

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



Rh systém

Bakalářská práce

Hradec Králové 2011

Autor: Monika Forstová

Vedoucí práce: MUDr. Vít Řeháček

Prohlášení

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

V Havlíčkově Brodě, dne 15. 8. 2011

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala primáři MUDr. Vítu Řeháčkovi a primářce MUDr. Lence Lakomé za cenné připomínky a odborné rady, kterými přispěli k sepsání této práce, dále všem kolegyním z Transfuzního oddělení Havlíčkův Brod a mé rodině za trpělivost a podporu při studiu.



Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
500 05 Hradec Králové, Heyrovského 1203, Česká republika

Zadání bakalářské práce

Katedra: biologických a lékařských věd

Akademický rok: 2010/2011

Jméno, příjmení: Monika Forstová

Studijní program: Zdravotnická bioanalýtika

Obor: Zdravotní laborant

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Vít Řeháček

Název bakalářské práce: Rh systém

Název bakalářské práce v angličtině: Rh system

Zásady pro vypracování:

1. Rešerše odborné literatury
2. Výběr, event. vypracování pracovních postupů
3. Praktické provedení daných úkolů
4. Zhodnocení
5. Diskuze

Seznam odborné literatury:

Transfúzní lékařství a imuno hematologie, Tesařová E., 2007

Základy speciální imuno hematologie I.část, Vacl J., 1973

Imuno hematologie, 1. vydání, Čermáková Z., 2008

Funkční somatologie, Schreiber M. a kol., 1998

Human blood groups, Daniels G., 1995

Datum zadání bakalářské práce: 24. 11. 2008

Termín odevzdání bakalářské práce: 15. 8. 2011

PharmDr. Petr Jílek, CSc.
vedoucí katedry

Doc.PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.
děkan

V Hradci Králové dne 24. 11. 2008

Obsah

Abstrakt	7
Seznam zkratk	8
Seznam tabulek a obrázků	9
1. Úvod	10
1.1 Krev	10
1.2 Krvetvorba	11
2. Skupinový systém Rh	13
2.1 Historie	13
2.2 Antigeny Rh systému	17
2.2.1 Antigeny D a d	17
2.2.2 Antigeny C a c	19
2.2.3 Antigeny E a e	20
2.3 Protilátky skupinového systému Rh	21
3. Prenatální a postnatální imunohematologická vyšetření	23
3.1 Imunohematologická vyšetření v těhotenství	23
3.2 Imunohematologická vyšetření po porodu	24
4. Laboratorní metody sloužící k vyšetření screeningů protilátek	25
5. Hemolytické onemocnění novorozence při Rh inkompatibilitě.	28
6. Praktická část	30
7. Diskuze	34
8. Závěr	36
Použitá literatura	37

Abstrakt

Tato práce shrnuje základní informace o Rh systému, druhým nejdůležitějším systémem krevních skupin. Práce je rozdělena do dvou částí.

Teoretická část je zaměřena na krev – její složení a vznik, dále se věnuje historii, antigenům a protilátkám Rh systému, imunohepatologickému prenatálnímu a postnatálnímu vyšetření, možnostem laboratorního vyšetření nepravidelných antierytrocytárních protilátek a hemolytickému onemocnění novorozence.

Praktická část popisuje postup vyšetření screeningu protilátek na Transfuzním oddělení Havlíčkův Brod a záchyt jednotlivých nepravidelných antierytrocytárních protilátek.

Klíčová slova: Rh systém, protilátky, imunohepatologie, hemolytické onemocnění novorozence

Abstract

This bachelor thesis summarizes the basic information about Rh system, the second most important system of blood groups. This work is split into two parts.

Theoretical part is focused on the blood – its composition and formation. Next, it focuses on history, antigens and antibodies of Rh system, prenatal and postnatal serological examination, laboratory testing of irregular antierythrocytes antibodies and hemolytic disease of a newborn.

Practical part describes procedure examination screening of antibodies on the Transfusion departments in Havlíčkův Brod and detection of irregular antierythrocytes antibodies.

Keywords: Rh system, antibodies, imunohepatology, hemolytic disease of a newborn

Seznam zkratek

ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
dg.	diagnostický
HbF	fetální hemoglobin
HON	hemolytické onemocnění novorozence
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
LFA	antigen s nízkou frekvencí výskytu = Low Frequency Antigen
LISS	roztok o nízké iontové síle = Low Ionic Strength Solution
LW	antigen Landsteiner a Wiener
NAT	nepřímý antiglobulinový test
NIS	nemocniční informační systém
PAT	přímý antiglobulinový test
QT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
Rh	rhesus faktor

Seznam tabulek a obrázků

Tab. 1 Wienerovy faktory a Fishera-Race geny

Tab. 2 Představa Wienera o skupinovém systému Rh v porovnání s představou Fishera a Race

Tab. 3 Antigeny Rh systému

Tab. 4 Přehled celkem vyšetřených a pozitivních screeningů protilátek na Transfuzním oddělení Havlíčkův Brod za období 2000 - 2009

Tab. 5 Celkový přehled identifikovaných nepravidelných protilátek u těhotných na Transfuzním oddělení Havlíčkův Brod za období 2000 – 2009

Obr. 1 Schéma RhD proteinu a RhCcEe proteinu

Obr. 2 RhD pozitivita

Obr. 3 RhD negativita

Obr. 4 Schéma C/c, E/e a C^w antigenů

Obr. 5 Sloupcová aglutinace – síla positivity podle velikosti komplexu antigen-protilátka

Obr. 6 Gelové karty Reverse grouping with antibody screening

Obr. 7 Diagnostické erythrocyty

1. Úvod

1.1 Krev

Krev je hlavní součástí vnitřního prostředí organismu [1]. Je to červená, neprůhledná a viskózní tekutina tvořená suspenzí buněčných elementů, tj. červených krvinek, bílých krvinek a krevních destiček v krevní plazmě, cirkulující v uzavřené cévní soustavě. Tvoří cca 7 – 10 % celkové hmotnosti těla, tj. 4,5 – 5,5 l krve. Krev má funkci transportní, udržení homeostázy, obrana organismu a hemokoagulace [1, 2].

Krevní plazma je nažloutlá, mírně opaleskující tekutina [2]. Objem plazmy u dospělého člověka činí cca 5% tělesné hmotnosti, tj. 2,8 – 3,5 l. Je tvořena z 90 – 92 % vodou, cca 8 – 10 % jsou anorganické a organické látky. Anorganické látky obsažené v plazmě se podílejí významně na osmotickém tlaku, na udržení objemu plazmy a regulaci pH plazmy [2]. Hlavním anorganickým kationtem plazmy je sodík, dále draslík, vápník, hořčík, anionty chloru a bikarbonátu [1]. Z organických látek jsou na prvním místě zastoupeny v plazmě bílkoviny, které rozdělujeme na albuminy, globuliny a fibrinogen, dále cukry, tuky (neesterifikované mastné kyseliny, cholesterol, lipoproteiny), dusíkaté látky nebílkovinné povahy (aminokyseliny, močovina, kyselina močová, kreatinin, amoniak). Ale i hormony, enzymy, vitamíny, popř. další látky, včetně léků.

Krevní elementy neboli krvinky dělíme na erytrocyty, leukocyty a trombocyty. Erytrocyty jsou bezjaderné buňky, které během svého vývoje ztratily jádro, bikonkávního tvaru, připomínající na průřezu cukrářský piškot. Normocyt má průměr 6,7 – 7,7 μm . Hlavní funkcí červených krvinek je transport dýchacích plynů – kyslíku a oxidu uhličitého. Navíc se červené krvinky podílejí na udržování pH krve [2]. Červená krvinka obsahuje červené krevní barvivo – hemoglobin, který je schopen reverzibilně vázat kyslík. Červená krvinka přežívá v obvodové krvi 90 až 120 dní. Staré krvinky jsou vychytávány ve slezině, játrech či kostní dřeni, kde jsou napadány fagocytujícími buňkami (makrofágy) a likvidovány. Červené krvinky mají na svých membránách znaky antigenní povahy [1].

Leukocyty jsou jaderné buňky, podílející se na obranném systému organismu proti choroboplodným zárodkům = imunitní reakci organismu. Jde o morfologicky a funkčně heterogenní skupinu. Podle přítomnosti či nepřítomnosti granul rozdělujeme leukocyty na granulocyty a agranulocyty. Granulocyty dělíme podle barvitelnosti a velikosti granul na neutrofilní, eozinofilní a bazofilní. Agranulocyty nemají granula a dělí se na monocyty a lymfocyty [1]. Počet bílých krvinek je shodný u mužů i žen, mění se po jídle, s denní dobou, námahou, atd.

Trombocyty jsou nejmenší formované elementy krve. Nemají jádro, mají tvar hladkých okrouhlých disků o průměru 2 – 4 μm [1]. Vznikají odštěpováním z megakaryocytů [2]. Po vyplavení z kostní dřeně přežívají 9 – 12 dní. Jejich nejdůležitější funkcí je úloha v ochraně organismu před ztrátami krve – srážení krve (hemokoagulace).

1.2 Krvetvorba

Krvetvorba je nesmírně komplikovaný, komplexně řízený a dodnes ne dobře prozkoumaný proces (Ketley a Newland, 1997) [4].

Krvetvorba se začíná tvořit již ve 3. týdnu nitroděložního vývoje. Dělí se na 2 fáze: prenatální (embryonální a fetální) a postnatální. Krvetvorba v období zárodečného života se dělí na tři období – 1) mezoblastové, 2) hepatolienální a 3) medulární.

Ad. 1) Mezi 14. a 19. dnem gravidity v krevních ostrůvcích žloutkového vaku se začínají tvořit primitivní červené krvinky. Ty jsou větší než u dospělého člověka, mají jádro a obsahují HbF. Toto období trvá od 3. do 10. týdne nitroděložního života. Hemopoéza ve žloutkovém vaku je prakticky jen erytroidní povahy [4]. V 6. týdnu gravidity vzniká brzlík, který se osidluje kmenovými buňkami krvetvorby. Z nich se postupně vyvíjejí mateřské buňky lymfocytů.

Ad. 2) Mezi 5. a 6. týdnem gravidity začíná krvetvorba v játrech. Játra jsou v tomto období hlavním místem hemopoézy až do poloviny zárodečného života. Kromě normoblastů, které vyžívají do erytrocytů, se tvoří i mateřské buňky bílých krvinek a krevních destiček. Od 12. týdne, kdy se vytvářejí základy sleziny, podílí se

na krvetvorbě i slezina, i když jen v menší míře než játra [4]. Lymfocyty se tvoří v thymu už v 8. týdnu. Do krevního oběhu se dostávají až ve 3. měsíci, kdy se postupně tvoří sekundární lymfatické orgány (slezina, lymfatické uzliny). Toto období trvá až do porodu.

Ad. 3) Od 20. týdne gravidity se krvinky začínají tvořit v kostní dřeni. Tvoří se zde všechny druhy krvinek přítomných v krvi. S vzestupem dřeňové krvetvorby postupně zaniká krvetvorba mimodřeňová (extramedulární).

Po narození probíhá krvetvorba jen v kostní dřeni. Ta je zdrojem všech druhů krvinek v cirkulující krvi. Extramedulární krvetvorba (játra, slezina) zaniká ve 2 – 3 týdnu od narození. Část lymfocytů se i po narození tvoří nejen v kostní dřeni, ale i lymfatických uzlinách, v lymfatické tkáni sleziny a thymu a v lymfatických tkáních na různých místech těla (např. mandle, nosohltan).

Krvetvorba je ovlivňována řadou faktorů, např. vitamínem B₆, B₁₂, C, kyselinou listovou, železem, erythropoetinem, granulopoetinem, trombocytopoetinem, hormony, bílkovinami, aminokyselinami atd.

2. Skupinový systém Rh

Rh skupinový systém je nejpolymorfnější a nejvíce imunogenní systém lidských krevních skupin [8], skládající se ze 45 antigenů očíslovaných od RH1 až RH51 se šesti staršími antigeny [11]. Po AB0 systému je druhým nejdůležitějším systémem krevních skupin.

2.1 Historie

K jeho objevení přispěli Levine a Stetson, kteří v roce 1939 v New Yorku publikovali objev nepravidelné imunitní protilátky. Popsali hemolytickou potransfuzní reakci u ženy, která předčasně porodila mrtvé dítě. Po porodu rodička ztratila mnoho krve, proto dostala krev od svého manžela, který měl stejnou krevní skupinu. Po transfuzi se ženě přitížilo a na kůži a sliznicích se jí objevily krevní výrony. Při dalším vyšetřování krve rodičky zjistili, že její sérum shlukovalo nejen erythrocyty jejího manžela, ale i 80% AB0 kompatibilních dárců. Hemolytická reakce byla vysvětlena imunizací rodičky krvinkami plodu a vytvořením protilátky proti krvinkám plodu i proti krvinkám manžela. Levine a Stetson tuto protilátku nepojmenovali, avšak ukázali, že nový antigen byl nezávislý na známých krevních skupinách, AB0, MN a P.

V roce 1940 Landsteiner a Wiener po imunizaci králíků a morčat krvinkami opice Maccaca Rhesus připravili sérum, které obsahovalo protilátku (nazvali ji anti – Rh), shlukující nejen erythrocyty opice, ale i krvinky 85% bělochů z New Yorku. Společnou vlastnost nazvali faktor Rhesus nebo také zkráceně Rh faktor¹. Lidé dávající s imunitním sérem pozitivní reakci byli označeni jako Rh pozitivní, ostatní jako Rh negativní. O rok později se ukázalo, že Levinova a Stetsonova protilátka se velmi podobá heteroimunní protilátce Landsteinera a Wienera. V průběhu dalších let se ukázalo, že lidské protilátky, vznikající imunizací po transfuzi nebo inkompatibilní graviditě, a živočišné protilátky, vzniklé heteroimunizací, nereagují se stejným antigenem. Proto se na návrh Levina antigen definovaný živočišným anti-Rh přejmenoval na LW a heteroprotilátka na anti-LW na počest objevitelů Landsteinera a

¹ Dnes Rh systém

Wienera. Lidské protilátky byly přejmenovány na anti-D. Označení Rh (né rhesus) se ponechává nadále, jelikož se tak objevilo v tisících publikacích.

Po objasnění patogeneze hemolytické choroby novorozenců a hemolytické potransfuzní reakce začal být Rh systém složitější, jelikož došlo k objevům dalších protilátek. Na základě nově objevených protilátek byly zformovány dvě základní teorie nového skupinového systému – teorie Wienerova a Fishera-Race (tab. 1).

Do roku 1943 Race a spol. měli k dispozici čtyři antiséra specifity anti-C, -c, -E a -e. Fisher si při studiu výsledků povšiml, že dvě ze čtyř antisér dávají protikladné výsledky. Usoudil, že antigeny a jejich geny jsou alelické a navrhl jejich označení C a c. Další dvě antiséra nedávala protikladné reakce, a proto tyto antigeny nazval D a E. Fisher a Race předpokládali, že existují tři velmi blízko sebe ležící genetické lokusy produkující D/d, C/c a E/e, které mohou být složeny do osmi různých genových komplexů či haplotypů. Následná identifikace protilátky anti-e podpořila Fisherovu teorii, avšak protilátka anti-d nebyla nikdy nalezena. Teorie Fishera-Race je nejjasnější pro interpretaci většiny sérologických reakcí.

Wiener pracoval s antiséry stejné specifity, ale přišel s jinou teorií zahrnující geneticky Rh systém do série mnohočetných alel na jednom genetickém lokusu. Podle něj každý gen kóduje antigen složený z více faktorů, např. antigen R¹ vyjadřuje nejméně tři faktory – Rh₀, rh' a hr" (D, C a e v terminologii Fishera-Race).

V roce 1962 Rosenfield a spol. zavedli ještě třetí teorii. Ta je založena na číselném uspořádání antisér v Rh-Hr systému a k tomu antigenních determinant. Ve své první práci očíslovali 25 antigenů, dalších osm bylo přidáno o 10 let později. Současných 45 antigenů je uvedeno v tab. 3. Toto číselné značení, nepatrně upravené, je dnes základem pro terminologii Mezinárodní společnosti krevní transfuze (International Society of Blood Transfusion – ISBT) pro všechny krevní skupiny [11].

V roce 1986 Tippett navrhl novou teorii zahrnující pouze dva genetické lokusy – RHD gen kódující antigen D a RHCE gen kódující antigeny C/c a E/e. Krátce poté Tippettova teorie byla potvrzena molekulárně genetickými studii a odpovídá nejblíže realitě.

Tab. 1 Wienerovy faktory a Fishera-Race geny [5]

Faktor	Rh ₀	rh [']	rh ^{''}	(hr)	hr [']	hr ^{''}
Gen	D	C	E	(d)	c	e

Tab. 2 Představa Wienera o skupinovém systému Rh v porovnání s představou Fishera a Race [5]

Gen	Aglutinogen (podle Wienera)	Faktory přítomné na krvinkách	Komplexy genů a antigenů (Fisher a Race)
r	rh	hr ['] a hr ^{''}	Dce
r [']	rh [']	rh ['] a hr ^{''}	dCe
r ^{''}	rh ^{''}	rh ^{''} a hr [']	dcE
r ^y	rh ^y	rh ['] a rh ^{''}	dCE
R ⁰	Rh ₀	Rh ₀ , hr ['] a hr ^{''}	Dce
R ¹	Rh ₁	Rh ₀ , rh ['] a hr ^{''}	DCe
R ²	Rh ₂	Rh ₀ , rh ^{''} a hr [']	DcE
R ^z	Rh _z	Rh ₀ , rh ['] a rh ^{''}	DCE

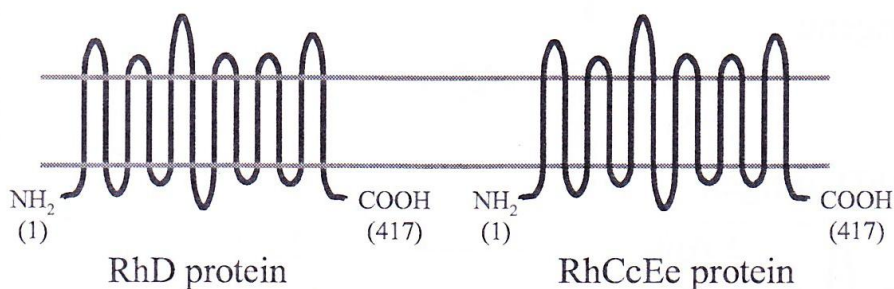
Tab. 3 Antigeny Rh systému [11]

No. (Rosenfield)	CDE (Fisher a Race)	Rh - Hr (Wiener)
Rh ₁	D	Rh ₀
Rh ₂	C	rh'
Rh ₃	E	rh''
Rh ₄	c	hr'
Rh ₅	e	hr''
Rh ₆	ce	hr
Rh ₇	Ce	rh _i
Rh ₈	C ^w	rh ₁ ^w
Rh ₉	C ^x	rh ₁ ^x
Rh ₁₀	-	hr ^v
Rh ₁₁	E ^w	rh ₂ ^w
Rh ₁₂	G	rh ^G
Rh ₁₇	-	Hr ₀
Rh ₁₈	-	Hr
Rh ₁₉	-	hr ^s
Rh ₂₀	e ^s	-
Rh ₂₁	C ^G	-
Rh ₂₂	CE	-
Rh ₂₃	D ^w	-
Rh ₂₆	c-like	-
Rh ₂₇	cE	-
Rh ₂₈	-	hr ^H
Rh ₂₉	-	-
Rh ₃₀	-	-
Rh ₃₁	-	hr ^B
Rh ₃₂	-	R ^N
Rh ₃₃	-	-
Rh ₃₄	-	Hr ^B
Rh ₃₅	-	-
Rh ₃₆	-	-
Rh ₃₇	-	-
Rh ₃₉	-	-
Rh ₄₀	-	-
Rh ₄₁	-	-
Rh ₄₂	Cce ^s	-
Rh ₄₃	-	-
Rh ₄₄	-	-
Rh ₄₅	-	-
Rh ₄₆	-	-
Rh ₄₇	-	-
Rh ₄₈	-	-
Rh ₄₉	-	-
Rh ₅₀	-	-
Rh ₅₁	-	-

- neoznačené

2.2 Antigeny Rh systému

Rh systém má základ ve dvou velmi blízko sebe ležících lokusech genů na krátkém raménku chromozomu 1: RHD gen kódující RhD protein a RHCE gen kódující RhCcEe protein. Oba proteiny jsou tvořeny polypeptidovým řetězcem ze 417 aminokyselin, který 12krát prochází erytrocytární membránou a na její vnější straně vytváří šest smyček, kde jsou lokalizovány vlastní Rh antigeny. Lidské Rh antigeny jsou exprimovány pouze na buňkách erytroidní linie a jsou prokazovány na fetálních erytrocytech od šestého týdne těhotenství [7].



Obr. 1 Schéma RhD proteinu a RhCcEe proteinu [7]

2.2.1 Antigeny D a d

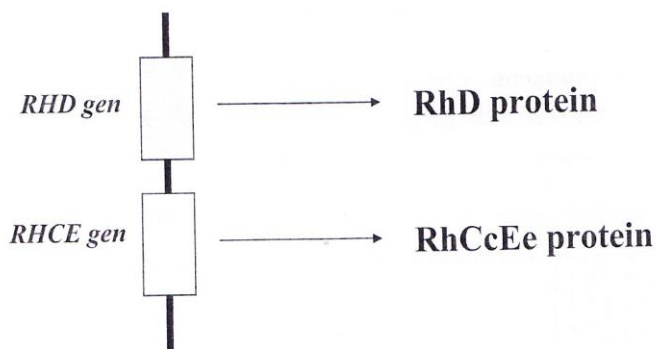
D antigen je z Rh antigenů nejvíce imunogenní a lékařsky nejdůležitější. Je souborem řady D epitopů na povrchové části RhD proteinu. D epitop představuje prostorově jedinečné uskupení 3 – 5 aminokyselin extramembranózní části RhD proteinu. V současné době je monoklonálními protilátkami rozeznáváno více než 30 různých D epitopů [7]. Okolo 85% Evropské a severoamerické populace a asi 95% černých Afričanů je D+. D je často opakující se antigen na Dálném východě, dosahující v některých populacích 100% [11]. D+ je geneticky určen přítomností RHD genu kódujícího RhD protein. Naopak D- je výsledek chybění RhD proteinu způsobené v kavkazské populaci delecí RHD genu, u africké a asijské populace je RHD gen sice přítomen, ale je inaktivován a tím je zablokována tvorba příslušného proteinu. U D+ se může jednat o homozygotní (DD) nebo heterozygotní postavení

(Dd). U D- se jedná pouze o homozygotní postavení (dd). Síla D antigenu klesá kvantitativně od nejsilnějšího u D-- ke slabšímu D^w, extrémně slabé je D^{el}.

K abnormálním antigenům patří slabé a variantní Rh antigeny. Weak D (slabě exprimovaný D antigen, dříve D^u) vzniká u RHD weak genů s bodovými mutacemi, které vedou ke změnám v intramembranózní a intracelulární části RhD proteinu, při kterých nedochází k zabudování proteinu do struktury Rh komplexu. Je snížený počet kopií RhD proteinu na erytrocytu, avšak imunologické vlastnosti erytrocytu se nemění [8]. Na molekulární úrovni bylo dosud popsáno více než 20 typů slabých D antigenů. Jedinci se slabými D antigeny nejsou imunizováni normálním D antigenem a nejsou u nich detekovány LFA [7].

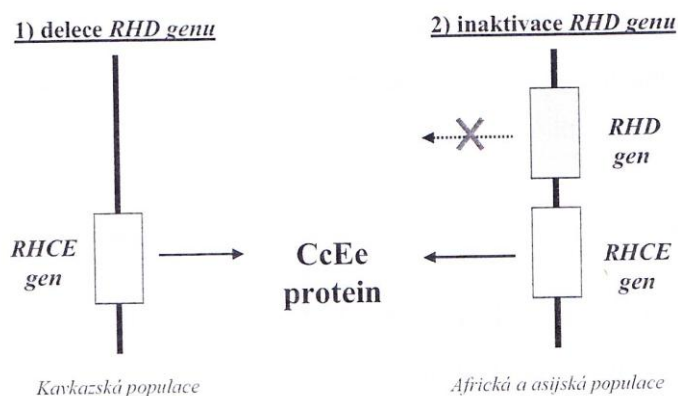
D varianty vznikají při změnách RHD genu, které vedou ke změně uspořádání extramembranózní části RhD proteinu [8] – tzn. chybění některých D epitopů a vznik nových antigenů (LFA) následkem nového tvaru RhD proteinu [7]. RHD gen může být změněn dvěma mechanismy – (1) bodové mutace způsobují změnu aminokyseliny v polypeptidovém řetězci; (2) rekombinace mezi geny RHD a RHCE vede ke vzniku hybridního RHD-CE-D genu kódujícího hybridní RhD-CE-D protein. Na molekulární úrovni bylo dosud popsáno kolem 30 typů D variant. Nejčastější a klinicky nejvýznamnější je varianta D^{VI}. Jedinci s D variantou mohou být imunizováni D antigenem a tak produkovat protilátky anti-D proti chybějícím D epitopům [7].

Symbol d představuje nepřítomnost D, jelikož alela d je afunkční, resp. amorfní. Lidé D- jsou velmi náchylní na imunizaci anti-D, např. během gravidity nebo po transfuzi D pozitivní krve.



Kavkazská, africká a asijská populace

Obr. 2 RhD pozitivita [7]



Obr. 3 RhD negativita [7]

2.2.2 Antigeny C a c

Antigeny C a c jsou alelické páry produkovány genem RHCE. Polymorfismus C/c je určován substitucí 6 nukleotidů RHCE genu, která má za následek změnu 4 aminokyselin v RhCcEe proteinu. Základní rozdíl mezi C a c je substituce aminokyselin serin (antigen C) – prolin (antigen c) na pozici 103 lokalizované na druhé extramembranózní smyčce RhCcEe proteinu [7].

Stejně jako u D antigenu se i C/c antigenů vyskytují další varianty:

C^w je relativně málo se opakující antigen, i když jeho výskyt je v populaci různý. Nejvyšší četnost je u pobaltských národů (až 9%), cca 3% četnost se nachází u severoevropanů a severoameričanů, u ostatních populací je mnohem nižší. U C^w dochází k substituci kyseliny glutamové za arginin v pozici 41 RhCcEe proteinu a následná konformační změna molekuly má za následek oslabení C. Je obvykle produkován genovým komplexem DCe.

C^x je vzácný antigen a stejně jako C^w je produkován komplexem DCe. U C^x dochází k substituci alaninu za threonin v pozici 36 RhCcEe proteinu a tato konformační změna molekuly má za následek oslabení C. Nejvyšší výskyt C^x byl zjištěn u Finů (1,8%), u kavkazské populace se pohybuje v rozmezí mezi 0,1 – 0,3%.

MAR antigen byl poprvé popsán v roce 1994, chová se jako produkt alel jak C^w tak C^x . Poprvé byl zjištěn u finské ženy s fenotypem $C^w+C^x+D+C+c-E-e+$.

Slabý antigen C zvaný c^v byl později rozpoznán jako slabé C produkované komplexem DCE [11].

2.2.3 Antigeny E a e

Antigeny E a e jsou alelické páry produkovány genem RHCE. Polymorfismus E/e je dán substitucí jednoho nukleotidu RHCE genu, která má za následek změnu jedné aminokyseliny RhCcEe proteinu. Rozdíl mezi antigenem E a e je v substituci aminokyselin prolin (antigen E) – alanin (antigen e) na pozici 226 lokalizované na čtvrté extramembranózní smyčce RhCcEe proteinu [7].

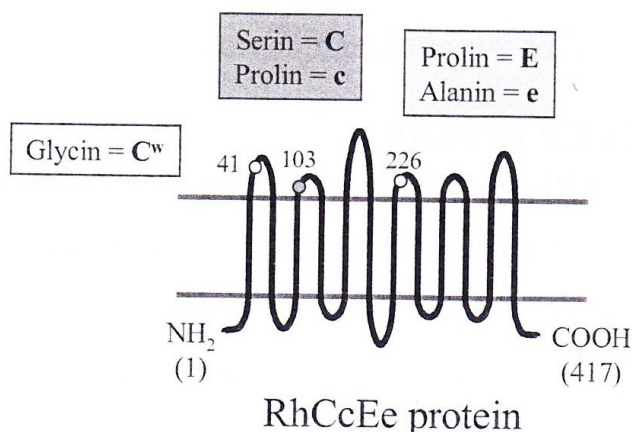
Na místě E/e se můžou vyskytovat další varianty:

Známý je zeslabený antigen E^u , vyprodukovaný genovým komplexem DcE a dcE. Dále se vyskytuje velmi vzácný antigen E^w , který se vyskytl pouze v genovém komplexu DcE. Tyto antigeny byly hlášeny ze studií některých evropských rodin, černošských Američanů či Izraelců.

Další varianty antigenů E a e mají spíše rasový charakter. Anti- E^T , „přirozeně“ se vyskytující aloprotilátka, byla objevena v séru australského domorodce. Tato protilátka se chovala jako anti-E při testování erytrocytů bělochů, která reagovala se všemi erytrocyty E+. E^T vysvětluje slabé antigeny E, které byly předtím ohlášeny u australských domorodců, papuánců či indiánů. Studie ukázala, že antigen E^T byl zděděn v komplexu DcE.

Antigen VS (e^s) se vyskytuje asi u 30 – 40% populace černých Afričanů, u ostatních populací je vzácný. U VS dochází k substituci leucinu za valin v pozici 245 RhCcEe proteinu.

Slabý antigen e (e^i) byl objeven u členů skupiny kolumbijských indiánů. Erytrocyty e^i nejsou nadále dostupné pro porovnání s ostatními slabými antigeny e.



Obr. 4 Schéma C/c, E/e a C^w antigenů [7]

2.3 Protilátky skupinového systému Rh

V skupinovém systému Rh se „přirozené“ protilátky vyskytují velmi vzácně a doposud pro ně neexistuje anamnestické imunizační vysvětlení. „Přirozeně“ se vyskytly tyto protilátky: anti-D, anti-C^w a anti-E.

Pro Rh systém jsou však typické imunní protilátky. Protože antigeny Rh systému se vyskytují jen na erythrocytech, vznikají imunní protilátky pouze na základě imunizačního podnětu – podání krve inkompatibilní ve skupině Rh nebo v průběhu těhotenství. Imunní protilátky mohou patřit k IgM, IgG, ale některé i k IgA [5]. Protilátky typu IgM jsou označovány jako tzv. volné, kompletní, bivalentní či včasný imunní typ; IgG se označují jako tzv. inkompletní, univalentní či hyperimunní typ; IgA protilátky mají charakter inkompletních protilátek. IgG i IgM protilátky neváží komplement. Protilátky IgG díky své malé molekule přechází přes placentu, IgM a IgA nepřechází.

Imunoglobuliny gama anti-D (IgG anti-D) byly nejčastějším typem protilátky v Rh systému. Protilátka anti-D byla hlavní příčinou hemolytických potransfuzních reakcí a HON. Dnes se však stala velmi vzácnou díky převodu identické krve a zavedení profylaxe u RhD negativních matek. Při imunizaci nejprve vznikají protilátky typu IgM, po krátké době tvorba těchto tzv. včasných imunních protilátek přechází do

tvorby hyperimunních protilátek IgG. Z podtříd IgG anti-D nejčastější převládají IgG1 a IgG3.

Anti-C, -c, -E a -e jsou imunní protilátky typu IgG většinou podtřídy IgG1. Všechny tyto protilátky se podílejí na pozdní hemolytické potransfuzní reakci. Druhou lékařsky nejdůležitější protilátkou je anti-c, která může též způsobit závažné hemolytické onemocnění novorozence. Anti-C, -E a -e způsobí pouze mírnou formu HON. Anti-E se může vyskytnout i jako „přirozená“ protilátka a často je zmiňována jako „pouze enzymová“. Je častější než anti-C a ne vzácně se vyskytuje s anti-D. Anti-e je vzácná protilátka, protože v populaci jsou pouze 3% lidí e negativní. Anti-C jako samostatná protilátka je vzácná, většinou se nachází ve směsi anti-C + C^w.

3. Prenatální a postnatální imunohematologická vyšetření

3.1 Imunohematologická vyšetření v těhotenství

Imunohematologické vyšetření patří k základním vyšetřením těhotných žen. Společnost pro transfuzní lékařství ČLS JEP vydala 1. 3. 2010 doporučení pro imunohematologické vyšetření v těhotenství a po porodu. Účelem tohoto doporučení je definovat použití imunohematologických testů v těhotenství a po porodu. Cílem testování je prevence hemolytického onemocnění plodu a novorozence [15].

Na začátku těhotenství u všech těhotných se provádí vyšetření krevní skupiny v systému AB0 (aglutinogeny + aglutininy), antigenu D a nepravidelných antierytrocytárních protilátek. U screeningu protilátek je základním testem LISS-NAT při 37 °C. Zjistíme-li při vstupním vyšetření či v dalších vyšetřeních v séru nebo plazmě matky nepravidelnou protilátku, odesíláme vzorek z našeho oddělení² na vyšší pracoviště k identifikaci antierytrocytární protilátky.

Další kontrolní vyšetření AB0, D a screeningu protilátek se provádí u všech těhotných ve 28. (+2) týdnu. Krevní vzorek k vyšetření screeningu protilátek je nutno odebrat před profylaktickým podáním anti-D. V případě průkazu protilátek anti-D, -c, -K, -E při vstupním vyšetření se provede další screening protilátek za 4 týdny, opakuje se 1 x za 4 týdny do 28. týdne, po 28. týdnu 1 x 14 dní. Současně se kontroluje i titr protilátky, dokud není dosaženo klinicky významného titru.

Pokud před odběrem krevního vzorku byl podán imunoglobulin anti-D, je důležité, aby informace o podání anti-D byla uvedena v dokumentaci těhotné včetně žádanky o imunohematologické vyšetření. Je-li záznam o podání anti-D v posledních 8 týdnech a reakce anti-D je slabá, provede se kontrolní vyšetření za 4 týdny. Není-li záznam o profylaxi, doporučuje se provádět identifikaci protilátek a stanovovat titr anti-D každé 4 týdny do 28. týdne těhotenství a každé 2 týdny po 28. týdnu. Pokud protilátky anti-D přestanou být detekovatelné v NAT a množství/titr protilátek klesá, jedná se pravděpodobně o profylaktické anti-D; stabilní či zvyšující se koncentrace indikuje imunní protilátky anti-D [14, 15].

² Transfuzní oddělení Havlíčkův Brod

Vyšetření krevní skupiny a PAT u plodu nepřináší žádné užitečné informace pro diagnózu či sledování HON. V případě reálné dostupnosti se provádí RHD, RHCE genotypování plodu z plazmy matky metodou QT-PCR, pokud u těhotné byl prokázán klinicky významný titr protilátek anti-D, -c, -E, -K.

3.2 Imunohematologická vyšetření po porodu

Po porodu se u matky vyšetřuje krevní skupina v systému AB0, antigen D a screening protilátek pouze v případě, že toto vyšetření nebylo provedeno v průběhu těhotenství, nebo jako součást předtransfuzního vyšetření.

U novorozence se vyšetřuje krevní skupina AB0 u podezření na AB0 HON, antigen D se provádí především u novorozenců D negativních matek, dále u suspektního HON a u novorozenců matek s klinicky významnými protilátkami. Vyšetření D^w a variantních antigenů D není doporučováno. Vyšetření PAT se provádí u novorozenců, u jejichž matek byly prokázány klinicky významné protilátky, dále u matek, u kterých nebyly prokázány nepravidelné protilátky, ale novorozenec má klinické známky HON, a u suspektního AB0 HON.

4. Laboratorní metody sloužící k vyšetření screeningu protilátek

Zkumavková metoda, metoda sloupcové aglutinace a metoda pevné fáze slouží k vyloučení přítomnosti nepravidelných přirozených a získaných imunních protilátek proti erytrocytárním antigenům v séru nebo plazmě těhotných žen, pacientů a dárců. Základní metodou je NAT v prostředí s normální nebo nízkou iontovou silou. Enzymový test je užitečný pouze tam, kde je vyžadována vyšší citlivost screeningu protilátek nebo v případě přítomnosti více protilátek.

Zkumavková metoda je jedna z nejstarších imunodiagnostických metod. Základní metoda je NAT v prostředí s normální iontovou silou (fyziologický roztok).

V aglutinačních zkumavkách dochází k vazbě specifických protilátek přítomných v séru nebo plazmě na antigeny dg. erytrocytů³ při 37 °C a inkubaci 60 minut - během této doby se vytvoří vazba antigen-protilátka. Po důkladném promytí v nadbytku 0,9 % NaCl, kdy se odstraní nenavázané přebytečné imunoglobuliny, se přidá AGH⁴. Po centrifugaci se obsah zkumavek pipetou přenesse na podložní sklíčko a odečítá se mikroskopicky při zvětšení objektivu 100x. V případě positivity se v zorném poli mikroskopu najdou různě četné shluky erytrocytů. Naopak při negativitě se v zorném poli nachází jednotlivé erytrocyty, tj. žádné shluky.

Výhody – levná, dostupná, nenáročná na vybavení

Nevýhody – velké množství séra a suspenze erytrocytů, nutnost promývání, méně citlivá

Metoda sloupcové aglutinace byla vyvinuta v 80. letech 20. století ve Švýcarsku. Plánem bylo vyvinout metodu, kde by se nemuselo promývat. Základní metoda je NAT v prostředí s nízkou iontovou silou (LISS = low ionic strength solution).

³ Erytrocyty s vhodnými antigeny umožňující stanovení všech klinicky významných protilátek, zastoupeny systémy Rh, Kell, MNSs, Duffy, Kidd, Lewis a Kp^a

⁴ AGH = polyspecifický anti-human globulin (anti-IgG, -C3d), slouží k detekci IgG a komponenty komplementu C3d

Detekce komplexu antigen-protilátka probíhá ve speciálně vyvinutém gelu, kterým jsou naplněny mikroskopické umístěné v plastovém nosiči. Suspenze dg. erytrocytů a vyšetřované sérum nebo plazma se kape do mikroskopických s gelem, po 15 min. inkubaci při 37 °C se centrifuguje. Odpadá promývací fáze díky tomu, že před přidáním séra nebo plazmy je do mikroskopické nejprve napipetována suspenze dg. erytrocytů, která nad gelovou vrstvou vytvoří bariéru, která brání neutralizaci AGH sérovými IgG proteiny. Pozitivní test je ostře ohraničený prsteneček na povrchu gelu až jemný závoj aglutinovaných erytrocytů v sloupci gelu. Při centrifugaci dochází k tomu, že aglutináty komplexu antigen-protilátka jsou podle velikosti zachyceny na povrchu nebo uvnitř gelového sloupce. Výsledek negativního testu je kompaktní sediment erytrocytů na dně jamky.

Výhody – malé množství séra a suspenze erytrocytů, bez nutnosti promývání, stabilní a objektivní výsledky, spolehlivé, rychlé, jednoduché testy, citlivá a specifická oproti tradičním metodám

Nevýhody – použití speciální centrifugy, inkubátoru, mikropipety

Metoda pevné fáze, Capture-R Ready-Screen (firma APR s.r.o.), je modifikovanou metodou detekce protilátek, která je založena na postupech podle Plapp a spol. a Juji a spol.

Membrány erytrocytů byly navázány a vysušeny na povrchu jamek polystyrénových mikrodestiček. Membránové antigeny jsou používány k vazbě specifických antierytrocytárních protilátek, přítomných v plazmě nebo séru těhotných žen, pacientů a dárců. Po krátké inkubaci jsou nenavázané zbytkové imunoglobuliny vymyty z jamek a přidána suspenze indikátorových erytrocytů s navázanou anti-IgG. Centrifugace vede ke kontaktu indikátorových erytrocytů s protilátkami, vázanými na imobilizované membrány diagnostických erytrocytů. V případě positivity jsou indikátorové erytrocyty zadrženy na dně jamek tím, že na povrchu imobilizované reagenční vrstvy vytvoří pevné anti-IgG-IgG komplexy. Následkem tohoto přemostění adherují indikátorové erytrocyty ke screeningovým krvinkám jako druhá imobilizovaná vrstva. Naproti tomu negativní test (nepřítomnost komplexu antigen-protilátka), nejsou indikátorové erytrocyty zadrženy vazbou při jejich migraci a usadí se uprostřed mikrotitračních jamek jako pevně stmelovaný, dobře definovatelný terčík.

Výhody – malé množství séra a erytrocytů, citlivá a specifická metoda, výsledky do 1 hod., snadná automatizovatelnost

Nevýhody – speciální automat, při manuálním provedení falešně pozitivní reakce, z důvodu nesprávného promytí

5. Hemolytické onemocnění novorozence při Rh inkompatibilitě

Hemolytické onemocnění novorozence (HON) je nemoc charakterizovaná zkráceným přežíváním erytrocytů fetu nebo novorozence [8]. Jedná se o imunní hemolýzu, kdy dochází k vazbě mateřských protilátek na specifické antigeny fetálních erytrocytů a následně k jejich hemolýze. Hematopoetické tkáně fetu reagují na hemolýzu zvýšením erythropoézy [8]. Ta vede ke zvětšení jater a sleziny, k portální hypertenzi, k selhání jater, k anémii, špatnému prokrvení tkání, k srdeční nedostatečnosti a generalizovanému edému, někdy až k smrti plodu. Při rozpadu erytrocytů vzniká vysoká hladina nekonjugovaného bilirubinu. Před narozením přechází volný bilirubin z fetu do organismu matky placentou, v játrech matky je konjugován s albuminem a následně je z organismu matky odstraněn. Po porodu nezralá játra novorozence nedostatečně syntetizují enzym glukuronidázu a tak nemůže být bilirubin konjugován s kyselinou glukuronovou a pro omezené množství albuminu ani vázán na něj. Dochází k hromadění volného bilirubinu v centrálním nervovém systému (vzniká kernikterus) a tím může dojít k poškození mozku novorozence.

V posledních třech měsících těhotenství a zejména při porodu přechází malé množství fetálních D pozitivních erytrocytů do krevního oběhu D negativní matky. Po prvním kontaktu (první těhotenství) s cizorodým antigenem si organismus matky vytváří protilátky typu IgM. Díky velké molekule neprochází přes placentu a zůstávají pouze v krevním oběhu matky. Během několika týdnů organismus matky začíná produkovat protilátky IgG, které překonávají placentární bariéru a přecházejí do krevního oběhu fetu [8]. Tento proces se označuje jako primární imunitní odpověď. Při opakovaném kontaktu (další těhotenství) se stejným antigenem se rychle tvoří pouze protilátky IgG, což je označováno jako sekundární imunitní odpověď. Ve slezině dochází k odstranění části membrány senzibilizovaných erytrocytů plodu, čímž jsou krvinky málo deformovatelné. Pokud nejsou ve slezině ihned fagocytovány, jsou následně destruovány. Proces hemolýzy je u HON nezávislý na komplementovém systému [8].

Klinické příznaky závisí na tíži postižení: a) lehké onemocnění (hyperbilirubinémie, anémie ≥ 110 g/l), b) středně těžké onemocnění

(hyperbilirubinémie, středně závažná anémie), c) těžké onemocnění (závažná anémie, srdeční selhání, hepatocelulární poškození, hypoalbuminémie, hypoplazie plic).

K léčbě HON se využívá u lehké formy fototerapie, u těžších forem intrauterinní transfuze nebo výměnná transfuze po porodu. K ovlivnění tvorby protilátky u matky se využívá intenzivní velkoobjemové plazmaferézy během těhotenství nebo vysoké dávky imunoglobulinů.

6. Praktická část

Tato část je zaměřena na přehled vyšetřených pozitivních screeningů protilátek na Transfuzním oddělení Havlíčkův Brod za období 2000 – 2009. K vyšetření byla použita metoda sloupcové aglutinace (dodavatel firma Eurex Medica).

Přístroje a pomůcky: ID inkubátor, ID centrifuga, laboratorní centrifuga, stojánky, zkumavky, automatická pipeta

Spotřební materiál: Pasteurovy pipety, gelové karty Reverse grouping with antibody screening (3 jamky neutrální gel, 3 jamky AGH)

Reagencie: panel dg. erytrocytů ID-DiaCell I, II a III, ID-Diluent 1 (enzym bromelin)

Postup práce:

Vyšetření provádíme 1x týdně. Správně odebrané vzorky laborantka průběžně přijímá v NIS a označí přiděleným číslem. Poté vzorky centrifugujeme 10 min. při 3000 ot./min. Po centrifugaci oddělíme sérum do skleněné zkumavky označené číslem vyšetření a uložíme do lednice v imunohematologické laboratoři při teplotě 2 – 8 °C. Před vlastním vyšetřením vytiskneme Pracovní list SCREEP a zkontrolujeme podle něj, zda nám nechybí žádná zkumavka. Poté označíme gelové karty číslem vyšetření a jménem vyšetřované (jedna karta pro jednu vyšetřovanou). Do každé jamky napipetujeme 50 µl originální suspenze dg. erytrocytů (do 1. a 4. krvinky I, do 2. a 5. krvinky II, do 3. a 6. krvinky III). Přidáme 25 µl vyšetřovaného séra a do prvních třech jamek s neutrálním gelem přidáme 25 µl ID-Diluentu 1. Karty vložíme do inkubátoru na 15 min. při 37 °C. Po inkubaci necháme centrifugovat 10 min. v ID centrifuze. Výsledky hodnotí lékař.

Výsledky vyšetření:

Negativní výsledek – ostře ohraničený sediment erytrocytů na dně jamky

Pozitivní výsledek – podle síly pozitivity ostře ohraničený prstenec erytrocytů na povrchu gelu (++++) až jemný závoj ve sloupci gelu (+)



Obr. 5 Sloupcová aglutinace – síla positivity podle velikosti komplexu antigen-protilátka [22]

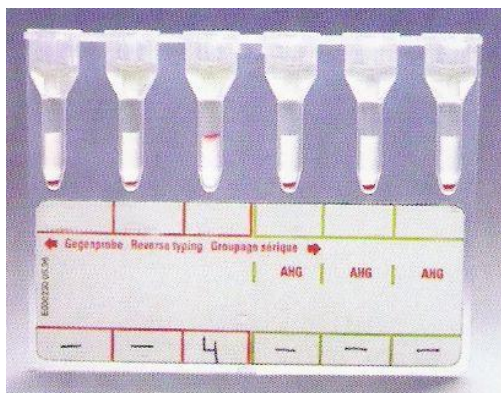
Orientační určení protilátky provádíme pomocí přiložené tabulky u dg. erytrocytů. Při podezření na specifickou protilátku odesíláme vzorek krve matky k identifikaci protilátky na vyšší pracoviště, nejčastěji na Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové.

V Tab. 4 najdeme přehled celkem vyšetřených screeningů protilátek za každý rok v období 2000 – 2009, dále počet pozitivních screeningů a procentuální zastoupení pozitivních screeningů z celkového počtu.

Tab. 5 ukazuje jednotlivé identifikované nepravidelné protilátky v každém roce za období 2000 – 2009. U identifikované protilátky anti-D nelze v 7 případech vyloučit stav po podání imunoglobulinu anti-D, jelikož tento údaj nebyl uveden na žádance, ale opakované vyšetření screeningu protilátek vyšlo s nižším titrem až negativní. Nespecifita označuje pozitivní reakce pouze v enzymovém testu. Často v tomto testu byla pozitivní i autokontrola, tj. testování suspenze vlastních erytrocytů a vlastního séra nebo plazmy. Do neuzavřených jsou zařazeny případy, kdy se jednalo o pozitivitu na hranici detekce, nebo nebyl dodán nový vzorek k odeslání, proto nedošlo k identifikaci protilátky.

Tab. 4 Přehled celkem vyšetřených a pozitivních screeningů protilátek na Transfuzním oddělení Havlíčkův Brod za období 2000 - 2009

Rok vyšetření	Celkem vyšetřených screeningů protilátek	Počet pozitivních screeningů protilátek	% zastoupení pozitivních screeningů
2000	1072	32	2,99
2001	1188	25	2,10
2002	1146	30	2,62
2003	1088	45	4,14
2004	1379	40	2,90
2005	1412	42	2,97
2006	1459	52	3,56
2007	1504	63	4,19
2008	1490	56	3,76
2009	1394	44	3,16



Obr. 6 Gelová karta Reverse grouping with antibody screening [22]



Obr. 7 Diagnostické erythrocyty [22]

Tab. 5 Celkový přehled identifikovaných nepravidelných protilátek u těhotných na Transfuzním oddělení Havlíčkův Brod za období 2000 – 2009

		-D	-D+C	-C+Cw	-E	-c	-Cw	-K	-Fya	-C+Fya	-Lea	-Leb	-P1	-M	-N	-S	nespecifita	po IgG anti - D	neuzavřeno
počet těhotných s protilátkou v roce	2000	1	1		1	1		2									14	1	
	2001	2										1		1		1	9		1
	2002	1			1				1								16		
	2003	4						1	1								17	9	
	2004	1			2	1	2		1					1			11	8	
	2005					1			1					2	1		17	6	
	2006				2		2		1				2				17	9	
	2007			1	2		3							1			15	15	1
	2008			1	1	1				1	1			2	1		12	6	
	2009		1						1		2		1	1	1		20	4	2
celkem		9	2	2	9	4	7	3	6	1	3	3	1	8	3	1	148	58	4

7. Diskuze

Na Transfuzním oddělení Havlíčkův Brod bylo vyšetřeno celkem 272 pozitivních screeningů protilátek, z toho bylo 33 (12,13%) screeningů s protilátkou patřící do Rh systému. Protilátka anti-D se vyskytla pouze do roku 2004. V 7 případech však nelze s určitostí říci, zda se nejedná o profylaktické podání anti-D, jelikož tento údaj nebyl uveden na žádance, ale opakovaná vyšetření vyšla s nižším titrem až negativní. Anti-C se jako samostatná protilátka nevyskytla, pouze ve směsi s anti-D nebo anti-C^w. Zvýšil se počet případů protilátky anti-C^w. Četnost antigenu C^w v evropské populaci je přibližně 3%. Vysoký výskyt jsme měli i u protilátky anti-E, kdy ve 3 případech byl záchyt pouze v enzymovém testu. Anti-e se nezachytila u žádné těhotné.

Do nespecifity jsou zařazeny případy, kdy se jednalo o pozitivitu pouze v enzymovém testu, přičemž v tomto testu byla pozitivní i autokontrola. Nebo se jednalo o pozitivitu na hranici detekce v NAT. V těchto případech bylo doporučeno zopakovat vyšetření.

Dále se zvýšil výskyt protilátek i u ostatních krevních systémů. Zejména ze systému Duffy se v 6 případech vyskytla protilátka anti-Fya, u které jsme měli nejvyšší titr 1:67 108 864, dále ze systému MNS v 8 případech protilátka anti-M, která je chladové povahy a často typu IgM.

Studie Detekce a analýza protilátek Rh systému je zaměřená na prevalenci a šíření protilátek Rh systému v čínské populaci [23]. Bylo vyšetřeno 54 000 pacientů metodou sloupcové aglutinace. Z toho mělo 47 (0,087%) pozitivní screening protilátek patřících do Rh systému. Specifita protilátek Rh systému byla následující: anti-E 29krát (61,70%), anti-D 8krát (17,02%), anti-cE 5krát (10,64%), anti-c 4krát (8,51%) a anti-C 1krát (2,13%). Ve srovnání s bílou populací je výskyt protilátek Rh systému v čínské populaci nízký. Hlavní příčina vzniku protilátek z Rh systému je aloimunizace v těhotenství a transfuze krve.

V další studii provedené v Port Harcourt (Nigérie) bylo testováno 500 těhotných žen metodou sloupcové aglutinace [24]. Z nich mělo 17 (3,4%) pozitivní screening protilátek. Jejich specifita byla následující: anti-C 6krát (1,2%), anti-K 5krát

(1,0%), anti-E 3krát (0,6%) a anti-Jsb 3krát (0,6%). Anti-D nebyla identifikována, navzdory tomu, že v populaci je relativně vysoké procento D negativních žen (cca 8%).

Zavedením profylaxe imunoglobulinem se aloprotilátka anti-D vyskytuje pouze v ojedinělých případech. Na významu tak získaly aloprotilátky proti jiným erytrocytárním antigenům, kde profylaxe není možná.

8. Závěr

Od roku 2000 do roku 2009 metodou sloupcové aglutinace jsme vyšetřili na Transfuzním oddělení Havlíčkův Brod celkem 272 pozitivních screeningů protilátek a zachytili jsme tyto nepravidelné protilátky patřící do Rh systému: anti-D 9krát (3,31%), anti-D+C 2krát (0,74%), anti-C+C^w 2krát (0,74%), anti-E 9krát (3,31%), anti-c 4krát (1,47%), anti-C^w 7krát (2,57%) a anti-C+Fya 1krát (0,37%).

Použitá literatura

1. MOUREK, J. *Fyziologie – učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. 1.vyd., Grada Publishing, Praha, 2005, str. 17 – 30, ISBN 80-247-1190-7
2. SCHREIBER, M. a kol. *Funkční somatologie*. 1.vyd., H&H, Jinočany, 1998, str. 74 – 91, ISBN 80-86022-28-5
3. ŠVEJNOHA, J. *Jan Jánský objevitel čtvrté krevní skupiny*. Vydal Úřad Českého červeného kříže, Praha, 2000, str. 55
4. PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu. Buňka a krvetvorba*. 1.vyd., HK Credit, Hradec Králové, 2002, str. 58 – 64, 70 – 74, ISBN 80-86682-01-3
5. HRUBIŠKO, M., DOBRÝ, E. *Základy hemoterapie*. Osveta, Martin, SR, 1974, str. 145 – 167, ISBN 70-063-74
6. VACL, J. *Základy všeobecné a speciální imunohematologie – II. díl, 1. část*. 1.vyd., ÚDV SZP, Brno, 1973, str. 102 – 126
7. ČERMÁKOVÁ, Z., KOŘÍSTKA, M., MALUŠKOVÁ, A. *Imunohematologie*. 1.vyd., Ostravská univerzita v Ostravě, Ostrava, 2008, str. 42 – 50, ISBN 978-80-7368-600-0
8. TESAŘOVÁ, E. a kol. *Transfuzní lékařství a imunohematologie*. Brno, 2007, str. 38 – 42, 49 – 53
9. ECKSTEIN, R. *Imunohematologie a transfuzní lékařství*. Diaghuman, Praha, 1994, str. 36 – 43, 144 – 152
10. DANIELS, G., BROMILOW, I. *Essential guide to blood groups*. 1.vyd., Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2007, str. 33 – 44, ISBN – 13: 978-1-4051-5349-2
11. DANIELS, G. *Human blood groups*. 1.vyd., Blackwell Science Inc., Williston, Vermont, USA, 1995, str. 257 – 336, ISBN 0-86542-914-6
12. CALDA, P. *Erytrocytární aloimunizace a těhotenství*. In: Roztočil A, a kol., *Moderní porodnictví*, Praha, Grada, 2008, str. 204 – 210

13. ŽIŽKA, Z., CALDA, P. *Prevence, diagnostika a léčba erytrocytární aloimunizace v těhotenství*. Moderní gynekologie a porodnictví, ročník 7, č. 2, 1998, str. 104 – 121, ISSN 1211-1058
14. MASOPUST, J., BANZETOVÁ, H., DUŠKOVÁ, D., PEJCHALOVÁ, A., PÍSAČKA, M., ŠTOLBA, P. *Prenatální a postnatální imunohematologická vyšetření*. Transfuze a hematologie dnes, ročník 14, č. 1, 2008, str. 7 – 18, ISSN 1213-5763
15. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2010_06 ze dne 1. 3. 2010 verze 3: *Imunohematologická vyšetření v těhotenství a po porodu* (<http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>) citace 1. 2. 2011
16. Správný operační postup pro laboratorní vyšetření č. 4.04 – Zkouška kompatibility ve zkumavce, verze 1, platný od 7. 4. 2011, Transfuzní oddělení Havlíčkův Brod
17. Správný operační postup pro laboratorní vyšetření č. 4.09 – Vyšetření matek z prenatální poradny, verze 1, platný od 7. 4. 2011, Transfuzní oddělení Havlíčkův Brod
18. Příbalový leták Anti-human globulin (Murine monoclonal blend) NOVACLONE™ Anti-IgG, -C3d Polyspecific, výrobce Immucor Gamma, dodavatel APR s.r.o.
19. Příbalový leták 0,8% Diagnostické erytrocyty pro ID-Micro Typing System, výrobce DiaMed, dodavatel Eurex Medica
20. Příbalový leták ID-karta „LISS/Coombs + enzyme test“, výrobce DiaMed, dodavatel Eurex Medica
21. Archiv Transfuzního oddělení Havlíčkův Brod – dokumentace č. 6.97 Pracovní listy – prenatální poradna rok 2000 – 2009
22. Manuál Micro Typing System, firma DiaMed, dodavatel Eurex Medica
23. Wu YJ, Wu Y, Chen BC, Liu Y *Detection and analysis of anti-Rh blood group antibodies*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538092?dopt=Abstract> citace 7. 8. 2011

24. ZACCHEAUS A. JEREMIAH, AUGUSTINA MORDI, FIEKUMO I. BUSERI, AND TEDDY. C. ADIAS *Frequencies of maternal red blood cell alloantibodies in Port Harcourt, Nigeria.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3082715/> citace 7. 8. 2011