě.¹ Lewis systém se zkracuje jako Le a má úzkou souvislost s AB0, I a P systémy.²

Antigeny

Geny systému Lewis mají dvě alely: Le a le. Alela le je tichá a nekóduje antigen. Nejdůležitější Lewis antigeny jsou Le^a a Le^b. Tvorba antigenů je kontrolována alelami Le a le, ale také alelami Se a se genu pro sekreci. Se alela zajišťuje produkci AB0 antigenů v plazmě a mění prekurzorovou látku v plazmě na H antigen, ze kterého později vznikají A a B antigeny v plazmě.

Le alela kóduje enzym Le-transferázu, která přidává molekulu fukózy k prekurzorové látce. To vede k tvorbě Le^a antigenu. Když je přítomna také Se alela, nacházíme v plazmě H antigen. Le-transferáza přidává fukózu na H látku cirkulující v plazmě a tvoří se Le^b antigen. Se a Le-transferáza tedy soutěží o stejnou prekurzorovou látku. Se-transferáza je více účinná než Le-transferáza a to je důvod, proč vzniká více Le^b

antigenu. Ve skutečnosti je množství Le^a antigenu na erytrocytu velice malé. Lewis antigeny se absorbují z plazmy na membránu erytrocytů.

Lewis antigeny nemůžeme identifikovat hned po narození použitím běžných technik. Většina dětí ve věku tří měsíců má fenotyp $Le(a+b-)$ a Le^b se začíná tvořit později, takže v další fázi je fenotyp $Le(a+b+)$. Konečný fenotyp zjistíme u dítěte až v sedmi letech. ²

2.4.5. **Duffy systém**

Cutbush objevil tento systém v roce 1950. Je pojmenován po prvním pacientovi, u kterého byly protilátky proti těmto antigenům nalezeny.

Zkrácený název je Fy . ²

Antigeny

Známe sedm různých Duffy-antigenů: Fy^a , Fy^b , $Fy3$, $Fy4$, $Fy5$, $Fy6$, Fyx . Nejdůležitější jsou Fy^a a Fy^b . Geny pro Duffy systém jsou umístěny na prvním chromozómu, obdobně jako geny pro Rh systém. ² Alely se mohou vzájemně zastupovat na lokusu pro geny a platí pro ně následující:

- antigeny Fy^a , Fy^b , Fy^{bw} jsou mezi sebou kodominantní
- antigeny Fy^a , Fy^b , Fy^{bw} jsou dominantní vůči Fy ¹

Frekvence výskytu těchto antigenů se liší podle populace, např. Fy^a je v 99,7% zastoupen v čínské populaci, ale jen v 10% v negroidní populaci.

$Fy3$ antigen najdeme jen na buňkách s antigenem Fy^a nebo Fy^b , takže pokud člověk nemá tyto antigeny, nemůže mít ani $Fy3$.

Duffy antigeny jsou méně imunogenní než antigeny v AB0, Rh a Kell systému.

Přítomnost antigenů Duffy systému má vztah k onemocnění malárií. Je dobře známé, že většina negroidní populace je rezistentní na určitou formu malárie. Tato souvislost se vyskytuje u Plasmodium Vivax a P. Knowlesi, které v případě absence Fy^a a Fy^b nemohou proniknout do buňky.

Fy^a a Fy^b antigeny můžeme vždy identifikovat již u šestitýdenního plodu a jsou plně vyvinuty již při narození. ²

2.4.6. Kidd systém

Tento systém objevil v roce 1951 Allen. Známe zde tři antigeny. Jednoduchý gen se třemi alelami je zodpovědný za tento systém. Kidd systém zkracujeme jako Jk. ²

Antigeny

Tři alely genu se nacházejí na osmnáctém chromozómu: Jk^a , Jk^b a Jk . Jk alela je tichá alela a nekóduje žádný antigen. ² Alely se mohou vzájemně zastupovat a platí pro ně následující:

- Jk^a , Jk^b jsou kodominantní
- Jk^a , Jk^b jsou dominantní nad znakem němé alely Jk ¹

Fenotyp Jk (a-b-) se v populaci v západní Evropě vyskytuje velmi vzácně, avšak často ho můžeme nalézt v zemích v Tichém oceánu, na Novém Zélandu a na Havajských ostrovech. ² Tento vzácný fenotyp propůjčuje buňkám odolnost vůči roztoku močoviny. ⁵

Jk^3 antigen je nalézán pouze v přítomnosti Jk^a nebo Jk^b antigenu.

Kidd antigeny jsou méně imunogenní než AB0, Rh a Kell antigeny.

Kidd antigeny můžeme detekovat v časně fázi vývoje plodu i na erythrocytech pupeční šňůry a jsou dobře vyvinuty již při narození.²

2.4.7. Lutheran systém

Tento systém objevil Callender v roce 1945 a v současnosti u něj známe 18 antigenů. Většina antigenů se v populaci vyskytuje hojně. Zkratka Lutheran systému je Lu.² Geny Lutheran systému jsou v těsném sousedství s geny H AB0 systému.¹

Antigeny

Nejdůležitější antigeny Lu systému jsou Lu^a a Lu^b. Jejich alely jsou na devatenáctém chromozómu.² I u tohoto systému se mohou alely vzájemně zastupovat a platí pro ně následující:

- Lu^a, Lu^b jsou kodominantní
- Lu^a, Lu^b jsou dominantní nad znakem němé alely Lu.¹

Frekvence Lu^b antigenu v populaci je mnohem vyšší než v případě Lu^a antigenu. Fenotyp Lu (a-b-) se vyskytuje jen vzácně a můžeme rozlišit dva typy: dominantní a recesivní. V dominantním fenotypu je Lu gen přítomen, ale exprese tohoto genu je potlačena jiným genem (Lu-inhibiční gen). Na membráně erytrocytů existuje velmi málo Lu antigenů a nevytváří se alloprotilátky pro antigeny, pro které existuje odpovídající alela. Jedinci s recesivním fenotypem jsou homozygoti s tichou alelou a nemohou produkovat antigeny a tím pádem ani protilátky.

Lu antigeny nejsou při narození plně vyvinuty a jsou málo imunogenní. ²

2.4.8. MNSs systém

V základu zahrnuje dva systémy: MN a Ss systém. Roku 1927 Landsteiner a Levine našli na lidských erythrocytech nové aglutinogeny, které označili M a N, jsou odvozené od slova IMUNITA. Alely S a s zjistili v roce 1947 Walsh a Montgomery, pojmenovali je podle Sydney v Austrálii, kde byly antigeny poprvé zjištěny. ¹ Gen, který kóduje alely M a N, je úzce spjat s genem pro S a s. Tyto dva geny jsou na čtvrtém chromozómu a nevytvářejí mezi sebou crossing over. ²

Antigeny

MNSs systém obsahuje 40 antigenů, nejznámější jsou: M, N, S, s, U. MNSs antigeny se nacházejí na tzv. sialoglykoproteinu α , jinak zvanému glykoforin A. Ss antigeny jsou na sialoglykoproteinu β , jinak zvanému glykoforin B. U antigen je také na glykoforinu B a je přítomen u všech bílochů, kteří jsou S pozitivní, ale také u 16%, kteří jsou S i s negativní. Těžko bychom našli bělocha S i s negativního. U negativní jsou většinou negroidní populace.

MNSs antigeny můžeme detekovat u plodu velmi brzy, po narození jsou antigeny dobře vyvinuty. ²

2.4.9. P systém

Byl objeven v roce 1927 Landsteinerem a Levinem a obsahuje pouze jeden antigen, který vzniká ze stejné základní látky jako antigeny AB0, Lewis a I systémy.

Antigen tohoto systému se označuje jako P_1 , najdeme ho u 79% bělošské populace. Absence tohoto antigenu se označuje P_2 . Tento antigen samozřejmě neexistuje a nemá tedy ani protilátku. P_1 antigen je plně vyvinut v sedmi letech a je více frekventovaný v negroidní populaci než u bělochů. Během skladování erytrocytů s P_1 antigenem může dojít k jeho redukci a screening nám pak dá falešně negativní výsledek.

Anti- P_1 je v séru, když P_1 antigen chybí. Je to IgM chladový aglutinin, který jen zřídka reaguje při 37 °C. Nemůže tedy způsobit HON. Anti- P_1 v séru může způsobit problém při určování skupiny v AB0 systému v těch případech, kdy testovací erytrocyty A nebo B mají i P_1 antigen. Protilátky mohou být neutralizovány přidáním P_1 substance a detekovat je můžeme v solném roztoku. Aglutinace může být zesílena použitím enzymů. ²

2.4.10. Ii systém

Tento systém byl objeven v roce 1956 Wienerem. Obsahuje dva antigeny, které se tvoří ze stejné látky jako AB0, Lewis, P a Globosidy.

Anti-I jsou predominantní autoprotilátky a jen vzácně alloprotilátky. Autoprotilátku anti-I má v séru v nízkém titru i zdravý člověk. Pacienti s vysokým titrem mohou trpět autoimunitní hemolytickou anémií, která je způsobená IgM protilátkami.

Jsou známy také kombinace protilátek: anti-HI, anti-A₁I, anti-BI, anti- P₁I.

Při narození se na membráně erytrocytů nachází predominantně i antigen. Během prvních osmi měsíců je silně exprimován I antigen na úkor i antigenu. V dospělosti se vyskytuje v podstatě jen I antigen, ačkoli malé množství i antigenu zůstává. Velmi vzácně má dospělý člověk pouze i antigen.²

2.4.11. **Globoside sbírka**

Tato sbírka obsahuje tři antigeny, které vznikají ze stejné látky, která dává vznik antigenům v ABO a Lewis systému. Serologicky je velmi úzce spjata s P systémem.

Jsou zde tři antigeny: P, P^k a LKE (nebo Luke). Téměř 100% populace je P pozitivní. P^k antigen se v populaci vyskytuje vzácně, protože je prekurzorem P antigenu.

Anti-P nalzáme v séru, jestliže se jedná o P^k nebo p fenotyp, protože tito lidé nemají P antigen.²

2.4.12. **Krevní skupiny vysoké frekvence**

Tyto antigeny označujeme jako HFA: High Frequency Antigens. Dalším požívaným termínem může být: veřejné antigeny. Aby mohl být antigen zařazen do této skupiny, musí frekvence jeho výskytu v populaci

překročit 99%, nositelem antigenu musí tedy být prakticky každý jedinec. Mezi tyto antigeny patří například: Vel, Lan, Yt^a, Co^a, Ge^a.

Geny kódující HFA mají jednu alelu, pro kterou je frekvence v populaci velmi vysoká. Je také možné, že se vedle této alely nachází i alela tichá (velmi nízké frekvence). V krevních systémech jsou také popisovány HFAs, např.: Kell (Kp^b, Js^b), Lutheran (Lu^b), Globoside (P) a Ii (I).

Protilátky proti HFA mohou způsobit velké problémy, protože je velmi obtížné najít kompatibilního dárce krve pro pacienta, který je HFA negativní a vytvořil si protilátky. Pro takové případy se vytvářejí banky dárcovských erytrocytů, které se skladují v zamraženém stavu při teplotě pod -80 °C.

Protilátky proti některým HFA ukazují zvláštní serologické chování. Reagují ve vysokém titru, ale síla vazby a avidita je nízká, takže reakce je slabá. Tyto protilátky nazýváme HTLA (High Titre Low Avidity). HTLA jsou téměř klinicky nevýznamné a inkompatibilní erytrocyty téměř neničí.

2

2.4.13. **Krevní skupiny nízké frekvence**

Antigeny s velice nízkou frekvencí výskytu v populaci se označují LFA: Low Frequency Antigens. V současnosti známe více než sto těchto antigenů a někdy jsou tak vzácné, že je najdeme jen u členů rodiny, která jim dává jméno. Jejich alela je tichá a v populaci se vyskytuje hojně.

Příklady těchto antigenů jsou: Wr^a, Di^a, Co^b, Yt^b, Sc2. Tyto antigeny můžeme nalézt také v Kell (Kp^a, Js^a) a Rhesus systému (C^w). LFA musí

splnit určitá kritéria: dědičnost je dominantní nebo kodominantní, musí mít specifickou protilátku a musí být serologicky odlišen od ostatních LFA. ²

3. **Vyšetřovací metody pro identifikaci antigenních struktur**

Pro vyšetření většiny krevních skupinových systémů je požadován odběr co nejčerstvější, protože antigenní determinanty krevních skupin velmi rychle denaturují. Vyšetřovací metody pro stanovení krevních skupin využívají zejména *sérologické metody*.

Ke stanovení antigenních systémů využíváme diagnostická séra, která obsahují známý aglutinin. Mají předepsaný:

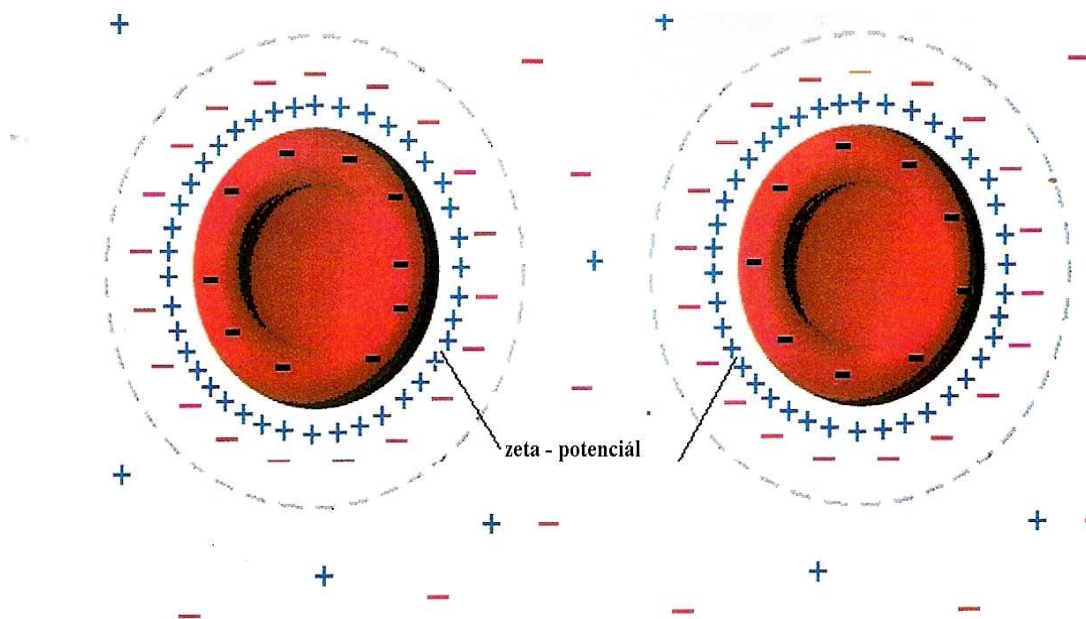
- a) titr, který představuje takové ředění protilátky, kdy ještě protilátka reaguje s antigenem a je vizuálně detekovatelná
- b) aviditu - veličina vyjadřující pevnost vazby mezi antigenem a protilátkou

Diagnostická séra můžeme získat od lidí, zvířat nebo používáme výtažků některých rostlin tzv. lektinů. ¹

3.1. **Detekce protilátek prostřednictvím aglutinace erytrocytů**

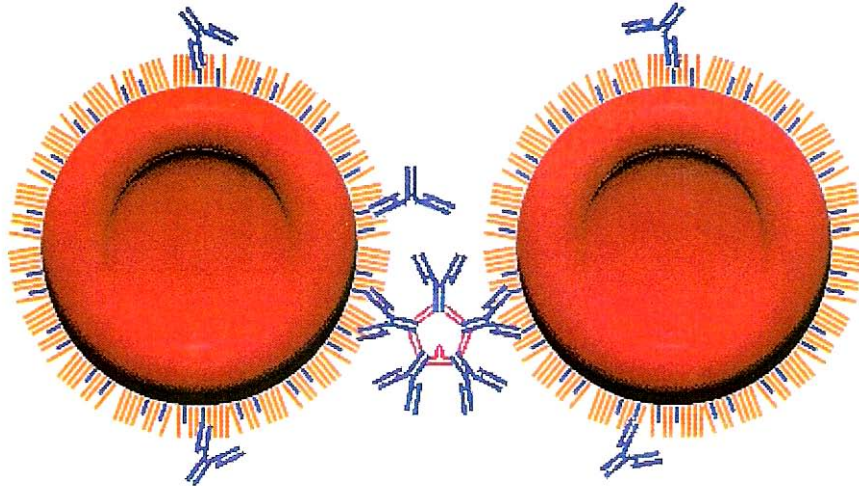
Nejvhodnější metody určené pro detekci protilátek proti erytrocytům jsou založené na aglutinaci. V takových metodách jsou erytrocyty po senzibilizaci protilátkami aglutinovány a výsledek reakce můžeme proto vidět pouhým okem. Pozitivní aglutinace znamená, že protilátky reagovaly s erytrocyty. Když se jedná o protilátky typu IgM (kompletní), aglutinace nastane přímo. V případě protilátek typu IgG (inkompletní) je třeba ke

zviditelnění reakce použít další látku, např. antiglobulinové sérum. Proto se k detekci IgG používají nepřímé metody. Skutečnost, že aglutinace erytrocytů se nevyskytuje vždy přímo, je způsobena určitými vzdálenostmi mezi erytrocyty. Proteiny přítomné na membráně erytrocytů jsou nabitě negativně a ve vodných i solných roztocích je okolo buněk vytvořen "vodní plášť" s kladně nabitými ionty. Výsledkem rozdílu potenciálu mezi negativně nabitými erytrocyty a kladně nabitými ionty v médiu je vytvoření tzv. zeta-potenciálu. Protože červené krvinky mají podobný náboj, odpuzují jedna druhou a tím si udržují mezi sebou určitou vzdálenost (přibližně 16 nm). Molekuly proteinů na membráně dávají povrchu erytrocytů záporný náboj. Erytrocyty přitahují kationty, vytváří se kladně nabitý mrak okolo membrány a tím vznikne rozdíl potenciálů (zeta-potenciál). Tento náboj způsobí, že erytrocyty odpuzují okolní erytrocyty. ²



Obr.2. Molekuly proteinů na membráně dávají povrchu erytrocytů záporný náboj. Erytrocyty přitahují kationty, vytváří se kladně nabitý mrak okolo membrány a tím vznikne rozdíl potenciálů (zeta-potenciál). Tento náboj způsobí, že erytrocyty odpuzují okolní erytrocyty. ²

Kompletní protilátky (IgM) mají průměr 30 nm a díky jejich Fab-částem (vazebná místa) jsou schopné přemostit vzdálenost mezi erytrocyty. IgM protilátky mohou způsobit přímou aglutinaci a proto jsou nazývány aglutininy. Aglutininy jsou schopné aglutinace erytrocytů za každých okolností, dokonce i v solném roztoku. ²



Obr.3. Přemostění erytrocytů pomocí kompletních protilátek ²

Menší inkompletní protilátky (IgG) se naváží na příslušný antigen červené krvinky (tzv. senzibilizují erytrocyty), ale nejsou schopny přemostit vzdálenost mezi erytrocyty. Vzdálenost mezi dvěma Fab- částmi jedné molekuly IgG je příliš malá pro spojení erytrocytů, protože rozsah mezi Fab-částmi je menší než 16 nm.

Pro identifikování těchto protilátek *in vitro* se využívají následující postupy:

Metoda č.1: Zmenšení vzdálenosti mezi erytrocyty.

Metoda č.2: Spojování protilátek na senzibilizovaných erytrocytech prostřednictvím protilátek proti lidským IgG-protilátkám (antiglobulinový test). ²

Existují určité výjimky, které umožňují protilátkám IgG přímo aglutinovat erytrocyty. IgG protilátky proti krevním skupinám A a B mohou způsobit aglutinaci v solném roztoku. To je způsobeno:

a) Antigeny systému AB0 jsou umístěny na glykoproteinu, který vyčnívá z buněčné membrány. Vzdálenost mezi A nebo B antigeny a dalšími erytrocyty je menší než vzdálenost mezi membránami buněk.

b) Počet A nebo B antigenů na membráně erytrocytů je obrovský. Když se obrovský počet molekul IgG-protilátek naváže na membránu, aglutinace se vyskytne i v solném roztoku. ²

3.2. Aglutinace erytrocytů senzibilizovaných inkompletními protilátkami

3.2.1. Snížení hydratace a iontového mraku okolo erytrocytů

Část vodního pláště a iontového mraku, který se nachází v těsné blízkosti erytrocytu, má negativní náboj a je zdánlivě připojen k buněčnému povrchu. Kolem toho je rozptýlen kladně nabitý mrak. Potenciál, který se nachází na tomto rozděleném povrchu, se nazývá zeta-potenciál. Snížením tohoto potenciálu se mohou erytrocyty přiblížit k ostatním a inkompletní protilátky mohou vyvolat aglutinaci. Snížení zeta potenciálu můžeme dosáhnout, pokud přidáme k suspenzi červených krvinek následující látky:

- polymery jako albumin
- polykationty: polybren
- proteolytické enzymy

3.2.1.1. **Albumin**

Albumin je bipolární polymer, jehož přidáním do suspenze erytrocytů se povrchový náboj erytrocytu změní. Bipolární molekula albuminu zabere místo pozitivní molekuly vody. Výsledkem je méně pozitivní částice, která se váže na membránu erytrocytů. Zeta-potenciál se sníží, vodní plášť okolo erytrocytu se ztenčí a vzdálenost mezi erytrocyty bude menší. Některé inkompletní protilátky mohou tedy překonat rozdíl mezi buňkami a aglutinovat je. Obvykle je užíváno 22% (někdy 30%) roztoku albuminu (BSA: Bovine Serum Albumin) v kombinaci s antiglobulinovým testem. Nepřímý antiglobulinový test (NAT) s přidáním albuminu je třífázová technika, pomocí které jsou detekovány protilátky např. v Rh systému. Reakce se odečítá ve třech časech: během solné fáze, po přidání albuminu, po přidání anti-human globulin séra.

3.2.1.2. **Polybren**

Kladně nabitě částice jako polybren zvyšují aglutinaci jejich reakcí se záporným nábojem přímo na povrchu erytrocytů. Tímto způsobem tvoří polybren přemostění mezi erytrocyty. Když se polybren přidá ve velké dávce, proběhne aglutinace spontánně. To však není způsobeno reakcí antigen-protilátka. Polybren se často užívá v kombinaci s antiglobulinovým testem.

3.2.1.3. **Proteolytické enzymy**

Proteolytické enzymy odstraňují část proteinů (glykoproteiny) z membrány erytrocytů. Mnoho z těchto glykoproteinů obsahuje řetězce cukrů se záporně nabitými kyselými skupinami a jejich konce, které jsou zodpovědné za záporný náboj na buněčném povrchu. Použití enzymu před testem redukuje záporný náboj a snižuje vzdálenost mezi erytrocyty. Poté může IgG-molekula přemostit vzdálenost mezi erytrocyty. Pro tento účel se používá papain, bromelin a ficin. Nevýhodné je, že enzymy odstraní také proteiny, na kterých jsou umístěny antigeny krevní skupiny (antigeny Duffy systému a MNS systému). To je důvod, proč protilátky proti těmto antigenům nemohou být detekovány pomocí této techniky. Touto technikou se vyšetřují např. protilátky systému Rh, Kidd a Lewis . Technika je citlivější než NAT. ²

3.2.2. **Zesílení vazby mezi protilátkou a antigenem**

Zesílením vazby mezi protilátkou a antigenem se aglutinace zlepší. Tohoto se docílí přidáním polyethylenglykolu (PEG) nebo ukotvením buněk v médiu o nízké iontové síle (LISS).

3.2.2.1. **PEG**

Polyethylenglykol je polymer rozpustný ve vodě, který extrahuje vodu z okolí, což zesiluje spojení protilátky a antigenu. Navíc ztráta vody zvyšuje koncentraci protilátky v séru během testu. PEG se používá v kombinaci s antiglobulinovým testem, ve kterém se používá monospecifická anti-human IgG. Metoda PEG je jednofázová technika (odečítá se po přidání anti-human globulin séra) a je velmi vhodná k identifikaci všech klinicky významných erytrocytárních protilátek.

3.2.2.2. **LISS: snížení iontové síly v médiu**

Suspenze erytrocytů je vytvořena v solném roztoku o nízké iontové síle, ve které se mohou protilátky vázat silněji k antigenům. LISS-metoda se používá v kombinaci s antiglobulinovým testem. Iontová síla je velmi rozhodující a proto se musí dodržovat přesné objemy LISS a séra. Tato metoda se užívá hlavně ve sloupcové technice.²

3.2.3. **Spojení molekul protilátek: antiglobulinový test**

Erytrocyty nemohou přímo aglutinovat s IgG protilátkami bez předchozí potenciace. Když jsou erytrocyty senzibilizované IgG protilátkami, mohou být aglutinovány prostřednictvím protilátek namířených proti navázaným imunoglobulinům. Aglutinace se vyskytuje, protože protilátky na různých erytrocytech jsou spojeny antiglobulinovou

molekulou v anti-human globulinovém séru (AGH sérum). Tento princip byl vyvinut v roce 1908 Moreschim a zaveden do praxe Coombsem v roce 1945. Druhý název pro antiglobulinový test je tedy: Coombsův test. Antiglobulinový test se netýká pouze protilátek proti imunoglobulinům, ale také protilátek proti faktorům komplementu. Antiglobulinový test je nejdůležitější metoda k identifikaci inkompletních protilátek. Tímto testem se detekuje senzibilizace erytrocytů IgG-protilátkami a faktory komplementu.

Přímý a nepřímý antiglobulinový test (PAT a NAT)

V imunohematologii se využívají dvě formy antiglobulinového testu. Přímý antiglobulinový test a nepřímý antiglobulinový test.

PAT se užívá k detekci *in vivo* senzibilizovaných erytrocytů pacienta, pro zjištění autoimunitní hemolytické anémie (AIHA), hemolytického onemocnění novorozenců (HON) a také pro určení příčiny hemolytické transfuzní reakce (HTR). U PATu se přidává k erytrocytům pacienta pouze AGH-sérum, erytrocyty jsou vždy už senzibilizované. Když je PAT pozitivní, může to ukazovat následující možnosti:

- autoprotilátky (AIHA)
- protilátky matky proti erytrocytům novorozence (HON)
- alloprotilátky proti erytrocytům vytvořené po předchozí transfuzi

PAT používá polyspecifické AGH-sérum, které obsahuje protilátky jak proti IgG tak i proti komplementu. Při pozitivním PATu jsou erytrocyty testovány odděleně s anti-IgG a anti-komplementem.

NAT se užívá pro identifikaci alloprotilátek, které se vyskytují volně v plazmě pacienta. Protilátky ve vzorku séra nebo plazmy se detekují, protože se v průběhu testu naváží na testovací erytrocyty (vazba *in vitro* na panel erytrocytů). NAT se používá pro zjištění přítomnosti protilátek při screeningu protilátek, testech kompatibility (CM test, cross match test) a při identifikaci protilátek. Při NAT je AGH-sérum přidáno po inkubaci testovacích erytrocytů se sérem pacienta, obvykle v přítomnosti potenciátorů reakce jako albumin, polybren, PEG, nebo LISS. Když je NAT pozitivní, znamená to, že jsou přítomny protilátky ve vzorku séra přímo proti antigenům na testovacích erytrocytech (screening a identifikace), nebo u erytrocytů dárce (CM test).

3.2.3.1. NAT

NAT zahrnuje tři fáze: senzibilizace, promytí, antiglobulinová fáze

1. Fáze senzibilizace – sérum se inkubuje s testovacími erytrocyty. Jestliže obsahuje sérum protilátky, pak se v této fázi naváží na diagnostické krvinky.
2. Fáze promytí – jsou odstraněny všechny nenavázané imunoglobuliny. Tato fáze je důležitá, protože nenavázané imunoglobuliny mohou reagovat s molekulami antiglobulinu a tak neutralizovat AGH-sérum a zapříčinit falešně negativní reakci.
3. Antiglobulinová fáze – je přidáno AGH-sérum. AGH-sérum obsahuje protilátky proti lidskému IgG. Tyto protilátky se navážou na IgG-molekuly, které jsou navázané na erytrocytech, vytvoří tedy přemostění mezi sousedními erytrocyty a tím způsobí aglutinaci erytrocytů.

3.2.3.2. Faktory ovlivňující citlivost NAT

- Fáze č.1*
- a) poměr séra a buněk (3-5% náplav erytrocytů + 2 kapky séra)
 - b) inkubační médium (albumin, polybren, LISS, PEG – nejčastěji v LISS po přidání BSA, polybren nebo PEG)
 - c) pH (5,5-8,5)
 - d) inkubační teplota (37 °C)
 - e) inkubační čas (15-30 minut)
- Fáze č.2:* Je důležité vždy zkontrolovat, zda promytí bylo důkladné pomocí tzv. Coombsových kontrolních buněk. Citlivost antiglobulinového testu vzrůstá při promývání při teplotě 4° C, protože jsou odstraněny i chladové protilátky.
- Fáze č.3:* Antiglobulinové sérum musí vždy obsahovat anti-IgG. Anti-IgA nejsou považovány za alloprotilátky. Jestliže jsou přítomny IgA-alloprotilátky, IgG-protilátky stejné specifity jsou vždy přítomny také. IgM-protilátky jsou chladové protilátky a nejsou klinicky významné. Citlivost testu může být zlepšena použitím anti-komplementu. AGH-sérum musí obsahovat také anti-C3d (nebo anti-C3g), protože na buňkách senzibilizovaných *in vivo* s komplementem je C3d přítomno, ale C3c není. C3c, C3d a C3g jsou antigenní determinanty na molekule C3b, která je navázaná na erytrocytu, když je aktivovaný komplement.

AGH-sérum, které obsahuje anti-IgG a anti-komplement, se nazývá polyspecifické AGH-sérum. To se používá hlavně u antiglobulinového

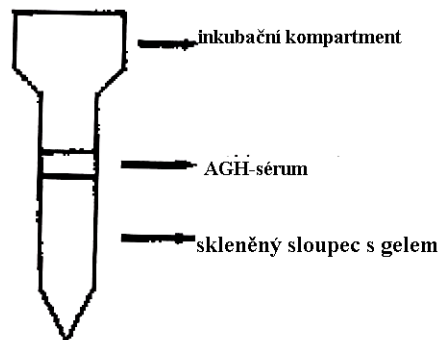
testu v solném roztoku, albuminu nebo v LISS. Při použití PEG a polybrenu se užívá pouze anti-IgG (monospecifické) AGH-sérum, protože v těchto technikách dává anti-komplement falešně pozitivní výsledek. Anti Jk^a a anti-Jk^b se identifikují pomocí PEG-NAT bez anti-komplementu. ²

3.3. Testy k vyšetření protilátek erytrocytů: ze zkumavky do sloupce

V minulosti se aglutinační testy prováděly na destičkách (slide), později bylo zavedeno vyšetření ve zkumavce (zkumavková metoda). Během posledních pár let došlo k rozvoji v optimalizaci antiglobulinového testu zdokonalením reakčního média a potenciátů.

Na konci osmdesátých let se vedle zkumavkové metody rozvinula první generace sloupcových testů. Tyto první sloupcové testy byly založeny na principu nepřímého antiglobulinového testu. Byly také označovány jako sloupcové (nebo gelové) aglutinační techniky. V těchto technikách je aglutinace senzibilovaných erytrocytů zakotvených v LISSu získávána v gelovém sloupci s AGH-sérem. Erytrocyty a sérum jsou inkubovány v inkubační části na povrchu gelu. Po inkubaci je sloupec centrifugován, během níž se erytrocyty dostávají do kontaktu s gelem. Senzibilizované erytrocyty aglutinují po reakci s AGH-sérem, které je přítomno v gelu. Po centrifugaci zůstává aglutinát nad sloupcovým materiálem, který funguje jako určitý druh síta. Nesenzibilizované erytrocyty nereagují s AGH-sérem v gelu a projdou gelem na dno sloupce. Fyzikální separace aglutinátů závisí na jejich velikosti a filtraci v gelu. Centrifugací jsou erytrocyty odděleny od séra a tedy i od nenavázaných imunoglobulinů, které

zůstávají v inkubační části sloupce. Není tedy nutné promývat erythrocyty po jejich inkubaci se sérem ve sloupci.



Obr.4. Gelový sloupec ²

Sloupcová technika má určité výhody oproti tradiční zkumavkové metodě. Metoda je rychlá, může být automatizována a erythrocyty nemusí být promývány. Výsledky se dají dobře interpretovat i později a mohou být odečítány přístrojově.

Od konce devadesátých let je na trhu druhý typ sloupcového testu. Tato druhá generace není založena na aglutinaci senzibilizovaných erythrocytů, ale na přímém spojení senzibilizovaných erythrocytů s matrix gelu uvnitř sloupce. Tento testovací systém je založen na Solid-phase technologii a je označován jako sloupcová (nebo gelová) afinitní technika.

Imuno-afinitní gelový sloupec obsahuje aktivní, imunoreaktivní fázi v médiu o vysoké hustotě.

V tomto sloupcovém afinitním testu jsou senzibilizované erythrocyty přímo zachyceny do aktivní fáze ve sloupci. Tato imunoreaktivní fáze obsahuje protein G (nebo protein A a protein G), anti-IgM a anti-komplementový faktor C3d, které jsou fixovány do gelové matrix (afinitní gel). Protein G je protein z buněčné stěny Streptokoka a váže se s velkou afinitou na Fc-část všech čtyř podtříd lidského IgG.

Senzibilizované erytrocyty tedy zůstanou v horní části sloupce, zatímco nesenzibilizované erytrocyty budou během centrifugace migrovat na dno sloupce. V reakci slabší než 4+ dosáhnou některé erytrocyty dna sloupce. U slabší reakce bude shromážděno po centrifugaci na dně sloupce více buněk.

Poměr mezi erytrocyty v horní a spodní části určí sílu reakce, která se může pohybovat mezi 0,5+ až 3+. Výrobce sloupcového afinitního systému je Sanquin (Cellbind systém).²

3.4. **Solid-phase metody na mikrotitrační destičce**

V devadesátých letech se rozvinuly techniky na mikrotitračních destičkách založené na pevné fázi pro sérologii krevních skupin. V této technologii je vždy jeden z reagentů předem fixován na mikrotitrační destičce. Příklady těchto systémů založených na Solid-phase technologii pro identifikaci a screening jsou Capture R (Immucor) a Solid screen (Biotest).

Capture R technika: technika je vhodná pro screening a identifikaci protilátek. Testovací erytrocyty jsou předem fixovány na dně mikrotitrační destičky. Buňky, které na dně tvoří velmi slabou vrstvičku (monolayer), jsou inkubovány se sérem. Po promytí jsou přidány indikační erytrocyty potažené anti-IgG. Po centrifugaci se odečítá výsledek.

The Solid Screen technika: tato technika je také vhodná pro screening a identifikaci protilátek. Sérum je nejprve

inkubováno s testovacími erytrocyty, poté následuje promytí. Erytrocyty jsou znovu rozpuštěny ve směsi anti-IgG/anti-C3d. Po senzibilizaci se erytrocyty fixují na aktivované dno mikrotitračních jamek prostřednictvím směsi anti-IgG/anti-C3d. V případě pozitivní reakce testované erytrocyty vytvoří souvislou vrstvu na dně jamky a v případě negativní reakce jsou erytrocyty akumulované pouze ve uprostřed jamky.

4. Výsledky

4.1. **Vyšetření skupinových systémů AB0, Rh a Kell ve zkumavkách**

4.1.1. **Princip:** Vyšetřovací metody jsou založeny na principu aglutinace.

Skupinový systém AB0 je charakterizován přítomností aglutinogenů A, B na erythrocytech a výskytem pravidelných, přirozeně se vyskytujících aglutininů anti A, anti B v séru nebo v plazmě. Z tohoto důvodu se krevní skupinový systém AB0 zjišťuje jednak detekcí aglutinogenu na erythrocytech pomocí diagnostických sér anti A, anti B, anti AB a současně se provádí detekce aglutininů v séru nebo v plazmě pomocí diagnostických erythrocytů 0, A₁, B.

Erythrocyty, které nesou antigeny, aglutinují v přítomnosti diagnostického séra proti těmto antigenům = pozitivní výsledek reakce. Erythrocyty, které tyto antigeny postrádají, neaglutinují = negativní výsledek reakce.

4.1.2. **Materiály:**

Laboratorní potřeby:

zkumavky

stojan na zkumavky

pipety

špičky

popisovače

Roztoky:

fyziologický roztok

Reagencie:

vyšetřovaný vzorek krve

diagnostické séra

diagnostické krvinky

Přístroje:

centrifuga

mikroskop

termostat

lednice

počítač

4.1.3. **Postup:**

1. Dodržujeme vždy pracovní postup uvedený na příbalovém letáku příslušného diagnostického séra.
2. Označíme vyšetřovaný vzorek krve, zkumavky.
3. Centrifugujeme vyšetřovaný vzorek krve (oddělení séra od erytrocytů).
4. Dále postupujeme dle návodu výrobce diagnostického séra.
5. Odečítáme výsledky aglutinace makroskopicky i mikroskopicky.
6. Současně testujeme pozitivní i negativní kontroly.
7. Výsledek zaznamenáme do příslušné dokumentace.

4.1.4. **Hodnocení:**

Pozitivní reakce: erythrocyty jsou aglutinovány - vyšetřované erythrocyty nesou příslušný antigen

Negativní reakce: erythrocyty neaglutinují - příslušný antigen není na erythrocytech přítomen

4.2. **Vyšetření skupinových systémů AB0, Rh a Kell na mikrotitračních destičkách**

4.2.1. **Princip:** Vyšetřovací postupy jsou založeny na principu aglutinace. Erythrocyty, které nesou antigeny jsou aglutinovány za přítomnosti diagnostického = pozitivní výsledek reakce. Erythrocyty, které postrádají antigeny = negativní výsledek reakce.

4.2.2. **Materiály:**

Přístroje:

QUATRO SP 400

fotometr AR - 96

tiskárny

centrifuga

třepačka

počítač

lednice

Reagencie:

vyšetřovaný krevní vzorek, odebraný do K₃EDTY

diagnostická séra

diagnostické krvinky

pozitivní a negativní kontrola

pozitivní kontrola pro erytrocyty

Roztoky:

fyziologický roztok + 4 kapky TWEEN

destilovaná voda + 4 kapky TWEEN

destilovaná voda

Laboratorní potřeby:

mikrotitrační destičky typu U

zkumavky

stojánek na zkumavky

pipety

špičky

kádinky

zásobník vzorků

budík

4.2.3. **Postup:**

1. Vyšetřované krevní vzorky označené barkódy a pořadovými čísly zcentrifugujeme.
2. Zkumavky narovnáme do zásobníku vzorků.
3. Příklad QUATRO SP 400 uvedeme do chodu podle příslušného návodu.
4. Rozkapané mikrotitrační destičky vizuálně zkontrolujeme. Inkubujeme při pokojové teplotě 15 minut, zcentrifugujeme a roztřepeme na speciální třepáče.
5. Výsledky odečítáme na READERU AR 96
6. Výsledek zaznamenáme do příslušné dokumentace.

4.2.4. **Hodnocení:**

Pozitivní reakce: erytrocyty jsou aglutinovány

Negativní reakce: erytrocyty nejsou aglutinovány

4.3. **Vyšetření skupinových systémů AB0, Rh a Kell panelovými krvinkami DIAMED na ID kartách**

4.3.1. **Princip:** Antigeny určujeme aglutinační reakcí červených krvinek s diagnostickými séry obsaženými v mikrokumavkách ID-karty.

4.3.2. **Materiály:**

Laboratorní potřeby:

zkumavky

stojánek

pipety

umělohmotné jednorázové špičky

mikropipety

Roztoky:

ID-diluent 1 (bromelín roztok)

ID-diluent 2(LISS)

Reagencie:

vyšetřovaný vzorek krve

ID-karty

Přístroje:

centrifuga

lednice

počítač

4.3.3. **Postup:**

1. Vyšetření provádíme na gelovém systému ID-Diamed dle pracovního návodu výrobce.
2. ID diluent a vyšetřované vzorky uvedeme před použitím na pokojovou teplotu.
3. Označíme vyšetřovaný vzorek krve, ID-karty a zkumavky.
4. Centrifugujeme vyšetřovaný vzorek krve a oddělíme sérum od erytrocytů.
5. Připravíme si 5% erysuspenzi v diluentu.
6. Do označené ID karty napipetujeme do mikrozkušavek 10 μ l 5% suspenze erytrocytů.
7. Zcentrifugujeme.
8. Výslednou reakci odečítáme makroskopicky.
9. Výsledek zaznamenáme do příslušné dokumentace.

4.3.4. **Hodnocení:**

Pozitivní reakce: erytrocyty jsou aglutinovány - červená linka na gelové suspenzi

Negativní reakce: erytrocyty nejsou aglutinovány - erytrocyty jsou na dně zkumavky

Statistické vyhodnocení

Výskyt antigenů erytrocytů v systémech AB0, Rh a Kell jsme sledovali u darců transfuzního oddělení FN v Hradci Králové, kteří byli vyšetřováni v období od 1.1.2006 do 31.12.2006. Tyto výsledky byly statisticky zpracované se spolehlivostí 0,999.

V roce 2006 darovalo krev celkem 8367 dárců, z toho bylo 5230 mužů a 3137 žen.

Tab.4. Výskyt antigenů systému AB0 (n= 8367)

AB0 systém	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
0	3006	0,3431	0,3756	35,93 %
A	2967	0,3385	0,3709	35,46 %
A1	274	0,0271	0,0392	3,27 %
A1B	47	0,00342	0,00863	0,56 %
A2	52	0,00389	0,00935	0,62 %
A2B	9	0,00056	0,00188	0,11 %
AB	632	0,0708	0,0805	7,55 %
B	1380	0,1583	0,1718	16,49 %

Tab.5. Výskyt antigenů systému RhD

RhD systém	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
POS	6668	0,7896	0,8042	79,69 %
NEG	1699	0,1958	0,2104	20,31%

U dárců, kteří jsou RhD pozitivní, není povinné vyšetření antigenů CcEe, proto nebylo toto vyšetření provedeno u všech dárců. Antigeny CcEe byly vyšetřeny u 6352 dárců z 6668 s RhD pozitivním tzn. u 95,26 %.

Tab.6. Výskyt antigenů CcEe u 6352 dárců s RhD pozitivním faktorem

antigeny CcEe	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
CC	1455	0,2130	0,2457	22,91 %
Cc	3685	0,5608	0,5993	58,01 %
cc	1212	0,1758	0,2064	19,08 %
EE	149	0,0180	0,0299	2,34 %
Ee	1882	0,2787	0,3143	29,63 %
ee	4321	0,6619	0,6982	68,03 %

Tab.7. Výskyt antigenů CcEe u 1699 dárců s RhD negativním faktorem

Antigeny CcEe	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
CC	2	$2,67 * 10^{-5}$	0,00659	0,12 %
Cc	150	0,0684	0,1115	8,83 %
cc	1547	0,8872	0,9306	91,05 %
EE	1	$5,88 * 10^{-7}$	0,00542	0,06 %
Ee	28	0,0085	0,0284	1,65 %
ee	1670	0,9709	0,9910	98,29 %

Tab.8. Výskyt antigenů erytrocytů u 8367 dárců v systému Kell

Kell systém	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
KK	10	0,00035	0,00288	0,12 %
Kk	655	0,0695	0,0878	7,83 %
kk	7702	0,9110	0,9294	92,05 %

Výskyt antigenů erytrocytů v závislosti na pohlaví

Tab.9. Výskyt antigenů erytrocytů v systému AB0 u mužů (n=5230)

AB0 systém	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
0	1821	0,3279	0,3688	34,82 %
A	1943	0,3509	0,3924	37,15 %
A1	135	0,0195	0,0333	2,58 %
A1B	26	0,00249	0,00877	0,50 %
A2	23	0,00210	0,00802	0,44 %
A2B	5	0,00014	0,00314	0,10 %
AB	400	0,0656	0,0885	7,65 %
B	877	0,1521	0,1842	16,77 %

Tab.10. Výskyt antigenů erytrocytů v systému RhD u mužů (n=5230)

RhD systém	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
POS	4172	0,7801	0,8146	79,77 %
NEG	1058	0,1854	0,2199	20,23 %

Antigeny CcEe byly vyšetřeny u 3982 z 4172 mužů s RhD pozitivním faktorem, tzn. u 95,45 %.

Tab.11. Výskyt antigenů CcEe s RhD pozitivním faktorem u mužů (n=4172)

Antigeny CcEe	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
CC	909	0,2081	0,2494	22,83 %
Cc	2323	0,5590	0,6075	58,34 %
cc	750	0,1696	0,2081	18,83 %
EE	89	0,0158	0,0306	2,24 %
Ee	1168	0,2713	0,3161	29,33 %
ee	2725	0,661	0,7069	68,43 %

Tab.12. Výskyt antigenů CcEe s RhD negativním faktorem u mužů (n=1058)

Antigeny CcEe	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
CC	1	$9,45 * 10^{-7}$	0,00869	0,10 %
Cc	94	0,0640	0,1190	8,88 %
cc	963	0,8514	0,9130	88,47 %
EE	1	$9,45 * 10^{-7}$	0,00869	0,10 %
Ee	16	0,0061	0,0306	1,51 %
ee	1041	0,9681	0,9933	98,39 %

Tab.13. Výskyt antigenů erytrocytů v systému Kell u mužů(n=5230)

Kell Systém	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
KK	4	8,196 * 10 ⁻⁵	0,00283	0,08 %
Kk	409	0,0672	0,0903	7,82 %
kk	4817	0,9089	0,9321	92,10 %

Tab.14. Výskyt antigenů erytrocytů v systému AB0 u žen (n=3137)

AB0 systém	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
0	1185	0,3472	0,4005	37,77 %
A	1024	0,2974	0,3490	32,64 %
A1	139	0,0334	0,0562	4,43 %
A1B	21	0,00304	0,01238	0,67 %
A2	29	0,0048	0,0156	0,92 %
A2B	4	0,00014	0,00466	0,13 %
AB	232	0,0596	0,0885	7,40 %
B	503	0,1391	0,1795	16,03 %

Tab.15. Výskyt antigenů erytrocytů v RhD systému u žen (n=3137)

RhD systém	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
POS	2496	0,7637	0,8089	79,57 %
NEG	641	0,1805	0,2249	20,43 %

Antigeny CcEe byly vyšetřeny u 2370 z celkem 2496 žen s RhD pozitivním faktorem, tzn. u 94,95%.

Tab.16. Výskyt antigenů CcEe s RhD pozitivním faktorem u žen (n=2496)

Antigeny CcEe	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
CC	546	0,2042	0,2581	23,04 %
Cc	1362	0,5429	0,6060	57,47 %
cc	462	0,1705	0,2211	19,49 %
EE	60	0,0165	0,0369	2,53 %
Ee	714	0,2725	0,3311	30,13 %
ee	1596	0,6430	0,7029	67,34 %

Tab.17. Výskyt antigenů CcEe s RhD negativním faktorem u žen (n=641)

Antigeny CcEe	Počet p dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
CC	1	$1,56 * 10^{-6}$	0,0143	0,16 %
Cc	56	0,0565	0,1270	8,74 %
cc	584	0,8712	0,9422	91,11 %
EE	0	0	0,0107	0 %
Ee	12	0,0063	0,0417	1,87 %
ee	629	0,9583	0,9937	98,13 %

Tab.18. Výskyt antigenů erytrocytů v systému Kell u žen (n=3137)

Kell systém	Počet dárců	Dolní mez	Horní mez	Pravděpodobnost výskytu
KK	6	0,00035	0,00568	0,19 %
Kk	246	0,0636	0,0933	7,76 %
kk	2885	0,8927	0,9245	90,95 %

5. Závěr

Předmětem závěrečné kapitoly této bakalářské práce je zhodnocení výsledků a jejich porovnání s očekávanými hodnotami. V předchozí kapitole byly antigenní vlastnosti erytrocytů u dárců krve FN transfuzního oddělení v Hradci Králové za období 1.1. 2006 až 12.12. 2006 statisticky zpracovány nejdříve bez závislosti na pohlaví a pak rozděleny v závislosti na pohlaví v jednotlivých systémech AB0, Rh a Kell.

V roce 2006 byla odebrána a vyšetřena krev 8367 dárcům, z toho bylo 5230 mužů a 3172 žen.

AB0 systém: Poměrné zastoupení jednotlivých krevních skupin u vyšetřené skupiny dárců krve (0-A-B-AB: 36-40-16-8) plně odpovídá údajům o zastoupení krevních skupin AB0 v evropské populaci kavkazského původu. Rozdíl ve výskytu krevních skupin A a 0 mezi soubory žen a mužů – vyšší výskyt skupiny A v souboru mužů - (muži 0:A 34,8: 40,2; ženy 0:A 37,8:38,0) není statisticky významný.

Rh systém: Obdobně jako u AB0 systému, i výskyt D antigenu v souboru vyšetřených dárců (79,7% D+, 20,3% D-) odpovídá údajům o zastoupení D antigenu v evropské populaci kavkazského původu. Nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi výskytem D antigenu mezi soubory mužů a žen.

Výskyt antigenů CcEe je rozdílný v souborech D pozitivních a D negativních dárců. U D- osob se nejčastěji vyskytuje kombinace ccee, což je v souladu s principy dědičnosti Rh systému. U D pozitivních dárců se nejčastěji vyskytuje kombinace Ccee. Nebyly zachyceny rozdíly mezi souborem žen a mužů. Všechny výsledky vyšetření CcEe antigenů jsou ve shodě s literárními údaji platnými pro bělošskou populaci Evropy.

Kell systém: Poměrné zastoupení antigenů Kell (kk-Kk-KK: 92-7,9-0,1) je ve shodě se známými údaji o zastoupení těchto antigenů v evropské – kavkazské populaci. Celkem 10 dárců (4 muži a 6 žen) s kombinací KK patří mezi vzácné dárce krve, jejich krev je nutná pro zajištění transfuzní léčby pro pacienty s protilátkou anti-k.

6. Seznam použitých zkratek

AGH sérum:	anti-human globulinové sérum
AIHA:	autoimunitní hemolytická anémie
BSA:	Bovine Serum Albumin
CD:	Cluster of differentiation
CM test:	Cross match test
Fy:	Duffy systém
gp:	glykoprotein
HFA:	Hight Frequency Antigens
HON:	hemolytické onemocnění novorozenců
HTLA:	Hight Titre Low Avidity
HTR:	hemolytické transfuzní reakce
ISTB:	International Society of Blood Transfusion
Jk:	Kidd systém
Le:	Lewis systém
LFA:	Low Frequency Antigens
LISS:	snížení iontové síly v médiu
Lu:	Lutheran systém
NAT:	nepřímý antiglobulínový test
PAT:	přímý antiglobulínový test

PEG: polyethylenglykol

7. Literatura

1. Přehled laboratorní hematologie III. Hemostáza, Imunohematologie;
Miroslav Pecka, Jaroslav Malý, Jana Dejmková;
vydavatelství Galén, r. 1998;
ISBN-80-85824-89-2

2. Immunohaematology;
C. P. Engelfriet, A. J. Meulenbroek, A. J. S. Visser, P. C. Ligthart,
M. A. M. Overbeeke;
vydavatelství Sanquin Reagents, r. 2003;
ISBN-90-5267-029-3

3. Imunohematologie & transfuzní lékařství;
Reinhold Eckstein, překlad MuDr. Vladimír Kulich;
vydavatelství DIAG HUMAN, r. 1994

4. Laboratorní hematologie v přehledu II., Fyziologie a patofyziologie
krevní buňky;
Miroslav Pecka;
vydavatelství FINIDR, r. 2006
ISBN-80-86682-02-1

5. Practical Transfusion Medicine;
Michael F. Murphy, Derwood H. Pamphilon;
vydavatelství Blackwell science Ltd, r. 2001;
ISBN-0-632-05114-0