

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Oddělení krevní banky FN Motol

Bakalářská práce

Aloimunizace v transfuzním lékařství

Vypracovala:

Jana Machálková

Vedoucí bakalářské práce:

Prim. MUDr. Květoslava Petrtýlová

Studijní program:

Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor:

Zdravotní laborant

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně a veškerou použitou literaturu a podkladové materiály jsem uvedla v příloženém seznamu literatury.

V Praze dne 16. dubna 2008

Podpis:

SOUHRN

V teoretické části práce je popsána obecná problematika imunologie s ohledem na její využití v transfuzní medicíně. Podrobněji popsán význam krevních skupin a klinický význam protilátek proti erytrocytům s ohledem na bezpečnou transfuzi a vznik hemolytického onemocnění novorozence. V práci je uveden přehled klinicky nejvýznamnějších antierytrocytárních protilátek. Dále jsou popsány imunohematologické vyšetřovací metody pro diagnostiku aloimunizace včetně rutinně používaných diagnostik při provádění základního předtransfuzního vyšetření. V praktické části práce je uveden přehled vyšetření pacientů s pozitivním screeningem nepravidelných protilátek, u kterých byly zjištěny specifické antierytrocytární protilátky v jednotlivých systémech krevních skupin a dále řada kazuistik s doporučením pro bezpečnou kompatibilní transfuzi. Jedna z kazuistik popisuje pozdní hemolytickou potransfuzní reakci.

Klíčová slova: krevní skupina, transfuze, screening protilátek, kazuistika

SUMMARY

In theoretic parts of the thesis are common problems of the immunology described with reference to its usage in blood - transfusion medicine. In more detail described meaning of blood groups and clinical meaning of antibodies against erythrocytes with reference to safe blood - transfusion and rise haemolytic disease of newborn. Thesis provide an overview of clinically most considerable antibodies. Further are immunohaematology investigative methods described used for diagnostic of alloimmunization inclusive groups used diagnostics in applying the provision basic pre-transfusion investigation. In practical parts of the thesis investigation survey is presented focused on inmates with positive screening irregular antibodies, near which were ascertained specific antibodies in several systems blood groups and further row casuistries with recommendation for safe compatible blood - transfusion. One casuistry describes the delayed haemolytic transfusion reaction.

Keywords: blood group, transfusion, screening of antibodies, casuistry

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych vyjádřit své poděkování všem, kteří mi pomáhali při zpracování bakalářské práce. Především mému školiteli prim. MUDr. Květoslavě Petrtýlové za odborné vedení a poskytnutí cenných rad. Dále děkuji vedoucímu laborantovi Oddělení krevní banky FN Motol Martinu Matějčkovi za všestrannou pomoc a ochotu při řešení problémů spojených s tvorbou bakalářské práce.

Ráda bych poděkovala Mgr. Kateřině Vašatové za pomoc a ochotu při řešení administrativních a technických záležitostí a Ing. Jakubu Víchovi za pomoc při odborném česko-anglickém překladu.

Nakonec bych chtěla poděkovat svým rodičům za jejich podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu studia.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 OBECNÁ IMUNOLOGIE	12
1.1 NESPECIFICKÉ MECHANISMY	12
1.2 SPECIFICKÉ MECHANISMY	12
1.3 ANTIGEN	13
1.4 PROTILÁTKA.....	13
2 PROTILÁTKY V IMUNOHEMATOLOGII	15
2.1 PŘIROZENÉ PROTILÁTKY	15
2.2 IMUNNÍ PROTILÁTKY	15
2.3 PRAVIDELNÉ A NEPRAVIDELNÉ PROTILÁTKY	16
2.4 PROTILÁTKY TŘÍDY IGM	16
2.5 PROTILÁTKY TŘÍDY IGG.....	17
2.6 REAKCE ANTIGEN – PROTILÁTKA	18
3 SYSTÉMY KREVNÍCH SKUPIN V IMUNOHEMATOLOGII	19
3.1 AB0 SYSTÉM	19
3.1.1 Biochemie AB0 systému.....	19
3.1.2 Podskupiny v AB0 systému	20
3.2 RH SYSTÉM.....	21
3.3 OSTATNÍ SKUPINOVÉ SYSTÉMY	23
4 KLINICKÝ VÝZNAM ANTIERYTROCYTÁRNÍCH PROTILÁTEK	24
4.1 AB0 SYSTÉM	24
4.1.1 Protilátky anti-A, -B.....	24
4.1.2 Protilátka anti-A ₁	24
4.1.3 Protilátka anti-H.....	24
4.2 RH SYSTÉM.....	25
4.2.1 Protilátka anti-D	25
4.2.2 Protilátka anti-C	25
4.2.3 Protilátka anti-C ^w	25
4.2.4 Protilátka anti-E	25
4.2.5 Protilátka anti-c	26
4.2.6 Protilátka anti-e	26
4.2.7 Protilátka anti-G	26
4.3 KELL SYSTÉM.....	26
4.3.1 Protilátka anti-K.....	26
4.3.2 Ostatní protilátky Kell systému.....	26
4.4 MNSS SYSTÉM	27
4.4.1 Protilátka anti-M	27
4.4.2 Protilátka anti-N	27

4.4.3	Protilátka anti-S.....	27
4.4.4	Protilátka anti-s	27
4.5	DUFFY SYSTÉM.....	28
4.5.1	Protilátka anti-Fy ^a	28
4.5.2	Protilátka anti-Fy ^b	28
4.6	KIDD SYSTÉM	28
4.6.1	Protilátka anti-Jk ^a	28
4.6.2	Protilátka anti-Jk ^b	28
4.7	LEWIS SYSTÉM	29
4.7.1	Protilátka anti-Le ^a	29
4.7.2	Protilátka anti-Le ^b	29
4.8	P SYSTÉM	29
5	METODY POUŽÍVANÉ K IMUNOHEMATOLOGICKÉMU TESTOVÁNÍ	30
5.1	DETEKCE PROTILÁTEK V IMUNOHEMATOLOGII.....	30
5.1.1	Přímý antiglobulinový test	30
5.1.2	Nepřímý antiglobulinový test.....	31
5.1.3	Přímá aglutinace.....	31
5.1.4	Gelová filtrace	31
5.2	IMUNOHEMATOLOGICKÉ LABORATORNÍ TECHNIKY	32
5.2.1	Sloupcová aglutinace	32
5.2.2	Gelová afinitní metoda.....	33
5.2.3	Metoda pevné fáze na mikrotitračních destičkách.....	34
5.2.4	Zkumavková metoda	35
II	PRAKTICKÁ ČÁST	36
6	PŘEHLED VYŠETŘENÍ PACIENTŮ S POZITIVNÍM SCREENINGEM PROTILÁTEK A JEJICH IDENTIFIKACÍ V OBDOBÍ ROKU 2007.....	37
6.1	ALOPROTILÁTKY V RH SYSTÉMU	38
6.2	ALOPROTILÁTKY V JINÝCH SYSTÉMECH	38
6.3	SMĚSI ALOPROTILÁTEK V RH SYSTÉMU.....	39
6.4	SMĚSI ALOPROTILÁTEK V RH SYSTÉMU A JINÝCH SYSTÉMECH	40
6.5	SMĚSI ALOPROTILÁTEK V JINÝCH SYSTÉMECH	40
7	ZAJÍMAVÉ IMUNOHEMATOLOGICKÉ KAZUISTIKY V OBDOBÍ ROKU 2007	41
7.1	JEDNOTLIVÉ PŘÍPADY	41
	ZÁVĚR A DISKUZE.....	51
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	56
III	PŘÍLOHY	57

ÚVOD

Transfuze je nejstarší typ tkáňové transplantace a má velmi bohatou historii. O podávání lidské krve nacházíme zmínky už v Bibli Svaté (Mathew 26:“..take drink..this is my blood...which is shed for you for the remissions of sins“),¹ dále ve staré Číně, starém Egyptě a velmi často během trvání Římské říše. Dokonce staří Římané praktikovali tzv. Taurobolium, neboli koupele v čerstvé krvi za účelem léčení a krásy. Za první „transfuzní komplikaci“ lze označit léčbu papeže Innocenta VIII., kterému bylo na základě doporučení židovského lékaře indikováno per os podávání krve čerstvě získané z desetiletých chlapců s následnou nauzeou a vomitem. Podávání lidské krve představovalo dlouhou dobu prostředek ke znovunabytí životní energie a plného zdraví (Libavius, 1615:“.. Let there be a young man, robust, full of spirituous blood, and also an old man, thin, emaciated, his strength exhausted, hardly able to retain his soul...the hot and spirituous blood of the young man will pour into the old one as it were from a fountain of life, and all of his weakness will be dispelled.”).¹ Významným pokrokem bylo objevení krevního oběhu (Harvey, 1628). Během dalších staletí proběhlo mnoho pokusů o intravenózní transfuze a to jak mezi zvířaty, tak i mezi zvířaty a lidmi. Nejcennější a nejvýznamnější poznatky v oboru transfuziologie přinesly však vždy válečné konflikty. Cílem transfuzní medicíny je v současnosti zabezpečení imunologicky kompatibilních transfuzí. Po opakovaně podaných transfuzích se mohou vytvořit protilátky proti antigenům nacházejícím se na erytrocytech, leukocytech, trombocytech a bílkovinách plazmy, které se nevyskytují u příjemců transfuze. Mluvíme o tzv. aloimunizaci.² Aloimunizace je tím častější, čím častěji se příjemce setká s cizím antigenem. Na aloimunizaci stačí podání 0,5 – 1 ml krve obsahující cizí antigen. Aloimunizace nastane cca po 2 – 3 týdnech, avšak nebezpečí vzniku aloimunizace není u všech antigenů stejné. Nejsilnější a nejúčinnější jsou antigeny Rh systému D, C, E, c, e, z ostatních je to antigen Kell. Tvorba protilátek proti cizím antigenům nezávisí jen na četnosti kontaktu, ale také na vnímavosti každého jedince. Každý jedinec má jinou náchylnost k aloimunizaci a tvorbě protilátek. Aloimunizace a tvorba protilátek nemusí vznikat jen při transfuzi, ale může nastat za přirozených podmínek během gravidity, kdy erytrocyty matky a plodu nemají totožné složení svých skupinových genotypů (HON). Před každým podáním transfuze je povinností provést předtransfuzní laboratorní vyšetření

a odhalit tak případně se vyskytující aloprotilátky v séru/plazmě příjemce, které by mohly způsobit potransfuzní reakci.²

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OBECNÁ IMUNOLOGIE

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu. Jeho funkcí je udržování integrity organismu tím, že rozpoznává škodlivé od neškodného a chrání tak organismus proti škodlivinám zevního i vnitřního původu.³ Na imunologickém obranném systému se podílí celá řada buněk. Nejdůležitějšími buňkami jsou však lymfocyty, které se kromě periferní krve nacházejí v thymu, slezině, lymfatických uzlinách a ve tkáních s mukózními membránami, jako jsou krční a nosní mandle. Imunitní mechanismy můžeme rozdělit do dvou základních kategorií a to na nespecifické a antigenně specifické.

1.1 Nespecifické mechanismy

Nespecifické mechanismy, nazýváme také jako neadaptivní, vrozené. Jsou evolučně starší a jsou založeny na molekulách a buňkách, které jsou v organismu připraveny předem a jsou obvykle účinné proti mnoha různým patogenům tím, že reagují na strukturní nebo funkční rysy, které jsou jim společné. Nespecifické imunitní mechanismy obsahují dvě složky a to buněčné a humorální. Buněčné nespecifické systémy jsou reprezentovány fagocytujícími buňkami a přirozeně cytotoxickými buňkami. Humorální složky nespecifické imunity tvoří komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny.³ Nespecifické mechanismy reagují na přítomnost škodliviny rychle, řádově v minutách. Nemají tzv. imunologickou paměť, nejsou tedy ovlivněny předchozím setkáním se škodlivinou.

1.2 Specifické mechanismy

Jedná se o mechanismy, které jsou evolučně mladší, adaptivní a antigenně specifické. Na cizorodou strukturu reagují prostřednictvím vysoce specifických molekul, jako jsou protilátky, antigenně specifické receptory T lymfocytů a aktivují se až po setkání s daným antigenem. Mezi ně patří mechanismy humorální, které jsou založeny na protilátkách a buněčně zprostředkované, založené na T lymfocytech. K úplnému rozvoji specifické imunitní reakce je zapotřebí několika dní až týdnů. Charakteristickým rysem těchto reakcí je imunologická paměť.³

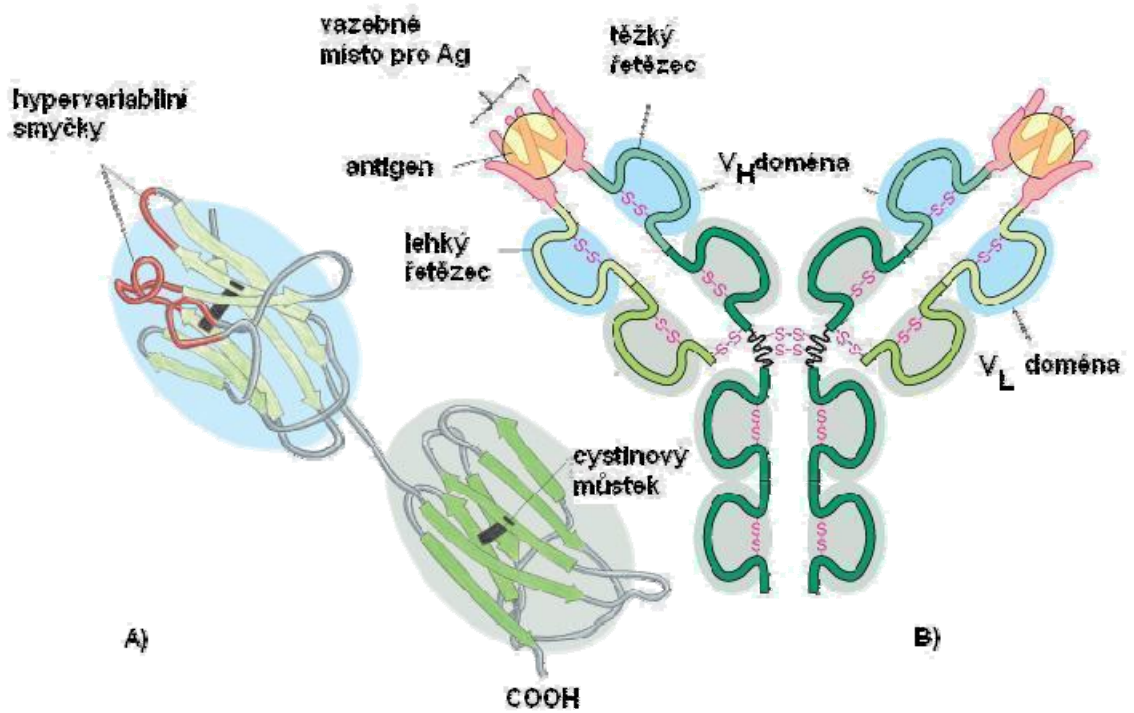
1.3 Antigen

Antigen je složitá organická molekula, která je schopná vyvolat imunitní odpověď. Nachází se na povrchu buněk a je většinou zabudovaný do struktury membrány nebo je rozpustný v tělních tekutinách. Na svém povrchu nese antigenní determinanty, které se váží

se specifickou protilátkou. Antigenní determinanty jsou bílkovinné povahy a skládají se buď z aminokyselin spojených do polypeptidů nebo z jednoduchých cukrů spojených do polysacharidů. Na povrchu krevních buněk, jako jsou erytrocyty, leukocyty a trombocyty, se nacházejí antigenní struktury, které jsou typické pro každý druh krevní buňky.² Imunitní odpověď je zahájena rozpoznáním antigenu jako cizí látky, kterou je potřeba z těla odstranit.

1.4 Protilátka

Protilátky jsou součástí bílkovin, které se nacházejí v krevní plazmě. Jsou důležitými činiteli v humorální imunitě, jejich hlavní funkce je reakce s příslušným antigenem, který vyvolal jejich tvorbu. V lidském séru se nachází pět strukturně odlišných tříd imunoglobulinů. Imunoglobulin IgG, IgM, IgA, IgD, IgE.² Základní struktura imunoglobulinové molekuly obsahuje dva těžké (H) řetězce, které jsou kovalentně spojeny disulfidickými (cystinovými) můstky. Ke každému H řetězci je cystinovým můstkem připojen jeden lehký (L) řetězec.³ Těžké řetězce se skládají ze čtyř domén, které jsou tvořeny sekvencí aminokyselin. Jednotlivé domény jsou spojeny krátkými úseky polypeptidového řetězce. Lehké řetězce se skládají ze dvou imunoglobulinových domén. Přibližná molekulová hmotnost L-řetězců je 25 kDa a H-řetězců je 50-75 kDa. Domény na N-konci těžkého i lehkého řetězce jsou variabilní. Ostatní domény jsou konstantní. Variabilní domény H a L řetězců vytvářejí společně vazebné místo pro antigen.³ Molekulu imunoglobulinu můžeme za určitých okolností rozštěpit na dva stejné fragmenty Fab a jeden fragment Fc. Oblast fragmentu Fab odpovídá za navázání molekuly imunoglobulinu na antigen, oblast Fc je důležitá pro aktivaci komplementu.



Obr.č.1 Prostorové uspořádání L řetězce(A), Struktura imunoglobulinu(B)

Zdroj: Převzato a upraveno z:

http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ecb/antibody_molecule.html

2 PROTILÁTKY V IMUNOHEMATOLOGII

Antigeny krevních skupin mohou indukovat tvorbu protilátek. Antierytrocytární protilátky mohou být klasifikovány různým způsobem. A to podle původu antigenu, proti kterému jsou namířeny, na základě příčiny tvorby protilátky (Ab) nebo podle jejího sérologického chování. Na základě původu antigenu se protilátky dělí na aloprotilátky, namířené proti antigenům cizího jedince a autoprotilátky, namířené proti vlastním antigenům. Podle příčiny tvorby rozlišujeme přirozeně se vyskytující, imunní, pravidelné a nepravidelné protilátky.³

2.1 Přirozené protilátky

Nacházejí se v séru většiny lidí a tvoří se přirozeným způsobem v průběhu života, např. přirozeným kontaktem s mikroorganismy nebo jinými živočišnými strukturami životního prostředí. Vznikají také procesem imunizace, ale více méně nepozorovaně, přizpůsobováním jedince okolí. Přirozené protilátky reagují při nižších teplotách a patří do imunoglobulinové třídy IgM.

Příklady přirozených protilátek: anti-A, -B, -AB, -A₁, -H, -HI, -Ii, -M, -N, -Le, -P, -Lu

2.2 Imunní protilátky

Jedná se o protilátky, které vytváří člověk při překonávání nemoci nebo po pasivním styku s antigenem a které by bez tohoto styku jinak nevytvořil. Séra, která takové protilátky obsahují, bývají označována jako imunní. Imunní protilátky reagují při 37°C a patří do třídy IgG.⁶ Nejčastějším příkladem kdy dochází ke vzniku imunních protilátek, je podání krevní transfuze nebo těhotenství. Na dárcovských erytrocytech prakticky vždy existují antigeny, které nejsou přítomny u příjemce. Kromě podání krevní transfuze, může imunizace nastat v těhotenství a to jako důsledek fetomaternálního krvácení. Díky tomu, že dítě zdědí antigeny jak od matky, tak od otce, mohou erytrocyty dítěte nést antigeny, které jsou pro imunitní systém matky cizí a ta může proti těmto antigenům vytvořit protilátky.

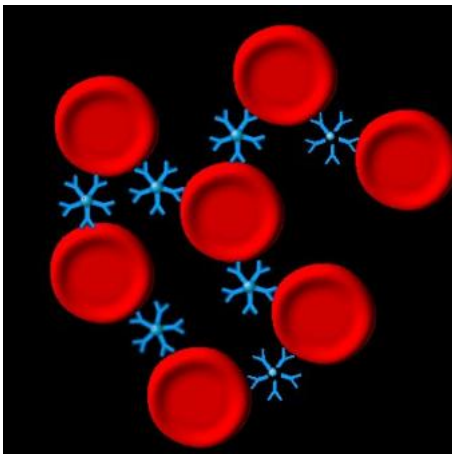
Příklady imunních protilátek: anti-Rh, -Kell, -Kidd, -Duffy, -Ss, -A(IgG), -B(IgG)

2.3 Pravidelné a nepravidelné protilátky

Mezi pravidelné protilátky patří anti-A a anti-B, které se vždy vyskytují u osob, kterým chybí odpovídající antigen. Všechny ostatní krevně skupinové protilátky se nazývají nepravidelné. Nepravidelné protilátky však mohou být přirozeně se vyskytující a imunní protilátky.

2.4 Protilátky třídy IgM

Molekula IgM protilátky má těžké řetězce μ typu a vyskytuje se ve formě pentameru. Má deset antigenních vazebných míst a je první třídou imunoglobulinu, která je vytvářena fetálním imunitním systémem. IgM protilátka velmi dobře váže a aktivuje komplement. Její velikost je 900 tisíc daltonů, a proto neprochází placentární bariérou a nezpůsobuje HON.² V imunohematologii jsou chladové protilátky třídy IgM a jsou průkazné metodou přímé aglutinace.

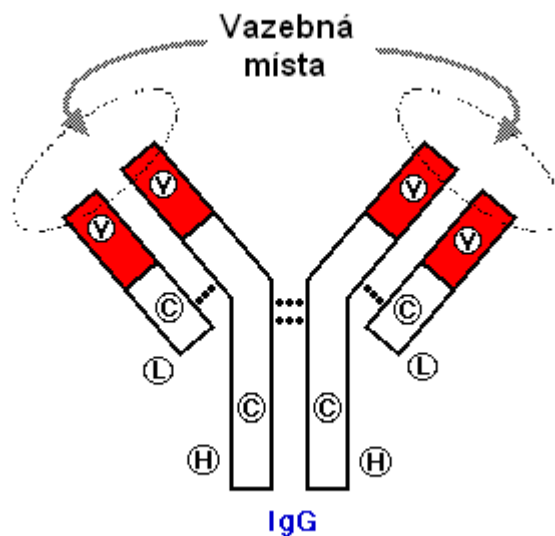


Obr.č.2 Přímá aglutinace erytrocytů molekulami IgM protilátky

Zdroj: http://www.bio-pro.de/md/images/rnd/igm_agglutiniert_338x338.jpg

2.5 Protilátky třídy IgG

Molekula IgG protilátky je pouze jedna jednotka s dvěma těžkými a dvěma lehkými řetězci a existuje pouze ve formě monomeru. Typický pro IgG molekulu je těžký řetězec typu γ . IgG molekula má čtyři podtřídy IgG₁ – IgG₄, které se liší sekvencí aminokyselin a také svou schopností navodit hemolýzu senzibilizovaných erytrocytů. Podtřídy IgG₁ a IgG₃ dobře vážou komplement, proto jsou z hlediska erytrocytární hemolýzy významné. Velikost molekuly je asi 130 tisíc daltonů, proto může procházet placentární bariérou a způsobovat destrukci fetálních erytrocytů (HON). Molekula IgG nestačí svou velikostí přemostit vzdálenost mezi erytrocyty, a proto je přímá aglutinace nemožná. K reakci je třeba modifikovat prostředí a zmírnit odpuzující van der Waalsovy síly mezi erytrocyty roztokem o nízké iontové síle (LISS) nebo na senzibilizované erytrocyty navázat protilátku proti IgG (AGH). Pro průkaz IgG protilátek se v imunohematologii využívá metody nepřímého AGH testu (NAT).



Obr.č.3 Molekula IgG

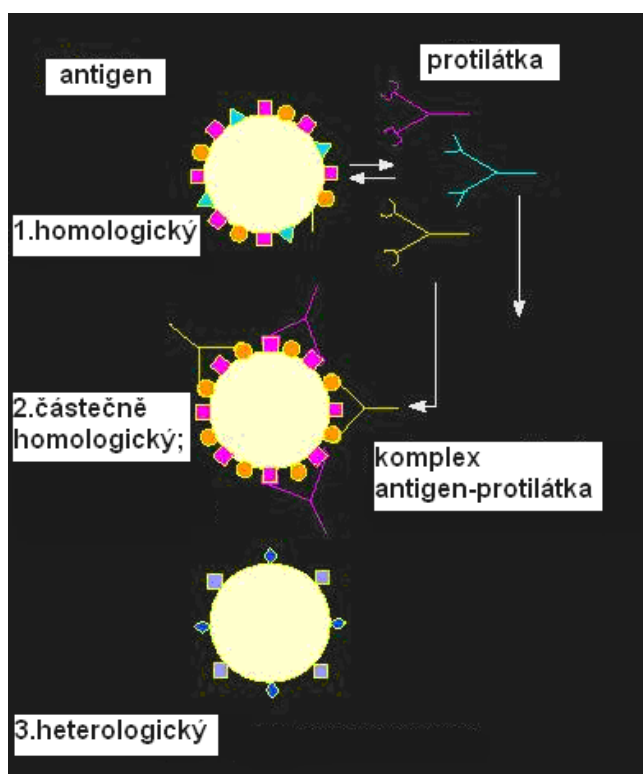
Zdroj: Převzato a upraveno z:

<http://www.science-projects.com/IgG.GIF>

2.6 Reakce antigen – protilátka

Vazebná místa protilátek tvoří nekovalentní komplexy s molekulami antigenů. Uplatňují se v nich iontové, hydrofobní a van der Waalsovy síly a vodíkové můstky.³ Vazebné místo je vždy svým tvarem a rozložením nábojů v něm více či méně komplementární ke struktuře na povrchu antigenu, se kterým vytváří komplex. Komplex antigen-protilátka je reverzibilní,

tj. vyznačuje se určitou rychlostí reakcí vzniku a rozpadu. Poměr rychlostních konstant vzniku a rozpadu komplexu definuje *rovnovážnou (asociační) konstantu*. Čím vyšší je konstanta, tím vyšší je afinita protilátky k antigenu. Tyto pojmy se týkají interakce jednoho vazebného místa s jednoduchým antigenem. Síla interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem vyjadřuje pojem *avidita reakce*, která vzrůstá s afinitou jednoduché interakce jednoho vazebného místa a s počtem simultánně se uplatňujících vazebných míst. Desetivalentní molekuly IgM se proto mohou vázat velmi silně (s velkou aviditou) např. na bakteriální povrch obsahující velký počet identických antigenních míst, ačkoli afinita jednotlivých vazebných míst k epitopům bývá u nich nízká.³



Obr.č.4 Reakce antigen – protilátka

Zdroj: Převzato a upraveno z:

<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ge17/21.jpg>

3 SYSTÉMY KREVNÍCH SKUPIN V IMUNOHEMATOLOGII

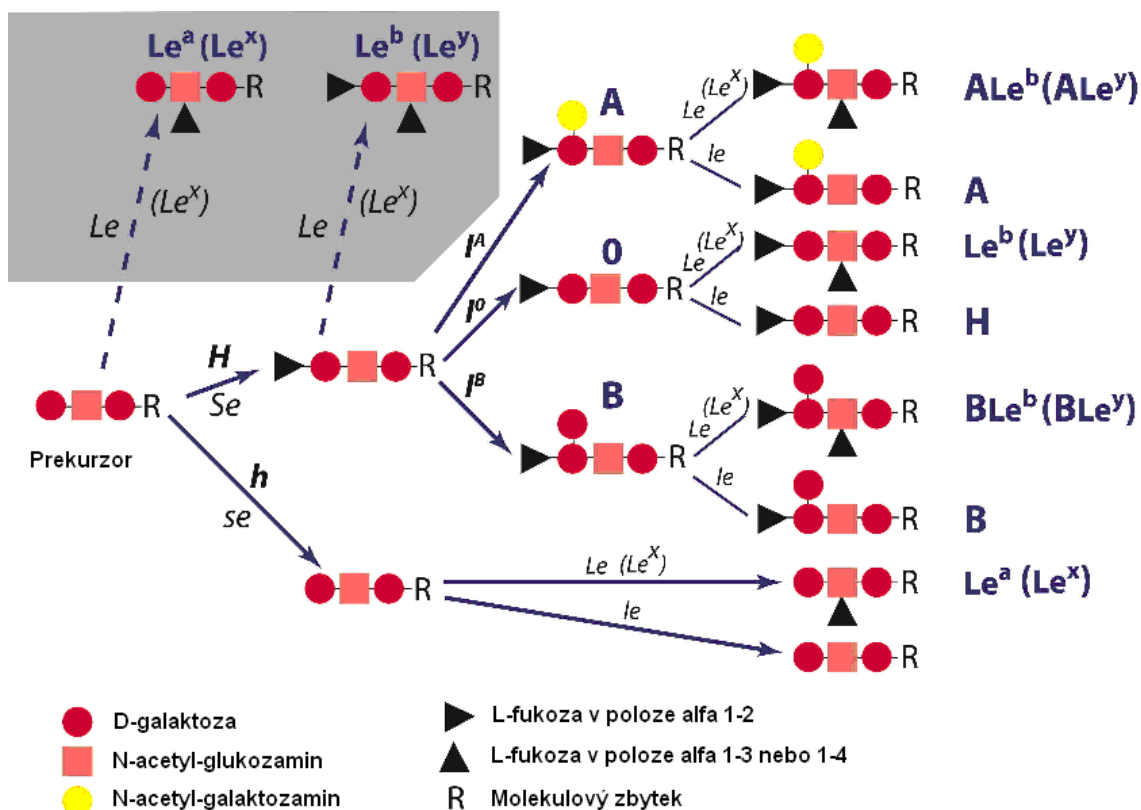
Krevní skupiny mají největší význam při transfuzi krve. V transfuzní praxi, kdy jsou podávány přípravky s viditelnou příměsí erytrocytů, je nutné dodržovat kompatibilitu v AB0/RhD systému. Každý antigen ze skupinového systému ABO, Rh a z ostatních skupinových systémů, který erytrocyty příjemce neobsahují, může vyvolat aloimunizaci.

3.1 AB0 systém

Skupinový systém AB0 je z hlediska objevu nejstarší a může být v imunohematologii označován jako základní. Systém AB0 určují tři základní alely: A, B a 0. Geny A, B a 0 se nacházejí na 9 chromozomu. Alely A, B a 0 se navzájem homozygotně a heterozygotně kombinují a dávají vznik 4 základním fenotypům (krevním skupinám) A, B, 0, AB. Gen 0 je vůči genům A, B ustupující a fenotypicky se objevuje pouze v homozygotní kombinaci. Příslušnost k jednotlivým krevním skupinám určuje přítomnost nebo chybění aglutinogenu A nebo B na erytrocytech a dvou přirozeně se vyskytujících aglutininů anti-A a anti-B v krevním séru.⁴

3.1.1 Biochemie AB0 systému

Antigeny systému jsou determinovány připojením příslušných sacharidových jednotek ke glykoproteinům. H gen kóduje enzym, který připojuje fukózovou jednotku (Fuc) ke konci prekurzorového řetězce. U lidí s genem A je k H antigenu připojen oligosacharid NAGA, zatímco u lidí s genem B je na toto místo připojen oligosacharid Gal.⁴ Lidé vlastní oba geny mají na povrchu erytrocytů oba tyto zmíněné antigeny.



Obr.č.5 Biochemie AB0 systému

Zdroj: Převzato a upraveno z:

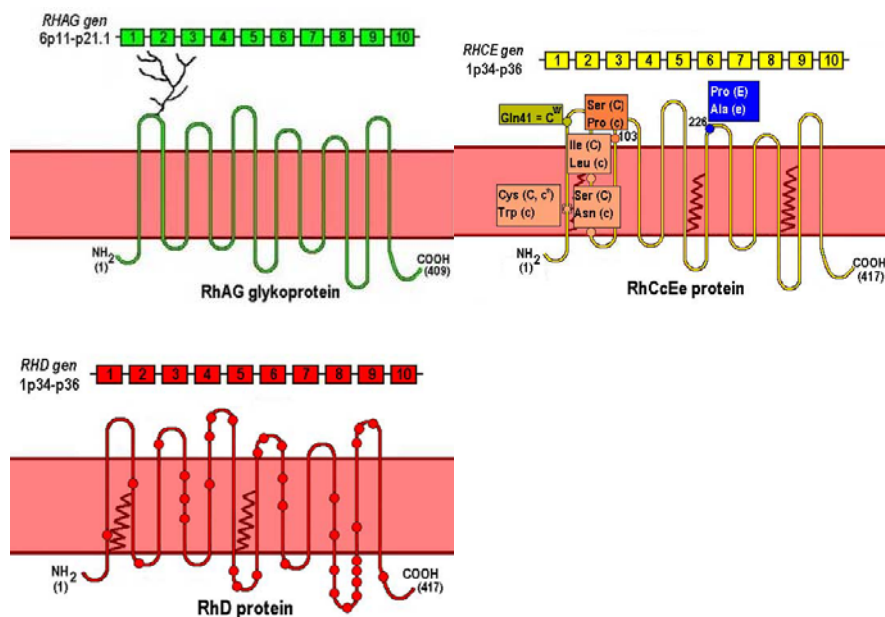
<http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/blgrou.html>

3.1.2 Podskupiny v AB0 systému

U krevních skupin A a B je známo větší množství podskupin. U krevní skupiny A jsou známy podskupiny A₁, A₂, A₃, A_x, A_{end}. U krevní skupiny B se dříve používaná nomenklatura rozdělení neuzívá. Rozdíly v podskupinách jsou kvantitativní (množství antigenů na povrchu buňky) i kvalitativní (typ enzymu, který modifikuje H řetězce). Co se týče obsahu antigenu H na erythrocytech různých krevních podskupin, je pořadí jeho množstvího zastoupení následující, od nejvyšší k nejnižší hodnotě: 0 > A₂ > B > A₂B > A₁ > A₁B.

3.2 Rh systém

Rh systém obsahuje nejméně 45 antigenů, z toho hlavní antigeny jsou C, c, E, e, D a C^w.⁴ Ze všech antigenů systému je antigen D (RhD) nejvíce antigenní, proto je podstatné třídění na D pozitivní a D negativní erythrocyty. Přibližně u 80% osob RhD negativních vyvolává styk s RhD antigenem po prvním stimulu specifickou protilátku anti-D.⁵ Tento transfuzně nejdůležitější antigen představuje soubor epitopů na povrchu extramembranózní části RhD proteinu.⁵ Epitopem je určité uskupení několika aminokyselin, závislé na uspořádání celého proteinu. V současné době je rozeznáváno asi 30 různých epitopů. Imunologická jedinečnost a velmi silná imunogenicita D antigenu je dána chyběním celého RhD proteinu u Rh minus jedinců, kteří vlastní pouze RhCcEe protein, který se od RhD proteinu liší více než 30-ti aminokyselinami.⁵ Systém obsahuje dva úzce propojené geny *CcEe* a *D*, které jsou lokalizovány na 1. chromozomu a zpravidla se dědí společně. Antigeny Rh systému vytváří komplexní strukturu, která je spojena s cytoskeletem erythrocytu a dalšími geny.



Obr.č.6 Struktura proteinů Rh systému

Zdroj: MUDr.M.Písačka CSc., ÚHKP Praha

Nomenklatura **Molekulární základ (sérologické vlastnosti)** **Frekvence**
%

<i>ISBT</i>	<i>tradiční</i>		<i>běloši-černoši-asiaté</i>
RH1	D	D+/D-... přítomnost či absence D proteinu	85(b)-92(č)-99(a) %
RH2	C	(Cys16, Ile60, Ser68) Ser103 na CcEe	27-68-93
RH3	E	Pro226 na CcEe proteinu	22-29-39
RH4	c	Pro103 na CcEe proteinu	47-80-96
RH5	e	Ala226 na CcEe proteinu	96-98-98
RH6	f	antigeny c a e v cis pozici	12-65-92
RH7	Ce	antigeny C a e v cis pozici	27-68-92
RH8	Cw	Gln41 na CcEe proteinu	1-2-6(ČR)
RH9	Cx	Ala 36 na ccEe proteinu	LFA(<0,01%)
RH10	V	Val245 Gly336 na CcEe proteinu	1(b)-30(č)
RH11	Ew	Hybridní RhcE gen	LFA
RH12	G	Ser103 na D a Ce(E) proteinu	84-92-100
RH17	Hr0	(anti-RH17 u D-, D., Dc, Dcw-)	HFA (~100%)
RH18	Hr	(neg. U Rh null, D-, hrS-)	HFA
RH19	hrS	(anti hrS raguje silněji s f+)	HFA(98%)
RH20	VS	Val245 na CcEe	LFA-32%(č)
RH21	CG	(slabá forma C antigenu?)	68(b)
RH22	CE	Antigeny C a E v cis pozici	<1%-2%(a)
RH23	Dw	U varianty D VaC(c)e	LFA

Tab.č.1 Nomenklatura Rh systému

Zdroj: MUDr.M.Písačka, CSc., ÚHKT Praha

3.3 Ostatní skupinové systémy

V současné době je definováno více než 600 antigenů krevních skupin, z nichž je asi 250 rozděleno do 23 systémů. Mezi významné skupinové systémy patří Kell, MNSs, Duffy, Kidd, Lutheran, Lewis, P.⁶

4 KLINICKÝ VÝZNAM ANTIERYTROCYTÁRNÍCH PROTILÁTEK

Vyšetřování nepravidelných protilátek proti erytrocytům (antierytrocytárních protilátek) patří mezi rutinní předtransfuzní vyšetření. V případě detekce nepravidelných protilátek, musí být určena specifita a klinický význam protilátky. Klinicky významná je ta protilátka, která zkracuje přežívání transfundovaných erytrocytů nebo je příčinou vzniku hemolytického onemocnění novorozence. Stupeň klinického významu je různý a závisí na rychlosti destrukci erytrocytů.⁶

4.1 AB0 systém

4.1.1 Protilátky anti-A, -B

Jedná se o přirozené protilátky. Jejich tvorbu mohou stimulovat střevní bakterie. Tyto bakterie mají na své membráně struktury podobné A a B antigenům, které jsou schopny indukovat imunitní systém k jejich tvorbě. Anti-A je přítomna v séru jedinců s krevní skupinou 0 a B. Anti-B je součástí séra jedinců s krevní skupinou 0 a A. Mohou způsobit mírné HON a těžké potransfuzní reakce (HTR).⁶ Jsou zpravidla třídy IgM a způsobují přímou aglutinaci. Nejsou přítomny u novorozenců, ale jejich tvorba je zahájena od třetího do šestého měsíce po narození. Maximální hladina je dosažena mezi pátým až desátým rokem věku dítěte.

4.1.2 Protilátka anti-A₁

Jedná se o klinicky přirozený chladový aglutinin, který obvykle nereaguje při 37°C.⁶ Nebývá příčinou HTR a HON. Během přípravy transfuzního přípravku není za potřeby vybrat transfuzní přípravek A₂, pokud Ab nereaguje v 37°C. Laboratorně je třídy IgM. Vyskytuje se u 1% osob s krevní skupinou A₂ a u 25% osob s krevní skupinou A₂B.

4.1.3 Protilátka anti-H

Jde o Ab, která je vždy přítomna v séru lidí s velmi vzácnou krevní skupinou Bombay. Protilátka anti-H se občas nachází v krvi lidí s krevními skupinami A₁, A₁B nebo B. Nebývá příčinou HON a HTR. Tato chladová protilátka není obvykle důležitá z pohledu transfuze, protože nereaguje při 37°C.

4.2 Rh systém

Protilátky proti antigenům Rh systému jsou téměř výhradně vytvářeny imunizací následkem krevní transfuze nebo v těhotenství. Jedná se o imunní IgG protilátky. Mohou být příčinou HTR i HON. Jsou optimálně aktivní při teplotě 37°C a nevážou komplement. Nejlépe

se určují pomocí NAT nebo enzymaticky ošetřenými krvinkami, např. bromelinem nebo papainem (ET).

4.2.1 Protilátka anti-D

Jde o Ab, které se z hlediska genové frekvence, ale i antigenní síly vyskytuje nejčastěji. Bývá příčinou těžké formy HTR a HON.⁶ Je třídy IgG a reaguje v NAT a v ET. Neaktivuje komplement a někdy může být i třídy IgM. Anti-D se může nacházet v kombinaci s anti-C a někdy s anti-G.

4.2.2 Protilátka anti-C

Vyskytuje se současně s anti-D. Je příčinou HTR i HON. Jedná se o IgG protilátku, která reaguje v NAT a ET. Někdy může být IgM přirozenou nepravidelnou protilátkou, která přímo aglutinuje erytrocyty.

4.2.3 Protilátka anti-C^w

Tato Ab se může v séru jedinců vyskytovat i bez předchozí imunizace. V tomto případě patří do třídy IgM. Pokud je třídy IgG pak reaguje v NAT i ET. Vzácně bývá příčinou HTR a HON.

4.2.4 Protilátka anti-E

Nachází se u osob s fenotypem ee. Protilátka se nachází v séru jak u Rh negativních, tak u Rh pozitivních osob. Někdy se zjistí anti-E Ab bez předchozí imunizace transfuzemi nebo těhotenstvím. Nazýváme ji přirozeně se vyskytující anti-E Ab. Tato přirozeně se vyskytující protilátka nemá žádný klinický význam. Ta anti-E Ab, která je třídy IgG je častá a bývá příčinou HRT i HON. Často se vyskytuje spolu s anti-c.⁶

4.2.5 Protilátka anti-c

Je klinicky častá Ab a je příčinou HTR a HON. Během transfuze je třeba podávat „c“ negativní erythrocyty. Je třídy IgG a reaguje v ET a NAT testu.

4.2.6 Protilátka anti-e

Patří mezi klinicky vzácné protilátky. Bývá příčinou HTR a HON. Je nejčastější specifita mezi IgG autoprotiátkami, které jsou příčinou autoimunitní hemolytické anémie (AIHA). Laboratorně je vždy třídy IgG.

4.2.7 Protilátka anti-G

Tato Ab reaguje s erythrocyty od D pozitivních nebo C pozitivních osob. Znamená to tedy, že anti-G nemůže být rozlišena *in vitro* od anti-C a anti-D.⁶ Je třeba podávat D negativní erythrocyty. Jedná se o vzácnou IgG protilátku, která může způsobit HTR a HON.

4.3 Kell systém

Protilátky proti antigenům Kell systému patří obvykle do třídy IgG a tvoří se po transfuzi nebo po těhotenství a mohou být příčinou HTR či HON.

4.3.1 Protilátka anti-K

Vyskytuje se velmi často kvůli silné imunogenicitě Kell antigenu. Může způsobit těžký HON s útlumem erythropoezy plodu i těžkou potransfuzní reakcí.

4.3.2 Ostatní protilátky Kell systému

Patří mezi protilátky proti antigenům s vysokou frekvencí výskytu, jako jsou antigeny k, Kp^b a Js^b. Způsobují komplikace při výběru vhodného transfuzního přípravku pro transfuze pacientům s těmito protilátkami pro malý počet vhodných, antigen negativních dárců.

4.4 MNSs systém

4.4.1 Protilátka anti-M

Je většinou přirozený aglutinin třídy IgM. Pokud patří ke třídě IgG může způsobit HTR a HON. Natrávení erytrocytů enzymy, jako je bromelin, papain a trypsin odstraní část glykoforinu A, na kterém jsou umístěny M antigeny. To způsobí, že M antigeny nejsou na erytrocytech dále detekovatelné. Anti-M Ab nelze tedy detekovat pomocí krvinek ošetřených enzymem, lze je prokázat pomocí solného a nepřímého antiglobulinového testu (NAT). Test kompatibility se musí provádět přísně při 37°C.

4.4.2 Protilátka anti-N

Má obvykle charakter IgM protilátky a jedná se často o přirozenou chladovou protilátku. Nebývá příčinou HTR a HON. Podobně jako anti-M bývá detekována pomocí solného a NAT. V praxi může dělat problémy při testech kompatibility, které je proto potřeba provádět přísně při 37°C.

4.4.3 Protilátka anti-S

Vyskytuje se převážně jako imunní Ab a v tomto případě je třídy IgG. Může však být přirozeně se vyskytující a pak je třídy IgM. Bývá příčinou HTR i HON. Působí přímo aglutinaci a často reaguje v NAT.⁶

4.4.4 Protilátka anti-s

Klinicky se jedná o imunní protilátku. Vzhledem k tomu, že antigen s se v populaci nachází ve velkém množství, je výskyt protilátky anti-s velmi vzácný. Může způsobovat HTR a HON. Reaguje v NAT a jen zřídka kdy, jde o aglutinující chladovou Ab.

4.5 Duffy systém

Protilátky namířené proti Duffy antigenům patří zpravidla do třídy IgG. Detekují se pomocí NAT. Duffy protilátky nelze prokázat erytrocyty ošetřenými enzymem, protože působením enzymu dojde k odstranění většiny důležitých Duffy antigenů z erytrocytů.

4.5.1 Protilátka anti-Fy^a

Patří mezi častou imunní protilátku, je příčinou HTR i HON. Je třídy IgG.

4.5.2 Protilátka anti-Fy^b

Klinicky jde o méně častější imunní protilátku. Bývá příčinou HTR a mírného HON. Je třídy IgG a je detekovatelná pomocí NAT.

4.6 Kidd systém

Protilátky namířené proti antigenům Kidd obvykle patří do třídy IgG, ale někdy mohou patřit do třídy IgM. Prakticky vždy vážou komplement. Koncentrace Kidd protilátek se může rychle snížit pod úroveň jejich detekce a nemusí být tak zjištěny rutinním screeningem. Pacient tak může být ohrožen opožděným typem hemolytické potransfuzní reakce. Nejlepšími metodami k jejich detekci jsou: PEG-NAT, LISS-NAT a enzym-NAT.

4.6.1 Protilátka anti-Jk^a

Klinicky nebezpečná imunní Ab, bývá příčinou HTR i HON. Ab reaguje v NAT s polyspecifickým AGH sérem.

4.6.2 Protilátka anti-Jk^b

Je příčinou okamžité HTR a na vzniku HON se podílí vzácně. Laboratorně se jedná o Ab třídy IgG, která může vázat komplement a optimálně reaguje v NAT s polyspecifickým AGH sérem.

4.7 Lewis systém

Lewis protilátky jsou přirozeně se vyskytující a mohou vázat komplement. Obvykle patří do třídy IgM. Velmi málo nebo vůbec nereagují při 37°C, takže prakticky nejsou klinicky důležité. Pouze ve velmi vzácných případech způsobí Lewis protilátky hemolytickou potransfuzní reakci.

4.7.1 Protilátka anti-Le^a

Patří mezi častou přirozeně se vyskytující Ab v séru jedinců Le(a-b-).⁶ Většinou bez klinického projevu. Vzácně bývá během reakce při 37°C příčinou HTR. U novorozenců není Ab Le^a vyvinuta, proto nebývá příčinou HON. Laboratorně se určuje v solném a ET, váže komplement.

4.7.2 Protilátka anti-Le^b

Jde o přirozeně se vyskytující Ab, která nebývá příčinou HTR ani HON. Novorozenci nemají vyvinut Le^b antigen. Patří mezi IgM protilátku a reaguje v solném a ET.

4.8 P systém

Protilátka anti-P1 se může nacházet v séru osob, u kterých chybí P1 antigen. Je to IgM chladová Ab a velmi zřídka je aktivní při 37°C. Není příčinou HTR ani HON. Anti-P1 Ab může způsobit problémy při určování krevní skupiny ABO v případech, kdy diagnostické erythrocyty A nebo B obsahují také Ag P1. Laboratorně se určuje solným testem při teplotě 22°C. Aglutinační reakce může být zesílena pomocí enzymů. Testy kompatibility je třeba provádět při 37°C.

5 METODY POUŽÍVANÉ K IMUNOHEMATOLOGICKÉMU TESTOVÁNÍ

5.1 Detekce protilátek v imunohematologii

Nejvhodnější a obecně nejpoužívanější metodou pro detekci protilátek v imunohematologii je aglutinace erytrocytů. Při tomto postupu jsou erytrocyty, které jsou senzibilizovány navázanými protilátkami, aglutinovány, což lze hodnotit makroskopicky. Pokud jsou na erytrocytech navázány protilátky třídy IgM, aglutinace nastává přímo (přímá aglutinace). K detekci IgG je nutné použít nepřímou metodu. Molekula IgG totiž není vzhledem ke své menší velikosti schopná překonat přirozenou vzdálenost mezi erytrocyty (asi 16 nm), která je dána stejným nábojem povrchu erytrocytů a tedy vzájemnou odpudivostí. Je tedy nutné buď snížit zeta potenciál, aby došlo ke snížení vzdálenosti mezi erytrocyty a Fab fragmenty imunoglobulinu G byly schopny vzdálenost přemostit nebo pomocí protilátek proti lidskému globulinu (AGH) vytvořit na dvou IgG molekulách můstek a vzdálenost přemostit. Je také možné oba tyto postupy kombinovat. Pro snížení iontové síly v médiu se užívá roztok o nízké iontové síle (LISS) a pro přemostění IgG molekul se používá komerční králičí antiglobulin. V praxi se užívají dva druhy antiglobulinového testu, *přímý*, pro detekci protilátky senzibilizované na erytrocytu a *nepřímý*, pro detekci volných protilátek v séru/plazmě *in vitro*.

5.1.1 Přímý antiglobulinový test

Přímý antiglobulinový test (PAT) je určen k detekci senzibilizace erytrocytů pacienta *in vivo*. Je to jedna z nejdůležitějších vyšetřovacích technik v imunohematologii. Při této metodě se k vyšetřovaným erytrocytům pacienta přidává pouze AGH, které je v případě senzibilizace schopno aglutinovat vyšetřované erytrocyty. Pozitivita PAT znamená buď přítomnost autoprotilátek na erytrocytech, nebo přítomnost protilátek pocházejících od matky proti erytrocytům jejího novorozeného dítěte, a nebo aloprotilátek vytvořených po předchozí transfuzi erytrocytů.

5.1.2 Nepřímý antiglobulinový test

Nepřímý antiglobulinový test (NAT) je určen k detekci protilátek v séru/plazmě pacienta *in vitro*. NAT se používá k detekci přítomnosti protilátek při screeningu protilátek, identifikaci protilátek a testu kompatibility. Při této metodě se inkubuje vyšetřované sérum/plazma s testovacími erytrocyty v roztoku s LISS a až poté se přidává AGH. Pozitivita NAT znamená, že v séru/plazmě pacienta jsou přítomny protilátky proti antigenům na diagnostických erytrocytech (screening a identifikace) nebo na erytrocytech dárce (test kompatibility).

5.1.3 Přímá aglutinace

Přímá aglutinace je metoda určená k průkazu IgM protilátek s optimem 4-25°C. Protilátka v séru/plazmě pacienta reaguje přímo s diagnostickými či vlastními erytrocyty. Přímé aglutinace se využívá při průkazu antigenů (např. v ABO systému), kdy známá protilátka IgM (diagnostické sérum) reaguje s antigenem na vyšetřovaných erytrocytech, proti kterému je namířena.

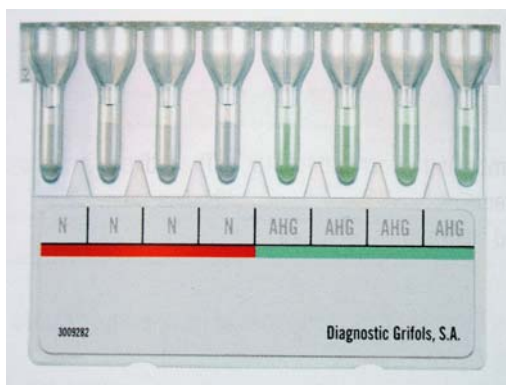
5.1.4 Gelová filtrace

Gelová filtrace umožňuje rozdělení protilátek IgG a IgM a jejich následnou detekci některým vhodným testem (NAT). Principem je oddělování látek s velmi rozdílnými molekulovými hmotnostmi. Molekulová hmotnost IgG (130 000) je téměř sedmkrát menší než IgM (900 000), proto lze tuto technologii na jejich rozdělení aplikovat.

5.2 Imunohematologické laboratorní techniky

5.2.1 Sloupcová aglutinace

Koncem 80.let byla vyvinuta technologie sloupcové (gelové) aglutinace, založená na nepřímém antiglobulinovém testu. Při této metodě je aglutinace senzibilizovaných erytrocytů suspendovaných v LISS docílena v gelovém sloupci pomocí AGH séra. Erytrocyty a sérum se inkubují na povrchu gelu. Po inkubaci se sloupec centrifuguje, což způsobí putování erytrocytů gelem. Po centrifugaci zůstanou aglutináty v gelu, který má funkci síta. Nesenzibilizované erytrocyty, které nereagují s AGH, prostupují gelem na dno sloupce. Fyzikální separace aglutinátů je založena na jejich velikosti a filtraci přes gel. Pomocí centrifugace jsou erytrocyty odděleny od séra a tímto i od nenavázaných imunoglobulinů, které zůstávají v horní, inkubační části gelového sloupce. Nejznámější výrobci sloupcově aglutinačních systémů jsou DiaMed (ID-systém), Grifols (DG Gel), BioRad (ScanGel) a Ortho (BioVue). Každý z těchto systémů využívá unikátních LISS roztoků, karet i centrifug.



Obr.č. 7 Sloupcově aglutinační systém DG Gel

Zdroj: RNDr.M.Körnerová, Grifols Česká republika

5.2.2 Gelová afinitní metoda

Od poloviny 90.let je k dispozici další technologie druhé generace, tzv.pevná fáze, která je označována jako sloupcová afinitní metoda. Test není založen na aglutinaci senzibilizovaných erytrocytů, ale na přímé vazbě na gelovou matrix uvnitř sloupce. Imunoafinitní gelový sloupec obsahuje aktivní fázi v médiu s vysokou hustotou. Senzibilizované erytrocyty jsou fixovány přímo na aktivní fázi ve sloupci. Tato imunoreaktivní fáze obsahuje protein G, protilátku anti-IgM a anti-C3d komplementovou složku fixovanou na gelovou matrix. Protein G je bílkovina z buněčné stěny Streptokoka, která se váže k Fc částem lidského IgG. Senzibilizované erytrocyty zůstanou ve vrchní části sloupce, zatímco všechny nesenzibilizované budou migrovat ke dnu sloupce. Výrobce tohoto systému je Sanquin (CellBind).



Obr.č. 8 Sloupcová afinitní metoda CellBind

Zdroj: <http://www.sanquin.nl/>

5.2.3 Metoda pevné fáze na mikrotitračních destičkách

V 90. letech byly vyvinuty další metody pro imunohepatologické testování, které využívají techniku tzv. pevné fáze na mikrotitračních destičkách. U této technologie je jedna z reagensů předem fixována na mikrotitrační destičce. Pro screening a identifikaci protilátek jsou používány systémy Capture R (Immucor) a Solid Screen (Biotest). Capture R je metoda pevné fáze, kde jsou diagnostické erythrocyty předem fixovány na dně jamek mikrotitrační destičky. Následně jsou inkubovány s testovaným sérem. Po promytí se přidají erythrocyty senzibilizované IgG protilátkou. Následuje centrifugace a odečtení typu reakce. V případě pozitivního výsledku, kdy jsou IgG protilátky z vyšetřovaného séra navázány

na spodní vrstvu diagnostických erythrocytů, se indikátorové erythrocyty v tenké vrstvě navážou na tyto IgG protilátky nad senzibilizovanými erythrocyty na celém povrchu dna jamky. Při negativní reakci, pokud nejsou na diagnostické erythrocyty navázané žádné protilátky, se indikátorové krvinky soustředí do středu dna jamky.



Obr.č. 9 Capture Solid Phase Immucor

Zdroj: http://www.immucor.com/site/ps_capture.jsp

5.2.4 Zkumavková metoda

Je nejstarší používanou technikou v laboratořích. V současné době je ústup od skleněných zkumavek ve prospěch plastových materiálů a to převážně z ekonomických důvodů (mytí skla). I přesto, že při současném trendu převážná většina laboratoří používá systémy sloupcové aglutinace či jiné systémy, role zkumavek je stále nezastupitelná. Většina erytrocytárních antigenů je stále vyšetřována zkumavkovou metodou a svou roli mají zkumavky vzácně i při předtransfuzním vyšetření pacientů, jejichž sérum/plazma nespecificky pozitivně reaguje v systémech sloupcové aglutinace.



Obr.č. 10 Vyšetření krevní skupiny AB0 zkumavkovou metodou

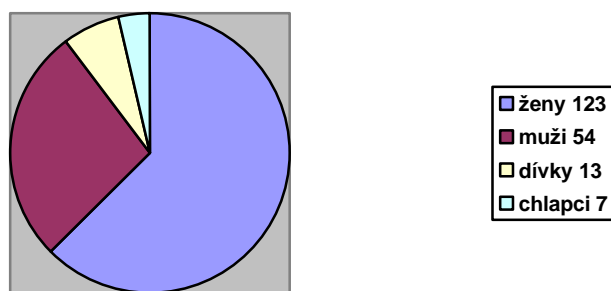
Zdroj: http://www.vetmed.wsu.edu/Lab_Tests/transfusion_medicine.htm

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 PŘEHLED VYŠETŘENÍ PACIENTŮ S POZITIVNÍM SCREENINGEM PROTILÁTEK A JEJICH IDENTIFIKACÍ V OBDOBÍ ROKU 2007

V roce 2007 bylo na Oddělení krevní banky FN v Motole provedeno v rámci předtransfuzního vyšetření 9 037 krevních skupin, 16 558 screeningů nepravidelných protilátek a 32 636 testů kompatibility. Z 16 558 vyšetřených screeningů nepravidelných protilátek byla zjištěna pozitivita u 620 vyšetření (tj. ve 3,75 %). Tato pozitivita se týkala pouze vyšetření provedeného před podáním erytrocytárního TP, mimo prenatální vyšetření.

Specifické aloprotilátky byly identifikovány u 197 pacientů.



Graf č.1 Rozložení specifických aloprotilátek v závislosti na pohlaví a věku pacienta

6.1 Aloprotilátky v Rh systému

PROTILÁTKA	DOSPĚLÍ		DĚTI	
	ženy	muži	dívky	chlapci
Anti-D	22	2	0	2
Anti-E	17	13	5	2
Anti-C	2	3	0	0
Anti-c	6	1	1	0
Anti-C ^w	7	4	1	0
Celkem	54	23	7	4
Celkem	88			

6.2 Aloprotilátky v jiných systémech

PROTILÁTKA	DOSPĚLÍ		DĚTI	
	ženy	muži	dívky	chlapci
Anti-Kell	15	9	0	0
Anti-Fy ^a	5	2	0	0
Anti-Jk ^a	6	1	0	0
Anti-S	3	0	0	0
Anti-M	4	1	3	2
Anti-N	0	1	0	0
Anti-Le ^a	7	3	1	0
Anti-Le ^b	2	1	0	0
Celkem	42	18	4	2
Celkem	66			

6.3 Směsi aloprotilátek v Rh systému

PROTILÁTKA	DOSPĚLÍ		DĚTI	
	ženy	muži	dívky	chlapci
Anti-D + C	15	2	0	1
Anti-D + E	5	1	0	0
Anti-E + c	1	4	0	0
Anti-C + e	2	0	0	0
Anti-C + E	1	0	0	0
Anti-E + C ^w	1	0	0	0
Anti-D+C+E	0	0	1	0
Anti-E+C+C ^w	0	0	1	0
Celkem	25	7	2	1
Celkem	35			

6.4 Směsi aloprotilátek v Rh systému a jiných systémech

PROTILÁTKA	DOSPĚLÍ		DĚTI	
	ženy	muži	dívky	chlapci
Anti-D + Kell	1	0	0	0
Anti-D+E+Kell	1	0	0	0
Anti-c+E+Kell	0	1	0	0
Anti-C+E+Kell	0	1	0	0
Anti-E + Jk ^a	0	1	0	0
Anti-D+C+S	0	1	0	0
Anti-E + Le ^b	0	1	0	0
Celkem	2	5	0	0
Celkem	7			

6.5 Směsi aloprotilátek v jiných systémech

PROTILÁTKA	DOSPĚLÍ		DĚTI	
	ženy	muži	dívky	chlapci
Anti-Le ^a + Le ^b	0	1	0	0
Celkem	0	1	0	0
Celkem	1			

7 ZAJÍMAVÉ IMUNOHEMATOLOGICKÉ KAZUISTIKY V OBDOBÍ ROKU 2007

7.1 Jednotlivé případy

KAZUISTIKA 1

Pacient:	P.J., žena, 84 let
Oddělení:	chirurgie
Diagnóza:	Ca tlustého střeva
Imunohematologická anamnéza:	porody 2, aplikace EBR a MP ano
Krevní skupina:	0 RhD pozitivní
Fenotyp:	CcD.ee Cw negat. Kk
Výsledek screeningu protilátek:	pozitivní

Dg.erythrocyty	NAT	ET (bromelin)
I.	neg.	neg.
II.	3+	4+
III.	1+	neg.

Výsledek vyšetření PAT:	negativní
Výsledek vyšetření autoprotilátek:	negativní
Prokázaná aloprotilátka:	anti-E
Použitá metodika:	sloupcová aglutinace, DG Gel
Doporučení pro transfuze:	erytrocytární TP E neg., kompatibilní v NAT

KAZUISTIKA 2

Pacient: S.V., muž, 60 let
Oddělení: ortopedie
Diagnóza: náhrada kyčelního kloubu
Imunohematologická anamnéza: v roce 2003 aplikace 2 TU EBR, 3 TU MP
Krevní skupina: A RhD pozitivní
Fenotyp: CCD.ee Cw negat. kk
Výsledek screeningu protilátek: pozitivní

Dg.erythrocyty	NAT	ET (bromelin)
I.	neg.	neg.
II.	2+	2+
III.	neg.	neg.

Výsledek vyšetření PAT: negativní
Výsledek vyšetření autoprottilátek: negativní
Prokázaná aloprottilátka: anti-E
Použitá metodika: sloupcová aglutinace, DG Gel
Doporučení pro transfuze: erytrocytární TP E neg., c neg., K neg.

KAZUISTIKA 3

Pacient: K.J., žena, 66 let
Oddělení: onkologie
Diagnóza: Ca plic
Imunohematologická anamnéza: neuvedena
Krevní skupina: B RhD pozitivní
Fenotyp: ccD.Ee Cw neg. kk
Výsledek screeningu protilátek: pozitivní

Dg.erythrocyty	NAT	ET (bromelin)
I.	4+	4+
II.	neg.	(1+)
III.	neg.	1+

Výsledek vyšetření PAT: negativní
Výsledek vyšetření autoprottilátek: negativní
Prokázaná aloprottilátka: anti-Cw
Použitá metodika: sloupcová aglutinace, DG Gel
Doporučení pro transfuze: erytrocytární TP C neg., Cw neg., K neg.

KAZUISTIKA 4

Pacient: Š.J., muž, 57 let
Oddělení: spondylochirurgie
Diagnóza: patologická zlomenina
Imunohematologická anamnéza: v roce 2006 aplikace 8 TU EBR, 2 TU MP
Krevní skupina: A Rh pozitivní
Fenotyp: CcD. ee Cw neg. kk
Výsledek screeningu protilátek: pozitivní

Dg.erythrocyty	NAT	ET (bromelin)
I.	neg.	neg.
II.	neg.	neg.
III.	2+	2+

Výsledek vyšetření PAT: negativní
Výsledek vyšetření autoprottilátek: negativní
Prokázaná aloprottilátka: anti-Kell
Použitá metodika: sloupcová aglutinace, DG Gel
Doporučení pro transfuze: erytrocytární TP Kell neg., E neg.

KAZUISTIKA 5

Pacient: V.J., žena, 75 let
Oddělení: ortopedie
Diagnóza: náhrada kolenního kloubu
Imunohematologická anamnéza: porody ano, transfuze v roce 2005
Krevní skupina: AB RhD pozitivní
Fenotyp: CcD.ee Cw neg. Kk Fy(a-b+)
Výsledek screeningu protilátek: pozitivní

Dg.erythrocyty	NAT	ET (bromelin)
I.	1+	neg.
II.	neg.	neg.
III.	(1+)	neg.

Výsledek vyšetření PAT: negativní
Výsledek vyšetření autoprotilátek: negativní
Prokázaná aloprotilátka: anti-Fy^a
Použitá metodika: sloupcová aglutinace, DG Gel
Doporučení pro transfuze: erytrocytární TP Fy^a neg., E neg.

KAZUISTIKA 6

Pacient: H.L., muž, 75 let
Oddělení: onkologie
Diagnóza: Ca uzlin
Imunohematologická anamnéza: neuvedena
Krevní skupina: A RhD pozitivní
Fenotyp: CcD.ee Cw neg., kk NN
Výsledek screeningu protilátek: pozitivní

Dg.erythrocyty	NAT	ET (bromelin)
I.	2+	neg.
II.	2+	neg.
III.	neg.	neg.

Výsledek vyšetření PAT: negativní
Výsledek vyšetření autoprottilátek: negativní
Prokázaná aloprottilátka: anti-M, reagující v 37°C
Použitá metodika: sloupcová aglutinace, DG Gel
Doporučení pro transfuze: erytrocytární TP M neg., E neg., K neg.

KAZUISTIKA 7

Pacient: K.M., žena, 79 let
Oddělení: interna
Diagnóza: dyspepsie
Imunohematologická anamnéza: porody ano, transfuze neuvedeny
Krevní skupina: 0 RhD pozitivní
Fenotyp: CcD.Ee kk Cw neg. NNSs
Výsledek screeningu protilátek: pozitivní

Dg.erythrocyty	NAT	ET (bromelin)
I.	4+	neg.
II.	neg.	neg.
III.	4+	neg.

Výsledek vyšetření PAT: negativní
Výsledek vyšetření autoprottilátek: negativní
Prokázaná aloprotilátka: anti-M, reagující v 37°C
Použitá metodika: sloupcová aglutinace, DG Gel
Doporučení pro transfuze: erytrocytární TP M neg., K neg.

KAZUISTIKA 8

Pacient: H.M., žena 76 let
Oddělení: hematologie
Diagnóza: myelodysplastický syndrom
Imunohematologická anamnéza: porody ano, 3 měsíce před vyšetřením 2 TU EBR
Krevní skupina: A RhD pozitivní
Fenotyp: CCD.ee Cw neg. kk
Výsledek screeningu protilátek: pozitivní

Dg.erythrocyty	NAT	ET (bromelin)
I.	neg.	neg.
II.	3+	3+
III.	neg.	2+

Výsledek vyšetření PAT: negativní
Výsledek vyšetření autoprottilátek: negativní
Prokázaná aloprotilátka: anti-c + E
Použitá metodika: sloupcová aglutinace, DG Gel
Doporučení pro transfuze: erytrocytární TP c neg., E neg., Cw neg., K neg.

KAZUISTIKA 9

Pacient: H.J., muž, 29 let
Oddělení: ARO
Diagnóza: polytrauma
Imunohematologická anamnéza: aplikováno 21 TU EBR, 30 TU MP, 2 TU TAD
Krevní skupina: A RhD pozitivní
Fenotyp: CcD.ee Cw neg. kk Jk(a+b-) Le(a-b-)
Výsledek screeningu protilátek: pozitivní

Dg.erythrocyty	NAT	ET (bromelin)
I.	2+	2+
II.	4+	4+
III.	2+	2+

Výsledek vyšetření PAT: negativní
Výsledek vyšetření autoprottilátek: negativní
Prokázaná aloprotilátka: anti-E + Le^b (reagující v 37°C)
Použitá metodika: sloupcová aglutinace, DG Gel
Doporučení pro transfuze: erytrocytární TP E neg., K neg., Le^b neg.

KAZUISTIKA 10

Pacient: P.H., žena, 76 let

Oddělení: ortopedie

Diagnóza: náhrada kyčelního kloubu

Imunohematologická anamnéza: 1 porod, v roce 2001 2 TU EBR, v anamnéze nefrektomie v jiném zdr. zařízení (transfuze?). Nyní 7 dní po poslední transfuzi (9 TU EBR) po operaci ikterus, anemizace.

Krevní skupina: 0 RhD pozitivní

Fenotyp: CcD.ee Cw neg. kk Jk(a-b+)

Výsledek screeningu protilátek: pozitivní

Dg.erythrocyty	NAT	ET (bromelin)
I.	neg.	neg.
II.	2+	2+
III.	3+	3+

Výsledek vyšetření PAT: pozitivní 4+, senzibilizace IgG + C3d

Výsledek vyšetření autoprotilátek: pozitivní

Prokázaná aloprotilátka: anti-Jk^a

Použitá metodika: sloupcová aglutinace, DG Gel

Doporučení pro transfuze: erytrocytární TP Jk^a neg., E neg., K neg., **uzavřeno jako pozdní hemolytická potransfuzní reakce**

ZÁVĚR A DISKUZE

Erytrocytární antigeny a antigeny složek krevní plasmy mohou u příjemce transfuzního přípravku vyvolat imunologické komplikace v závislosti na imunologické odpovědi dané geneticky, dále v závislosti na množství a kvalitě transfuzního přípravku.

Moderní transfuziologická praxe umožňuje předcházet imunologickým komplikacím hemoterapie především dodržováním standardních předpisů týkajících se předtransfuzních vyšetření pacienta i transfuzního přípravku.

Tato práce popisuje problematiku imunologie a imunohematologie s ohledem na její využití v transfuzní medicíně. Popisuje význam krevních skupin a klinický význam protilátek proti erytrocytům s ohledem na bezpečnou transfuzi. Popisuje metodiky používané pro základní předtransfuzní vyšetření (krevní skupina, screening nepravidelných protilátek, testy kompatibility) a metodiky používané pro identifikaci aloprotilátek. Pro pacienty s nálezem aloprotilátek je důležité zajistit bezpečnou kompatibilní transfuzi erytrocytárního transfuzního přípravku (otypovaný TP). Je třeba si uvědomovat i rizika spojená s podáním transfuzních přípravků ve smyslu potransfuzní reakce.

Na oddělení krevní banky FN v Motole bylo v roce 2007 (1.1.-31.12.2007) provedeno v rámci předtransfuzního vyšetření celkem 9 037 krevních skupin, 16 558 screeningů nepravidelných protilátek a 32 636 testů kompatibility.

Z 16 558 vyšetřených screeningů nepravidelných protilátek byla zjištěna pozitivita u 620 vyšetření (tj. 3,75 %). Tato pozitivita se týkala pouze screeningů vyšetřených před podáním erytrocytárního transfuzního přípravku, ne vyšetření provedeného v rámci prenatalního vyšetření.

Specifické aloprotilátky byly identifikovány u 197 pacientů/příjemců, z toho většinu tvořily ženy 123x (62,4%), muži 54x, děti 20x (dívky 17x, chlapci 3x).

Nejvíce aloprotilátek bylo identifikováno v systému Rh celkem u 88 pacientů (54x u žen, 23x u mužů, 11x u dětí). Nejčastější aloprotilátkou v Rh systému byla aloprotilátka anti-E celkem 37x (17x ženy, 13x muži, 7x přenesené u novorozenců), dále anti-D celkem 26x (22x ženy, 2x muži, u novorozence 2x přenesená mateřská), anti-Cw aloprotilátka byla stanovena u 12 pacientů (7x ženy, 4x muži, 1x dívka), anti-c 8x (6x ženy, 1x muž, 1x dívka), anti-C 5x (2x ženy, 3x muži).

Aloprotilátky v jiných systémech krevních skupin byly celkem identifikovány u 66 pacientů (u 42 žen, u 18 mužů a 6 dětí). Nejčastěji zjištěnou aloprotilátkou byla klinicky významná a nebezpečná aloprotilátka anti-Kell celkem 24x (15x ženy, 9x muži), další významné aloprotilátky byly identifikovány v systému Duffy anti-Fy(a) celkem 7x (5x u žen a 2x u mužů), v systému Kidd anti-Jk(a) 7x (6x ženy, 1x muž), v systému MNSs anti-S celkem 3x u žen. Méně klinicky závažné aloprotilátky byly zastiženy celkem 25x (13x ženy, 6x muži, 6x děti). Jednalo se o aloprotilátky anti-M 10x (4x ženy, 1x muž, 5x děti), anti-N (1x muž), anti-Le(a) 11x (ženy 7x, muži 3x, děti 1x), anti-Le(b) 3x (2x ženy, 1x muž). Směsi aloprotilátek v Rh systému byly identifikovány 35x, směsi aloprotilátek v Rh systému kombinované s jinými systémy 7x, směs v jiných systémech zastižena 1x (aloprotilátka anti-Le(a+b+)).

Vybrané kazuistiky uvádí postup používaný při identifikaci specifické aloprotilátky a doporučení bezpečné kompatibilní transfuze erytrocytárního přípravku pro pacienta/příjemce se zjištěnými aloprotilátkami. Kromě imunohematologického vyšetření je důležité i získání tzv. imunohematologické anamnézy (podané transfuze, porody, potraty u žen, dřívější nález specifické aloprotilátky).

Poslední kazuistika upozorňuje na možnost vzniku pozdní hemolytické reakce u pacientky.

Závěrem je třeba zdůraznit, že výběr kompatibilního transfuzního přípravku pro pacienta/příjemce spočívá především v dodržování přísných klinických indikací, na rozsahu a kvalitě předtransfuzního vyšetření. Je bezpodmínečně nutné dodržovat systém SLP při činnostech souvisejících s laboratorním vyšetřováním, dodržovat platné postupy a SOP a kontrolovat kvalitu diagnostik a použitých metodik. Z hlediska prevence imunologických komplikací hemoterapie je nutná i cílená anamnestická informace pacienta a jeho zdravotnická dokumentace. Správná indikace správného transfuzního přípravku

ve správný čas je výsledkem posouzení poměru mezi riziky transfuze, rizikem jejího nepodání a očekávaným přínosem pro pacienta / příjemce.

SEZNAM CITACÍ

1. BRAILEY, LL. History of Medicine : Transfusion Medicine: A History [online]. 2000. University of Carolina : 2000 , Sept 2000 [cit. 2008-03-01]. Dostupný z WWW: <<http://www.med.unc.edu/wrkunits/syllabus/yr4/gen/medhist/publish/>>
2. SAKALOVÁ, A, LIPŠIC, T. *Hematológia a transfuziológia*. 1. autoriz. vyd. Martin : Osveta, 1995. 310 s. ISBN 80-217-0444-6
3. BARTUŇKOVÁ, J, HOŘEJŠÍ, V. *Základy imunologie*. 2. přeprac. vyd. Praha : TRITON, 2002. 253 s. ISBN 80-7254-215-X
4. HILLYER, Ch. D., et al. *Handbook of Transfusion Medicine*. [s.l.] : Academic press, 2001. 369 s. ISBN 0-12-348775-7.
5. PÍSAČKA, M. Současné poznatky o RH systému. *Transfuze a hematologie dnes* . 2000, č. 3, s. 79-87
6. CUPANÍKOVÁ, D. Imunológia erytrocytov. *Bratisl lek listy*. 2000, č. 12, s. 153-160.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. PETRTÝLOVÁ, K. Transfuzní služba : Směrnice 22. *Směrnice FN Motol* [online]. 2005 [cit. 2008-04-01], s. 1-37. Intranet FN Motol.
2. HRUBIŠKO, M. *Hematologie a krevní transfuze II : Krevní transfuze*. [s.l.] : [s.n.], 1981. 210 s.
3. KUBISZ, P. *Hematológia a transfuziológia*. [s.l.] : [s.n.], 2006. 324 s. ISBN 80-247-1779-4.
4. FUČÍKOVÁ, Terezie, et al. *Základy klinické imunologie : imunodeficity - autoimunita - alergie*. Praha : RDI\ PRESS, 1994. 148 s.
5. PECKA, Miroslav, MALÝ, Jaroslav, DEJMKOVÁ, Jana. *Přehled laboratorní hematologie III. : Hemostáza Imunohematologie*. Praha : Galén, 1998. 152 s. ISBN 80-85824-89-2.
6. PÍSAČKA, M. Předtransfuzní vyšetření. *Transfuze Dnes*. 1999, č. 13, s. 27-28.
7. SELTSAM, Axel, WAGNER, Franz, SALAMA, Abdulgabar. Antibodies to high-frequency antigens may decrease the quality of transfusion support: an observational study . *Transfusion [online]*. 2003 s. 1563-1566.
8. SCHONEWILLE, Henk, HAAK, Hans, VAN ZIJL, Annette. RBC antibody persistence. *Transfusion [online]*. 2000 , s. 1127-1131.
9. ENDOH, Teruo, et al. Optimal prewarming conditions for Rh antibody testing . *Transfusion [online]*. 2006, s. 1521-1525.
10. VAUGHAN, JI, et al. Erythropoietic suppression in fetal anemia because of Kell alloimmunization.. *Am J Obstet Gyneco* . 1994 , s. 247-252.
11. VAUGHAN, JI, et al. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia.. *N Engl J Med [online]*. 1998 s. 798-803.
12. ENGELFRIET, C.P., MEULENBROEK, A. J. . *Imunohematologie*. [s.l.] : Sanguin, 2007. 143 s.

13. HOLOMÁŇOVÁ, D. Imunologické komplikácie hemoterapie. *Transfúze a hematologie dnes*. 2005, roč. 11, č. 2, s. 74-77.
14. *GUIDE TO THE PREPARATION, USE AND QUALITY ASSURANCE*.
Strasbourg Cedex : Council of Europe Publishing Editions du Conseil De I
Europe, 2007. 271 s. ISBN 978-92-871-6136-9.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Ab	Antibody, protilátka
Ag	Antigen
AGH	Anti-globulinum humanum, protilátka proti lidské bílkovině
AIHA	Autoimunní hemolytická anemie
APC	Antigen prezentující buňka
Ca	Carcinoma, zhoubný nádor
EBR	Erytrocyty bez buffy-coatu
ET	enzymatický test
Fuc	Fukóza
Gal	Galaktóza
H	Heavy, těžký
HON	Hemolytické onemocnění novorozence
HTR	Hemolytická potransfuzní reakce
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
L	Light, lehký
LISS	Low Ionic Strength Saline, roztok o nízké iontové síle
MP	Mražená plazma
NAGA	N-acetylgalaktozamin
NAT	Nepřímý antiglobulinový test
PAT	Přímý antiglobulinový test
PEG	Polyetylenglykol
TAD	Trombocyty z aferézy deleukotizované
TP	Transfuzní přípravek

III. PŘÍLOHY