



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE  

---

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

## Imunohematologické vyšetření HON

## Immunohaematological testing of HDFN

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Lenka Balcarová

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Daniela Obitková

---

Kladno 2022/2023

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Balcarová** Jméno: **Lenka** Osobní číslo: **499643**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**  
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

## II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Imunohematologické vyšetření HON**

Název bakalářské práce anglicky:

**Immunohaematological testing of HDFN**

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude imunohematologické vyšetření při hemolytickém onemocnění novorozence (HON). Součástí komplexního imunohematologického vyšetření je i průkaz nepravidelných antierytrocytárních protilátek, které mohou u plodu způsobit předčasný rozpad erytrocytů. Teoretická část bude zaměřena na krevně skupinové systémy ABO a RhD. Budou charakterizovány typy HON a imunologické projevy. Dále bude popsáno imunohematologické vyšetření těhotné ženy a novorozence. Praktická část se zaměří na pozitivní screeningové vyšetření nepravidelných antierytrocytárních protilátek u těhotných žen. V případě pozitivního výsledku bude provedena identifikace nepravidelných antierytrocytárních protilátek. U novorozence se bude prokazovat přítomnost protilátky navázané na povrchu erytrocytů. Na základě vyšetření matky a novorozence se vyhodnotí riziko hemolytického onemocnění novorozence. Bude provedena statistická analýza zpracovaných vzorků s rizikem HON vyšetřených na Oddělení krevní banky ve Fakultní nemocnici Motol z období let 2018–2022.

Seznam doporučené literatury:

- [1] MAREŠOVÁ, Pavlína a Luděk FIALA, Moderní postupy v gynekologii a porodnictví, ed. 2, Mladá Fronta, 2018, ISBN 978-80-204-4852-1
- [2] ULČOVÁ-GALLOVÁ, Zdenka a Jindřich MADAR, Imunologie a imunopatologie lidské reprodukce: vybrané kapitoly, ed. 2, Maxdorf, 2020, ISBN 978-80-7345-648-1
- [3] DOUBEK michal a Jiří MAYER, Léčebné postupy v hematologii 2020 : doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně, ed. 1, Česká hematologická společnost ČLS JEP, 2020, ISBN 978-80-270-8240-7

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

**MUDr. Daniela Obitková**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **14.02.2023**

Platnost zadání bakalářské práce: **20.09.2024**

doc. Mgr. Zdeněk Hon, Ph.D.  
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA  
děkan

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Imunohematologické vyšetření HON vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 09.05.2023

.....  
Lenka Balcarová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych touto cestou poděkovala mé vedoucí bakalářské práce MUDr. Daniele Obitkové za cenné rady, a hlavně za věnování svého času při zpracovávání této práce.

Dále bych poděkovala Oddělení krevní banky v FN Motol za poskytnutí dat pro statistické zpracování.

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce je zaměřena na imunohematologické vyšetření těhotné ženy a novorozence při riziku hemolytického onemocnění novorozence (HON). Teoretická část se věnuje krevně skupinovým systémům, imunitní reakci organismu, rozdělení HON dle inkompatibility v krevně skupinovém systému a imunohematologickému vyšetření.

Praktická část je zaměřena na zpracování dat pacientů s rizikem HON vyšetřených na Oddělení krevní banky FN Motol v období let 2018-2022. Kromě dat pacientů jsou také zobrazeny přehledy provedených laboratorních metod v průběhu období pěti let. Jsou popsány standardní operační postupy pro vyšetření krevní skupiny AB0 RhD, screening antierytrocytárních protilátek, identifikace antierytrocytárních protilátek, vyšetření fenotypu, titrace antierytrocytárních protilátek, vyšetření autoprotilátek, vyšetření volných imunních protilátek a přímý antiglobulinový test.

Celkově na Oddělení krevní banky v FN Motol v období let 2018-2022 bylo vyšetřeno 31 pacientů. Z toho u jednoho pacienta se prokázala profylaxe imunoglobulinem anti-D a mohlo se vyloučit riziko HON. Zpracovaná data ukazují, že nejčastěji vyšetřené HON bylo způsobeno inkompatibilitou AB0 systému. Jedná se o 54 % z celkově 30 vyšetřených pacientů. Počet provedených laboratorních metod na Oddělení krevní banky se během pěti let výrazně neměnil. Významným závěrem této práce je zjištění, že počet pacientů s rizikem HON od roku 2020 do roku 2022 klesal.

### **Klíčová slova**

HON; aloimunizace; krevně skupinové systémy; imunohematologie; přímý antiglobulinový test; novorozenecký ikterus

## **ABSTRACT**

The bachelor's thesis is focused on immunohaematological testing of pregnant women and newborn at risk of hemolytic disease of the newborn (HDN). The theoretical section deals with blood group systems, the immune response of the organism. The specification and categorization of HDN according to incompatibility in the blood group system and immunohaematological testing is also included.

The practical part is focused on processing and presentation of patients' data at risk of HDN examined at the Department of Blood Bank FN Motol in the period 2018-2022. In addition to patient data, summaries of laboratory methods performed over a period of five years are also displayed. In accordance with Standard operating procedures of blood type AB0, RhD testing, anti-erythrocyte antibody screening, identification of anti-erythrocyte antibodies, phenotype testing, anti-erythrocyte antibody titration, autoantibody testing, free immune antibody testing, and direct anti-globulin test are described.

Overall, 31 patients were tested at the Department of Blood Bank at Motol FN in the period 2018-2022. Of this, one patient had evidence of prophylaxis with immunoglobulin anti-D and a risk of HDN could be excluded. Processed data show that the most frequently investigated HDN was caused by compatibility of the AB0 system. This is 54% of the 30 patients examined overall. The number of laboratory methods performed did not differ significantly over five years. The decrease of incidence of HDN found in the years 2020-2022 is of the most importance.

## **Keywords**

HDFN; alloimmunation; blood-group systems; immunoheamatology; direct antiglobulin test; neonatal icterus

## Obsah

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Úvod.....   | 10 |
| 2     | Cíle práce.....   | 11 |
| 3     | Přehled současného stavu.....                                 | 12 |
| 3.1   | Krevně skupinové systémy .....                                | 12 |
| 3.1.1 | AB0 systém.....   | 12 |
| 3.1.2 | Rh systém .....   | 15 |
| 3.1.3 | Ostatní krevně skupinové systémy .....                        | 16 |
| 3.2   | Imunitní reakce při HON .....                                 | 17 |
| 3.2.1 | Imunoglobuliny .....  | 17 |
| 3.2.2 | Imunitní odpověď .....  | 18 |
| 3.2.3 | Eliminace inkompatibilních erytrocytů plodu.....              | 19 |
| 3.3   | Rozdělení HON.....  | 20 |
| 3.3.1 | AB0 inkompatibilita .....                                     | 21 |
| 3.3.2 | Rh inkompatibilita .....                                      | 22 |
| 3.3.3 | Inkompatibilita jiných krevně skupinových systémů.....        | 22 |
| 3.4   | Imunohematologické vyšetření těhotné ženy .....               | 23 |
| 3.4.1 | Vyšetření krevní skupiny AB0 systému a RhD.....               | 23 |
| 3.4.2 | Nepřímý antiglobulinový test .....                            | 26 |
| 3.4.3 | Screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek ..... | 27 |
| 3.4.4 | Titrační vyšetření.....                                       | 27 |
| 3.5   | Imunohematologické vyšetření novorozence .....                | 28 |
| 3.5.1 | Přímý antiglobulinový test .....                              | 29 |
| 3.5.2 | Vyšetření AB0 skupiny .....                                   | 29 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.6   | Klinický obraz HON .....  | 29 |
| 3.6.1 | Novorozenecká anémie .....  | 30 |
| 3.6.2 | Novorozenecký ikterus .....   | 30 |
| 3.7   | Prevence HON .....  | 31 |
| 3.7.1 | Anti-D imunoglobulin .....  | 31 |
| 3.7.2 | Erytrocyty Kell negativní .....   | 32 |
| 4     | Metodika.....   | 34 |
| 4.1   | Reagencie .....   | 34 |
| 4.2   | Přístrojové vybavení a materiál .....   | 35 |
| 4.3   | Odběr biologického materiálu .....  | 35 |
| 4.4   | Vyšetření krevní skupiny AB0 Rh(D) .....  | 35 |
| 4.4.1 | Sloupcová aglutinace DG Gel.....  | 35 |
| 4.4.2 | Zkumavková metoda.....  | 36 |
| 4.5   | Screening antierytrocytárních protilátek – sloupcová aglutinace Bio-Rad .....   | 37 |
| 4.6   | Identifikace antierytrocytárních protilátek – Grifols.....                      | 38 |
| 4.7   | Vyšetření fenotypu .....  | 39 |
| 4.7.1 | V Rh systému - ImuMed .....   | 39 |
| 4.7.2 | Rh-Kell sloupcovou aglutinací .....   | 40 |
| 4.8   | Titrace antierytrocytárních protilátek.....                                     | 40 |
| 4.9   | Vyšetření autoprotlátek v séru pacienta .....                                   | 41 |
| 4.10  | Vyšetření krevní skupiny novorozence sloupcovou aglutinací DG Gel Newborn ..... | 42 |
| 4.11  | Vyšetření volných imunních protilátek u novorozence .....                       | 42 |



|        |  |    |
|--------|--|----|
| 4.12   | Přímý antiglobulinový test .....                                   | 43 |
| 4.12.1 | Kvalitativní vyšetření .....                                       | 43 |
| 4.12.2 | Kvantitativní vyšetření .....                                      | 44 |
| 4.13   | Microsoft Excel .....  | 44 |
| 5      | Výsledky .....   | 46 |
| 5.1    | Data pacientů v období let 2018-2022.....                          | 46 |
| 5.2    | Přehled provedených laboratorních metod v období let 2018-2022 ... | 52 |
| 6      | Diskuze .....  | 63 |
| 7      | Závěr .....  | 66 |
| 8      | Seznam použitých zkratk.....                                       | 67 |
| 9      | Seznam použité literatury .....                                    | 69 |
| 10     | Seznam použitých obrázků .....                                     | 77 |
| 11     | Seznam použitých tabulek.....                                      | 79 |
| 12     | Seznam Příloh.....   | 80 |

# 1 ÚVOD

Hemolytické onemocnění novorozence je poškození plodu nebo novorozence nejčastěji při inkompatibilitě erytrocytárních antigenů matky a plodu. Při odlišné krevní skupině si matka většinou během prvního těhotenství začne tvořit protilátky proti erytrocytům plodu. HON nejčastěji způsobují klinicky významné protilátky. Jedná se například o protilátky Rh systému (anti-D, anti-c, anti-E), Kell systému (anti-K) a dalších. Tyto protilátky jsou třídy IgG, které prochází placentou do krevního oběhu plodu. V následujícím těhotenství již vytvořené matčiny protilátky rychleji reagují a způsobují dřívější rozpad erytrocytů plodu a novorozence. To se nejčastěji projeví u novorozence ikterem. U závažnějších případů může dojít až k úmrtí dítěte.

Pro správnou diagnostiku HON je důležité provést imunohematologické vyšetření těhotné ženy a novorozence. V České republice se imunohematologické vyšetření těhotné ženy provádí během 10.-16. týdne a 26.-32. týdne těhotenství. Provádí se vyšetření krevní skupiny AB0 systému a screening antierytrocytárních protilátek. V případě pozitivního screeningu se následně provádí identifikace antierytrocytárních protilátek. Dále se provádí titr protilátek, který je kvantitativním ukazatelem rizika aloimunizace těhotné ženy. Novorozenci se po narození vyšetřuje krevní skupina AB0 systému a přímý antiglobulinový test (PAT).

## 2 CÍLE PRÁCE

Cíl práce v teoretické části má shrnout problematiku hemolytického onemocnění novorozence (HON). Budou popsány typy onemocnění, laboratorní imunohematologické vyšetření těhotné ženy a novorozence a klinický obraz onemocnění.

V praktické části je cíl práce především statistické zpracování dat pacientů s rizikem HON na Oddělení krevní banky ve FN Motol z období let 2018-2022. Získaná data za jednotlivé roky budou graficky a tabulkově zpracována. Dalším cílem práce je podrobný popis laboratorních vyšetření antierytrocytární protilátky těhotné ženy a novorozence, která způsobila HON. Jedná se o vyšetření krevní skupiny sloupcovou aglutinací a zkumavkovou metodou, screening a identifikace nepravidelných antierytrocytárních protilátek, vyšetření fenotypu, titrace nepravidelných antierytrocytárních protilátek, přímý antiglobulinový test, volné imunní protilátky u novorozence a vyšetření autoprottilátek.

## 3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

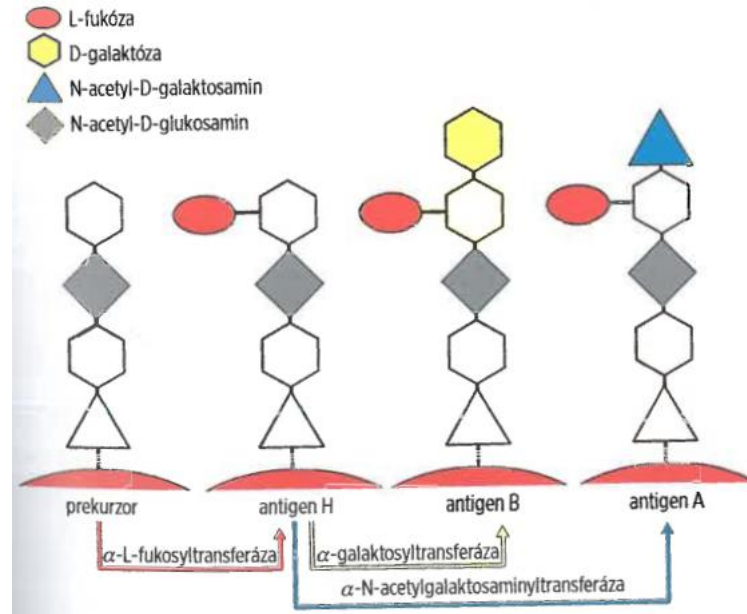
### 3.1 Krevně skupinové systémy

#### 3.1.1 AB0 systém

AB0 systém byl první objevený krevně skupinový systém. Byl popsán v roce 1901 Karlem Landsteinerem, který systém rozřadil do tří skupin A, B a C. Krevní skupina C se nyní označuje 0. Karl Landsteiner dále popsal Landsteinerovo pravidlo charakterizující výskyt určitých protilátek v plazmě, které nereagují s vlastními erytrocytárními antigeny. Pokud by byly v plazmě přítomny protilátky proti erytrocytárním antigenům docházelo by k imunitní reakci antigen-protilátka (Ag-Ab). Krevní skupinu AB následně Landsteiner popsal za dva roky. V objevu krevních skupin také figuroval český lékař Jan Jánský, který dosáhl stejného objevu jako Karl Landsteiner. Jánský popsal čtyři krevní skupiny značené římskými číslicemi (I až IV) v roce 1907. Od třicátých let 20. století se používá nynější označení krevních skupin [1; 2].

AB0 systém obsahuje čtyři krevní skupiny. Jedná se o skupiny označované A, B, AB, 0. Rozdělují se podle přítomnosti antigenů na povrchu erytrocytů, tyto povrchové antigeny se označují jako aglutinogeny. Výskyt aglutinogenů nacházíme převážně na povrchu erytrocytů a dále v tělních tekutinách, epitelových a endotelových buňkách. Jsou popsány tři aglutinogeny A, B, H. Aglutinogen H, který nacházíme u osob s krevní skupinou 0, je prekurzorem A a B antigenu. Aglutinogeny AB0 systému, jsou z biochemického hlediska oligosacharidy. Skládají se z N-acetylgalaktosaminu, N-acetylglukosaminu, L-fukózy, D-galaktózy. Dále je důležitý pro jejich vznik enzym glykosyltransferáza, která na prekurzor H připojuje jednotlivé cukerné zbytky. Jednotlivé krevní skupiny AB0 systému se od sebe odlišují podle navázaného koncového cukerného zbytku. Pokud se koncový cukerný zbytek N-acetyl-D-galaktosamin

váže pomocí A-transferázy na prekurzor H, jedná se o antigen A. Navázáním cukerného zbytku D-galaktózy B-transferázou na prekurzor H vzniká antigen B. Podrobnější biochemické složení aglutinogenů AB0 systému znázorňuje obrázek 1 [1; 3].



Obrázek 1 – Biochemické složení krevních skupin AB0 systému [4]

Protilátky, které se vyskytují v plazmě proti A a B aglutinogenu se nazývají aglutininy (anti-A, anti-B). Jedná se o přirozené protilátky, jejichž název je odvozen od vzniku. Protilátky k podmětu své tvorby nepotřebují předchozí imunizaci. Tvorba antierytrocytárních protilátek podle literatury začíná během 2.-8. měsíce od narození a jejich nejvyšší koncentrace v plazmě je kolem 5.-9. roku života. Přirozené protilátky jsou obvykle typu IgM. Novorozenci mohou získat přirozené protilátky třídy IgG od matky s krevní skupinou 0, kdy protilátky anti-A a anti-B při hemolytickém onemocnění plodu/novorozence (HON) procházejí přes placentu [1; 3].

Krevní skupina A má na povrchu erytrocytu aglutinogeny A a v plazmě se vyskytuje aglutinin anti-B. Jak uvádí tabulka 1, krevní skupina A je v populaci České republiky zastoupena nejčastěji a její výskyt se pohybuje kolem 42 %.

Tabulka 1 – Charakteristika krevních skupin AB0 systému [1]

| krevní skupina | genotyp | aglutinogeny | aglutininy       | populace v ČR |
|----------------|---------|--------------|------------------|---------------|
| A              | 0A, AA  | A            | anti-B           | 42 %          |
| B              | 0B, BB  | B            | anti-A           | 15 %          |
| AB             | AB      | A, B         | -                | 4 %           |
| 0              | 0       | 0            | anti-A<br>anti-B | 39 %          |

Druhá nejvíce zastoupená skupina je 0 s 39 %. Nejmenší populační zastoupení v České republice mají krevní skupiny B s 15 % a AB s 4 %. U krevní skupiny A byly popsány podskupiny A<sub>1</sub> až A<sub>6</sub>. Jednotlivé podskupiny se od sebe odlišují počtem antigenních míst a mutací transferázy. Každá transferáza je rozdílná v typu řetězce. Nejčastěji rozlišujeme podskupiny A<sub>1</sub> a A<sub>2</sub>, kdy podskupina A<sub>1</sub> má více antigenních míst než podskupina A<sub>2</sub>. Dle literatury je výskyt podskupiny A<sub>1</sub> u krevní skupiny A v populačním zastoupení častější, než má podskupina A<sub>2</sub>. Ostatní podskupiny skupin A a B mají slabý výskyt antigenů, a proto jsou vzácné. Krevní skupina B obsahuje aglutinogeny B a aglutininy anti-A. Na povrchu erytrocytů krevní skupiny AB jsou přítomny oba aglutinogeny A, B, v plazmě nejsou přítomné žádné aglutininy. Naopak v plazmě krevní skupiny 0 jsou přítomny oba aglutininy anti-A, anti-B, ale na povrchu erytrocytů je absence aglutinogenů. V případě výskytu stejných aglutinogenů a aglutininů dojde k navázání protilátky na antigen. Výsledkem této reakce Ag-Ab je vznik hemolytické reakce [1; 3].

Výskyt krevní skupiny AB0 systému u osob je dán geneticky. Na devátém chromozomu se nacházejí geny AB0 systému. Alely se dědí od obou rodičů, které jsou odlišné v dominantnosti a recesivitě. Dominantní alela potlačuje projev znaku recesivní alely. Alely A, B jsou dominantní vůči alele krevní skupiny 0, která je recesivní. Krevní skupina AB se vyznačuje kodominancí. Kodominance je jev, kdy dochází k projevu alely A a zároveň alely B. V systému AB0 jsou varianty šesti genotypů (AA, A0, BB, B0, AB, 00). Výskyt jednotlivých variant

genotypů u krevních skupin AB0 systému je podrobněji zobrazeno v tabulce 1. Vzácně se může vyskytovat genotyp hh, který se vyznačuje absencí aglutinogenu H. Jeho absencí se nepřipojují cukerné zbytky na prekurzor H a tím nedochází k tvorbě aglutinogenů A, B. Tento jev se označuje jako Bombay fenotyp. V závislosti na genotypu vznikají čtyři fenotypy, kdy se projeví určitý znak genu (A, B, AB, 0) [1; 3].

### 3.1.2 Rh systém

Rh systém byl dle literatury objeven Karlem Landsteinerem v roce 1940. Systém je pojmenován podle opice Makak rhesus. Karl Landsteiner ve svém experimentu imunizoval králičí sérum opičímí erytrocyty a následně v séru došlo k tvorbě protilátky proti erytrocytárnímu antigenu opice [1; 3].

V Rh systému bylo dle klasifikace International Society of Blood Transfusion (ISBT) dosud zjištěno přes 50 antigenů. Nejvýznamnějšími antigeny systému jsou D, C, c, E, e. Z hlediska transfuzního lékařství je antigen D zásadní, jelikož má velmi silnou schopnost imunogenicity [1; 4].

Protilátky v Rh systému se označují jako nepravidelné aglutininy. Tyto aglutininy se v plazmě od narození nevyskytují, k jejich tvorbě dochází po předchozí imunizaci. Podněty pro imunizaci jsou nejčastěji podání transfuze inkompatibilní krve s Rh faktorem, porod nebo potrat. Aglutininy Rh systému jsou typem IgG protilátek. Tento typ protilátek má schopnost procházet placentou. Dále mohou způsobit HON převážně protilátkami anti-D, anti-c nebo hemolytickou potransfúzní reakci (HTR) pozdního typu [1; 2].

Antigen D se vyskytuje ve formě antigenních determinant na proteinu RhD. Osoby, u kterých se detekuje antigen D označujeme jako RhD pozitivní. Označení RhD negativní je u osob, které mají místo proteinu RhD protein RhCcEe. Proteiny

se od sebe odlišují v 30-35 aminokyselinách. Tvorbu antigenů Rh systému dále ovlivňuje přítomnost dvou genů, které se nacházejí na prvním chromozomu. Jedná se o gen RHD, který vyjadřuje antigen D a gen RHC vyjadřující ostatní antigeny C, c, E, e. Při mutaci některého z genů dochází ke vzniku dvou atypických forem antigenu D. Tyto formy se nazývají slabý antigen D ( $D^{\text{weak}}$ ) nebo variantní antigen D ( $D^{\text{variant}}$ ).  $D^{\text{weak}}$  se od normálního antigenu D odlišuje kvantitativně. Má tedy všechny D epitopy, ale jejich exprese je slabá. Osoby  $D^{\text{weak}}$  jsou schopny slabé imunizace, a proto mají malé riziko tvorby protilátek anti-D.  $D^{\text{variant}}$  se odlišuje kvalitativně od antigenu D. Hlavní rozdíl mezi  $D^{\text{variant}}$  a  $D^{\text{weak}}$  je v počtu epitopů, kdy  $D^{\text{variant}}$  má absenci jednoho nebo více D epitopů. Osoby s tímto antigenem mohou po kontaktu s normálním antigenem D tvořit protilátky anti-D. Výskyt těchto mutací je většinou vzácný. Z celkového počtu RhD negativních osob podléhá imunizaci přibližně 75 %, aby se při podání transfuzního přípravku vyvarovalo následné imunizaci měla by být transfundovaná RhD negativní krev [3; 4].

### 3.1.3 Ostatní krevně skupinové systémy

Po objevení systémů AB0 a Rh byly popsány další systémy například MNS, Kell, Duffy, Lewis, Lutheran, Kidd a další. Některé krevně skupinové systémy způsobují těžké formy HTR nebo HON [1].

Antigenní struktura systému MNS je glykoproteinová s kyselinou sialovou. Nejčastěji zastoupené antigeny v systému jsou M, N, S, s, U. Vyskytují se fenotypové kombinace M+N+, M+N-, M-N+, S+s+, S+s-, S-s+. Mezi přirozené protilátky se obvykle zařazují anti-M a anti-N. Tyto protilátky na rozdíl od anti-S, anti-s jen vzácně způsobují HTR nebo HON [2; 3].

Systém Kell obsahuje 27 antigenů a každý antigen má své číselné označení (KEL1-KEL27). Výskyt genu Kell systému nalézáme na sedmém chromozomu. Po



antigenů D mají druhou nejsilnější imunitní odpověď. Nejvýznamnějšími antigeny systému jsou K a k. Jejich antigenní struktura je glykoproteinová. Antigen K (KEL1) je v literatuře také označován jako Kel. Jeho zastoupení v kavkazské populaci se pohybuje kolem 9 %. Výskyt u Afričanů, Asiatů a Indů je vzácný. Procentuální zastoupení antigenů K u Afričanů se pohybuje kolem 1,5 %. Protilátky anti-K způsobují těžké formy HTR a HON. Antigen K při HON nezpůsobuje pouze hemolýzu, ale i potlačuje v kostní dřeni erytropoézu. Při podání transfuze je třeba dívkám a mladým ženám podávat krevní přípravky bez přítomnosti antigenů K, tím lze zabránit tvorbě velmi imunogenních anti-K. Největší zastoupení 91 % v populaci má antigen k (KEL2). V literatuře se také setkáváme s názvem Cellano. Dále jsou v systému zastoupeny antigeny Kp<sup>a</sup>, Kp<sup>b</sup>, Js<sup>a</sup>, Js<sup>b</sup> a další [3; 5].

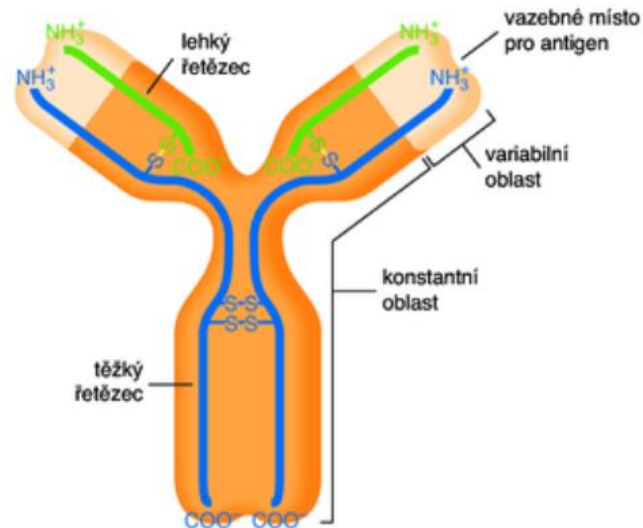
## **3.2 Imunitní reakce při HON**

Imunitní systém má velmi důležitou úlohu v lidském organismu. V rámci jeho fyziologického fungování rozeznává látky tělu cizí. Látky, které vyhodnotí jako cizí následně příslušnými mechanismy odstraňuje. Imunitní systém se dělí na dvě složky. Na přirozenou a adaptivní. Přirozená imunita spouští ochranné mechanismy před cizími antigeny již při prvním kontaktu. Dále se dělí na vrozenou a nespecifickou. Mechanismy adaptivní imunity zahájí obrannou reakci až po setkání s cizím antigenem. Dělí se na získanou a specifickou [6].

### **3.2.1 Imunoglobuliny**

Protilátky mají stavbu imunoglobulinu (Ig). Ig tvar připomíná písmeno Y, jehož skelet tvoří čtyři řetězce. Jak je uvedeno na obrázku 2 jedná se o dva shodné těžké řetězce a dva shodné lehké řetězce. Imunoglobulinové řetězce jsou spojeny disulfidickou vazbou a vnitřní řetězce jsou také navzájem propojeny disulfidickými vazbami. Vnitro řetězcové vazby napomáhají vzniku domén, kdy

lehké řetězce mají variabilní a konstantní domény. Konstantní domény mají schopnost aktivovat komplement. V místě variabilních domén se nachází vazebná místa pro antigen [7].



Obrázek 2- Stavba IgG [8]

Imunoglobuliny se rozdělují do pěti tříd: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. Zastoupení při HON má převážně IgG a IgM. IgM je největší imunoglobulin, jelikož má stavbu pentameru. Jeho velikost je důvod, proč nemá schopnost procházet přes placentu. IgG, který má stavbu monomeru je mnohem menší než IgM [7; 9].

### 3.2.2 Imunitní odpověď

Imunitní systém matky po kontaktu s inkompatibilními erytrocyty plodu spustí obranné mechanismy. Antigen prezentující buňky (APC) se navážou na cizí erytrocytární antigen. Mezi APC se řadí dendritické a monocytomakrofágové buňky. T a B lymfocytům jsou prezentovány cizí antigeny pomocí APC. Část cizích erytrocytů je odstraněna pomocí makrofágů a z další části se tvoří paměťové buňky. Tyto paměťové buňky se uplatňují při dalším kontaktu s cizím antigenem během dalších těhotenství mají rychlejší reakci. Po prezenci APC se T lymfocyt přeměňuje na plazmatické buňky, které mají schopnost tvořit

protilátky. Jako první se tvoří protilátky IgM, jedná se o primární odpověď. Následuje sekundární odpověď, při které dochází k tvorbě IgG a to převážně podtříd IgG1, IgG3. Tvorba protilátek IgG oproti IgM trvá déle. Během prvního těhotenství se IgG nestačí dotvořit ve velkém množství. Malé množství IgG během prvního těhotenství ve většině případů nezpůsobují závažný průběh HON, ale vytvořené protilátky se uplatňují až při dalším těhotenství [9].

### **3.2.3 Eliminace inkompatibilních erytrocytů plodu**

Odstraňování cizího antigenu působením specifických protilátek probíhá reakcí II. typu, která se označuje cytotoxická. Specifické protilátky jsou třídy IgG. Protilátky obecně nemají schopnost přímo ničit cizí antigeny, ale s erytrocytárními antigeny plodu vytvoří komplex Ag-Ab. Pomocí protilátky dojde k opsonizaci Ag-Ab. Opsonizace je jev, kdy se látka označí a příslušné buňky ji zničí. Na odstranění cizího antigenu se podílejí mechanismy: fagocytóza, aktivace komplementu, opsonizace komplementem [9].

Fagocytóza je proces navázání fagocytujících buněk na opsonizovanou buňku. Po navázání ji fagocytující buňky adsorbují a následně zničí. Buňky uplatňující se při fagocytóze jsou monocyty a makrofágy. Ničení erytrocytů probíhá hlavně ve slezině. Při zničení erytrocytu se uvolňuje hemoglobin, který se následně přeměňuje na bilirubin [9].

Komplement se skládá ze sérových a membránových proteinů. Složky komplementu se značí jako C1-C9. IgG1 a IgG3 mají schopnost aktivovat komplement. Podmínkou pro aktivaci je přítomnost velkého množství protilátek. IgG je malá molekula s málo Fc vazebnými místy, C1 pro svoji aktivaci potřebuje nejméně dvě Fc oblasti. Po vzniku imunokomplexu Ag-Ab se na Fc část protilátky naváže C1 složka komplementu. Následně se spouští řada mechanismů až do C9. Jedná se o ničení cizí buňky pomocí aktivace

komplementu klasickou cestou, kdy nastane rozpad erytrocytu. Aktivace komplementu klasickou cestou vzniká převážně u AB0 inkompatibility. Při tomto obranném mechanismu vzniká riziko intravaskulární hemolýzy. Během těhotenství je ve většině případů lehký průběh intravaskulární hemolýzy. Důvodem je nízká koncentrace inkompatibilních erytrocytů v krevním řečišti matky [9].

Oponizace komplementem neprobíhá do C9 jako tomu je při aktivaci komplementu klasickou cestou. Aktivace probíhá do fáze složky C3. Imunokomplex Ag-Ab se přemístí do jater, zde se na Ag-Ab naváže makrofág. Vazbu makrofágu na imunokomplex zajišťuje C3b složka komplementu. Makrofág následně adsorbuje a ničí tento imunokomplex. K likvidaci Ag-Ab dochází v játrech [9].

### **3.3 Rozdělení HON**

HON je patologický stav plodu nebo novorozence. Jako další označení pro HON se také používá hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN). Při HON dochází k neslučitelnosti mezi antigeny plodu a matky. Ve většině případů se tento patologický stav vyskytuje během druhého těhotenství matky. HON se rozděluje dle protilátky krevně skupinového systému, která způsobila aloimunizaci. Dělíme na HON při inkompatibilitě systému AB0, Rh a ostatních systémů jako je například Kell. Průběh závisí na množství protilátky a stáří plodu. Ve vážných případech dochází k úmrtí plodu [3; 4].

Může nastat situace, kdy plod zdědí antigeny po otci. Během třetího trimestru těhotenství erytrocyty plodu proniknou do matčina krevního oběhu. Průnik erytrocytů je přes placentu, tento proces se nazývá fetomaternální krvácení (Fetomaternal hemorrhage FMH). Matčin imunitní systém při inkompatibilitě vyhodnotí antigeny plodu jako cizí. Matka si začne tvořit protilátky proti

antigenům plodu, jedná se o aloimunizaci. Erytrocytární aloimunizace je imunologický stav, kdy imunitní reakcí dochází k tvorbě protilátek proti cizímu erytrocytárnímu antigenu. Transport vytvořených protilátek k plodu je umožněn placentárními receptory (FcRn) [3; 4].

Reakce matčiných protilátek s antigeny plodu způsobí předčasný rozpad erytrocytů plodu, které jsou ve slezině fagocytovány pomocí monocytomakrofágového systému (MMS). Následně dojde k hemolýze erytrocytů. Během hemolýzy je vysoký výskyt nekonjugovaného bilirubinu. Játra novorozence po narození nezvládají konjugovat bilirubin, který byl v průběhu těhotenství konjugován játry matky. Vysoká koncentrace nekonjugovaného bilirubinu může na novorozenci zanechat následky, které jsou popsány v kapitole 3.6 Klinický obraz HON [3; 4].

Tabulka 2- Nejčastější protilátky způsobující HON [4]

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <b>Klinicky významné protilátky</b>   | -D, -c, -K, -E, -C, -e, -Ce, -cE, -Fy <sup>a</sup> , -Jk <sup>a</sup> , -A, -B a další     |
| <b>Klinicky nevýznamné protilátky</b> | -P <sub>1</sub> , -Le <sup>a</sup> , -Le <sup>b</sup> , -H, -I, -HI, -N, -Lutheran a další |

### 3.3.1 AB0 inkompatibilita

HON v AB0 inkompatibilitě je jeden z nejvíce zastoupených typů. Nejčastěji se tento typ HON vyskytuje u matky s krevní skupinou 0, která má protilátky anti-A, anti-B. Plod s krevní skupinou A nebo B nemá přítomny obě stejné protilátky jako matka. Matčiny protilátky anti-A, anti-B k plodu prochází placentou. Nejčastěji se při AB0 inkompatibilitě vyskytuje u plodu krevní skupina A. Pokud má plod krevní skupinu A, matka krevní skupinu 0 dochází k reakci antigenu A plodu a protilátky od matky anti-A. K podobnému mechanismu by docházelo, kdyby plod měl krevní skupinu B a matka krevní skupinu 0. K HON AB0 inkompatibility může dojít již během prvního

těhotenství. Na projevu onemocnění nezáleží na počtu těhotenství, to je jedna z odlišností s Rh inkompatibilitou. Typický projev HON v AB0 inkompatibilitě je vznik novorozenecké žloutenky. Žloutenka se u novorozence objevuje do 24 hodin po porodu. HON AB0 inkompatibility má většinou mírný průběh, který je snadno léčitelný [3; 4].

### **3.3.2 Rh inkompatibilita**

Tento typ HON je způsobený převážně protilátkami anti-D, anti-D+C, anti-D+E. V průběhu prvního těhotenství matka s RhD negativním faktorem je aloimunizovaná erytrocyty plodu. Plod zdědil pozitivní RhD faktor po otci. Ve třetím měsíci prvního těhotenství dojde k FMH. Matčin imunitní systém vyhodnotí RhD pozitivní erytrocyty plodu jako cizí a spustí se obranný mechanismus tvorbou protilátek anti-D. Vytvořené protilátky jsou třídy IgG [4].

Není pravidlem, že při každé inkompatibilitě RhD negativní matky a RhD pozitivního plodu vždy dochází k aloimunizaci matky. K aloimunizaci nemusí dojít při nízkém počtu proniklých erytrocytů plodu do matčina krevního oběhu a dále při AB0 inkompatibilitě. V matčině krevním oběhu jsou erytrocyty plodu s antigeny D ničeny aglutininy AB0 systému. AB0 inkompatibilita může bránit projevu Rh aloimunizací matky [4].

V dalších těhotenstvích při inkompatibilitě RhD dochází při průniku RhD pozitivních erytrocytů k výraznější tvorbě protilátek anti-D. Jako prevence proti vzniku HON při RhD inkompatibilitě se ženám podává IgG anti-D. [4]

### **3.3.3 Inkompatibilita jiných krevně skupinových systémů**

Při HON způsobeným krevně skupinovým systémem Kell se častěji objevuje útlum erytropoézy v kostní dřeni. Protilátky anti-K působí na prekurzory erytropoézy nebo mohou způsobit destrukci prekurzorů. K aloimunizaci

většinou nedochází během těhotenství, jak tomu bylo v již zmíněných typech HON, ale v podání transfuzních přípravků Kell pozitivní. Ženám v období fertility je doporučeno z preventivního důvodu podávat transfuzní přípravek Kell negativní. Při tomto typu HON jsou často přítomny těžké anémie [3; 4].

### **3.4 Imunohematologické vyšetření těhotné ženy**

Během těhotenství se provádí řada laboratorních vyšetření. Můžeme je dělit na biochemická, hematologická, imunologická a další. Odběry pro hematologické vyšetření se provádějí do zkumavky s protisrážlivým činidlem obsahující kyselinu ethylendiamnintetraoctovou (EDTA) [10].

V České republice se na začátku těhotenství během 10.-16. týdne provádí laboratorní vyšetření krevně skupinového systému AB0 a screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Vyšetření se opakuje ke konci těhotenství, literatura udává rozmezí 26.-32. týden těhotenství [11].

#### **3.4.1 Vyšetření krevní skupiny AB0 systému a RhD**

Principem vyšetření krevně skupinového systému AB0 je přímá aglutinační reakce, která je viditelná pouhým okem. Aglutinogeny se vyšetřují komerčně dodávanými diagnostickými antiséry, kdy se používají minimálně dvě antiséra (anti-A, anti-B). Některé laboratoře využívají ještě třetí diagnostické antisérum anti-AB. Při stanovení aglutininů se využívají diagnostické erytrocyty A1 a B, také se mohou využít diagnostická erytrocyty 0. V případě výskytu aglutinace se makroskopicky hodnotí její stupně intenzity. Intenzita aglutinace se udává v rozmezí 0 až 4+ [12].

Ve většině případů se vyšetření antigenu D provádí zároveň s vyšetřením krevní skupiny AB0. Určení antigenu D je důležitý hlavně pro RhD negativní těhotné ženy, kterým může být profylakticky aplikován anti-D jako prevence

před HON. Stanovení opět využívá principu přímé aglutinační reakce. Při vyšetření antigenu D se využívají diagnostická monoklonální antiséra anti-D, které jsou třídy IgM. Používají se dvě diagnostická antiséra s různými klony protilátek a jedna kontrola. Vyšetřované erytrocyty, které se resuspendovaly v LISS-NAT (low ionic strength solution) se inkubují s diagnostickým antisérem. Inkubace probíhá při teplotě 37 °C. V případě positivity se protilátky z diagnostického séra navážou na antigen a dochází ke vzniku komplexu Ag-Ab. Antiglobulinum humanum (AGH) následně reaguje s navázanou protilátkou na antigen. Pozitivní výsledek má viditelnou aglutinaci u obou použitých diagnostických antisér. Výsledky jednotlivých krevních skupin AB0 systému a antigenu D jsou podrobněji znázorněny na obrázku 3. V případě odlišného výsledku mezi diagnostickými antiséry (pozitivní/negativní), rozdílná intenzita reakce nebo při těžko detekovatelné aglutinaci se vyšetřuje  $D^{weak}$  nebo  $D^{variant}$ . Stanovení variant antigenu D se provádí nepřímým antiglobulinovým testem (NAT). Pro stanovení jsou potřeba dvě antiséra třídy IgG, pozitivní kontrola obsahující  $D^{weak}$  a negativní kontrola. Pokud pozitivně reaguje na variantu antigenu D alespoň jedno diagnostické sérum, těhotná žena se považuje za RhD pozitivní s variantou antigenu D [12; 13].



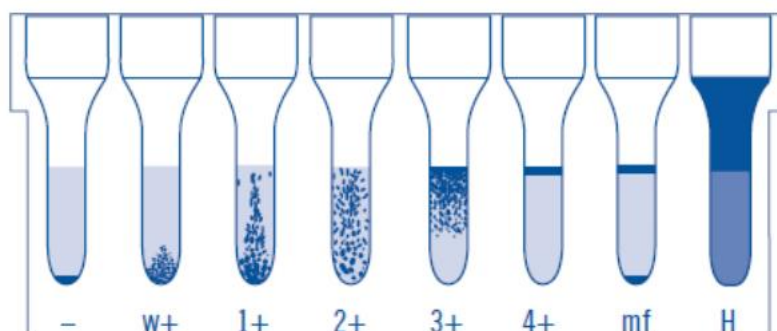
| Blood group | Anti-A | Anti-B | Anti-D | Control |
|-------------|--------|--------|--------|---------|
| A+          |        |        |        |         |
| A-          |        |        |        |         |
| B+          |        |        |        |         |
| B-          |        |        |        |         |
| AB+         |        |        |        |         |
| AB-         |        |        |        |         |
| O+          |        |        |        |         |
| O-          |        |        |        |         |
| Not valid   |        |        |        |         |

Obrázek 3 – Výsledky vyšetření krevních skupin AB0 systému a antigenu D [14]

Překlad k obrázku 3: Blood group (krevní skupina), Control (kontrola), Not valid (není platné).

Velmi často se v laboratorní praxi vyšetřuje krevní skupina metodou sloupcové gelové aglutinace. Komerčně dodávané plastové karty obsahují mikrozkušavky s 35 µl dextranakrylamidovým gelem ve kterých dochází k reakci mezi erytrocyty a antiséry. Možné výsledky sloupcové aglutinace znázorňuje obrázek 4. Na automatických analyzátoch se krevní skupina vyšetřuje v mikrotitračních destičkách, tento typ vyšetření je vhodný pro zařízení s velkým počtem vzorků na vyšetření. Dříve se v laboratořích využívalo

vyšetření ve zkumavkách, kdy se výsledná aglutinace hodnotila makroskopicky pod světlem. Od této metody se dnes již ustupuje [12].



Obrázek 4 - Vyhodnocení sloupcové gelové aglutinace [15]

Popis obrázku 4: – Negativita, W+ malé viditelné shluky aglutinovaných buněk a dolní část s peletou neaglutinovaných buněk, 1+ malé shluky aglutinovaných buněk v dolní části kolony, 2+ malé a střední shluky aglutinovaných buněk v celé koloně, 3+ střední shluky aglutinovaných buněk v horní části kolony, 4+ pruh aglutinovaných buněk v horní části kolony, mf dvojitá populace, H hemolýza

### 3.4.2 Nepřímý antiglobulinový test

NAT je v literaturách uváděn také jako nepřímý Coombsův test. NAT detekuje volné protilátky přítomné v plazmě. Tento test má využití nejenom v imunohematologickém vyšetření těhotné ženy, ale i při testování kompatibility krevních přípravků před jejich vydáním pacientovi. Princip stanovení NAT spočívá v inkubaci stanovovaných erytrocytů a diagnostického AGH séra při teplotě 37 °C. Pokud jsou přítomny na stanovovaných erytrocytech hledané antigeny, které reagují s diagnostickým AGH sérem dochází k aglutinaci. Aglutinace značí pozitivitu vyšetření [12; 16].

### 3.4.3 Screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek

Screeningem nepravidelných protilátek se můžou stanovit klinicky významné protilátky způsobující HON. Vyšetření využívá metody NAT. Používá se pacientova plazma nebo sérum a tři panely diagnostických erytrocytů. Diagnostické erytrocyty musí minimálně obsahovat antigeny C, Cw, c, D, E, e, K, k, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, S, s, M, N, Le<sup>a</sup>. Pacientova plazma nebo sérum se inkubuje s diagnostickými erytrocyty při teplotě 37 °C. Při vyšetření je možnost použití enzymového testu, který je doplňkový a umožňuje stanovit IgG i IgM. Enzymový test např. u krevně skupinových systémů Rh a Kell zvyšuje intenzitu reakce protilátek. V případě pozitivního výsledku se následně provádí identifikace nepravidelných protilátek [12; 17].

Při identifikaci protilátek se využívá stejné metody, která byla využita při screeningu. Používají se certifikované identifikační panely diagnostických erytrocytů se zastoupením fenotypů DCe/DCe, DcE/DcE, D negativní. Tyto identifikační panely by měly mít schopnost určit klinicky významné protilátky také ve směsi (např. anti-D+C). V případě nízké protilátkové reaktivity v NAT nebo při výskytu směsi protilátek je možnost využití diagnostických erytrocytů, které jsou enzymaticky upravené [13].

V České republice je ročně laboratorně diagnostikováno přes 15 000 RhD negativních těhotných žen. Pozitivní výsledek screeningu nepravidelných protilátek dle literatury má více než 5 000 těhotných žen za rok [18].

### 3.4.4 Titrační vyšetření

Titrační vyšetření se provádí při pozitivním screeningu nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Jedná se o kvantitativní stanovení aloprotilátek, kdy titr je ukazatelem rizika aloimunizace těhotné ženy. Vyšetření sloupcovou

aglutinací je přesnější než zkumavkovou metodou, proto se používá častěji [17; 19].

Hodnoty výsledného titru aloprotilátek se posuzují dle metody provedení a typem aloprotilátky. Při vyhodnocování se zohledňuje, zda u opakovaného těhotenství má žena zaznamenané předchozí výsledky titračního vyšetření. Hodnoty titračních vyšetření, které jsou dle literatury již na hraně referenčního rozmezí jsou zaznamenané v tabulce 3. Pokud je první zachycený titr menší nebo roven 8 je těhotná žena sledovaná a dochází na kontrolu jednou za čtyři týdny. Výsledný vysoký titr nebo také nazýván kritický titr těhotné ženy ukazuje na riziko těžké formy HON nebo hydrops. Výsledek titrace antigenu K je specifický v tom, že již při nízkých hodnotách může způsobit těžkou formu HON. Kritická hodnota titru antigenu K je udávána již při výsledku 4, naopak antigen E i při vysokých hodnotách titrace nemusí způsobit HON [17; 19].

Tabulka 3 – Kritické titry aloprotilátek [17]

| Aloprotilátka          | Kritický titr sloupcové aglutinace | Kritický titr zkumavkové metody |
|------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| anti-D, anti-C, anti-E | ≥ 1:128                            | ≥ 1:32                          |
| ostatní                | ≥ 1:128                            | ≥ 1:64                          |

### 3.5 Imunohematologické vyšetření novorozence

U novorozenců se odběr krve se provádí z prstu nebo patičky. Nejčastěji se odběr provádí z laterální a mediální části chodidla nebo patičky. Je možnost odebírat pupečnickovou krev, ze které lze stanovit krevní skupinu AB0 a RhD. Krev pupečnicku obsahuje Whartonův rosol, který může při vyšetření způsobovat falešnou aglutinaci erytrocytů. Odběr plazmy nebo séra novorozence se provádí do odběrového systému mikrotaineru, jeho kapacita je 600 µl. Jako u většiny hematologických vyšetření se jako antikoagulační činidlo většinou používá EDTA [12; 13].

### **3.5.1 Přímý antiglobulinový test**

Přímý antiglobulinový test zkráceně PAT je metoda vyšetřující erythrocyty, které mají na svém povrchu navázanou protilátku nebo komplement. V praxi se nejčastěji na stanovení používá gelová aglutinace. Vyšetřované sérum se promyje, aby se protilátky, které nejsou navázané na erythrocytech neudávaly falešně negativní výsledek. Jako promývací roztok se nejčastěji používá 0,9% fyziologický roztok. Principem metody PAT je reakce stanovovaných erythrocytů s diagnostickým AGH sérem. V případě výskytu erythrocytů s navázanou protilátkou nebo komplementem dochází k reakci s diagnostickým AGH sérem a následně k aglutinaci [12].

### **3.5.2 Vyšetření AB0 skupiny**

Novorozencům se stanovují antigeny krevně skupinového systému AB0. Aglutininy AB0 systému (anti-A, anti-B) novorozence se nevyšetřují. Jak již bylo zmíněno v první kapitole jejich tvorba začíná během 2.-8. měsíce života. Z toho důvodu se pomocí diagnostických sér opakuje vyšetření aglutinogenů pro ověření jejich správné detekce. Pokud je třeba vyšetřit novorozenci protilátky při podezření na HON ještě před jejich počátkem tvorby, vyšetřují se protilátky z plazmy nebo séra matky [13].

## **3.6 Klinický obraz HON**

Na základě klinického průběhu HON se odvíjí případné postižení plodu nebo novorozence. Projev klinického obrazu záleží na několika faktorech např. staří novorozence, typu a koncentraci protilátky, která způsobila HON. Některé klinické stavy mohou být pro plod nebo novorozence fatální. Ve většině případů je hydrops fetalis pro plod smrtelný. Mezi hlavní příznaky HON se řadí novorozenecká anémie (časná, pozdní) a novorozenecký icterus, který se při výskytu onemocnění projevuje nejčastěji [19; 20].

### 3.6.1 Novorozenecká anémie

Novorozenecká anémie se dělí na časnou a pozdní. Vznik časné anémie je způsoben protilátkami od matky, které se vyskytují v krevním řečišti novorozence. Tyto aloprotilátky i po porodu způsobují nadále hemolýzu erytrocytů [19].

Pozdní anémie nejčastěji vzniká po podávaných transfuzích a následně dochází k potlačení erythropoézy. Velmi často se při laboratorním vyšetření pozdní anémie nachází snížené hladiny retikulocytů a erythropoetinu. Při aloimunizaci novorozence antigenem RhD může být výskyt pozdní anémie umožněn několika způsoby. První způsob může být pomocí protilátky anti-D, která působí na prekurzory erytrocytů v kostní dřeni. Působením protilátky anti-D dochází k následnému zničení prekurzorů. Další způsob vzniku anémie je opět v účinku anti-D, ale tentokrát dochází k ničení nezralých forem erytrocytů neboli retikulocytů. A v posledním způsobu dochází k vylučování nízkého množství hormonu erythropoetinu, který je důležitý pro tvorbu erytrocytů. Při terapii pozdní anémie se podávají transfuzní přípravky, které jsou resuspendované a ozářené [19].

Těžká anémie je velmi vážná forma HON. Při této anémii hemoglobin novorozence dosahuje hodnot 50-100 g/l. Mezi těžkou anémií se řadí hydrops fetalis. Při hydropsu dochází k nedostatečnému okysličování tkání plodu, hypoproteinemii, hromadění tělní tekutin v dutinách a následné selhávání srdce. Tento stav často vede k úmrtí plodu [20].

### 3.6.2 Novorozenecký ikterus

Novorozenecký ikterus (icterus neonatorum) je stav, který se projevuje zvýšenou koncentrací bilirubinu neboli hyperbilirubinemií. Při rozpadu erytrocytu se uvolňuje hem, který je katabolizován pomocí enzymu

hemoxigenázy a výsledkem této reakce je CO a biliverdin. Biliverdin je následně redukován enzymem biliverdin reduktázou na bilirubin [20; 21].

Fyziologický ikterus se objevuje nejdříve den po porodu a jeho vrchol dosahuje během třetího a čtvrtého dne života. Poté sám ustupuje. Hladina bilirubinu se během prvních čtyřech dnů života novorozence pohybuje okolo 200-300  $\mu\text{mol/l}$ . Pokud se ikterus odlišuje od fyziologického průběhu jedná se o patologický ikterus. Nejčastěji se jedná o ikterus způsobený inkompatibilitou AB0 nebo RhD krevně skupinového systému. Zde se sleduje hodnota koncentrace bilirubinu stanoveného v krvi, ale i stáří novorozence. Rychlejší vzestup koncentrace bilirubinu signalizuje závažnější riziko pro novorozence. Při klinických příznacích ikteru dochází u kůže, sliznic a sklér ke zbarvení do žluta [22].

Při vyšších hodnotách je novorozenec vystaven riziku jádrového ikteru. Při tomto typu ikteru dochází k vážnému poškození mozku a následnému úmrtí. V případě, že novorozenec jádrový ikterus přežije má neurologické následky. Výskyt jádrového ikteru v České republice je výjimečný z důvodů zavedených preventivních opatřeních jako je sledování novorozence na specializovaných odděleních nejméně po dobu tří dnů [22].

## **3.7 Prevence HON**

### **3.7.1 Anti-D imunoglobulin**

Preventivně se protilátka anti-D třídy IgG podává těhotným ženám, u kterých nebyly detekovány žádné protilátky anti-D. Dávka imunoglobuliny závisí na období, v jakém trimestru se těhotná žena nachází. Minimální dávka období do 20. týdnu gravidity je 50  $\mu\text{g}$  a po 20. týdnu gravidity je 100  $\mu\text{g}$  imunoglobulinu

anti-D. Po 20. týdnu gravidity se zároveň doporučuje pro specifikaci množství dávky vyšetřit objem FMH [23].

V prvním trimestru se imunoglobulin většinou podává při umělém nebo přirozeném ukončení těhotenství, po operativním zákroku k ukončení mimoděložního těhotenství a další. Těhotné ženě stačí menší dávka a to 50 µg anti-D imunoglobulinu. Ve druhém a třetím trimestru se aplikuje dávka dvakrát vyšší než v prvním trimestru a to 100 µg. Dávka se podává po prenatálních diagnostických výkonech jako je aminocentéza nebo kordocentéza. Dále se podává při poporodním krvácení, po odumření plodu intrauterinně, poranění v oblasti břicha nebo po umělém potratu. Stejná dávka jako během druhého a třetího trimestru se také podává po porodu RhD pozitivního novorozence. Dávka 250 µg imunoglobulinu anti-D se podává během 28. týdne gravidity jako předporodní profylaxe. Anti-D imunoglobulin by měl být ženě aplikován co nejdříve. Nejpozději se ženě imunoglobulin aplikuje do 72 hodin po již zmíněných příkladech stavů. Pokud se imunoglobulin nestihne podat do 72 hodin je možnost ho podat do 13 dnů od uplynutí události při které dochází k senzibilizaci antigenem RhD. Ve výjimečných situacích se doporučuje po 28 dnech od porodu podat další dávku imunoglobulinu [23].

### **3.7.2 Erytrocyty Kell negativní**

Kell negativní žena se může imunizovat pouze po podané Kell pozitivní krevní transfuzi nebo díky přenosu Kell pozitivních erytrocytů plodu přes placentu. Ročně je v České republice během screeningu nepravidelných antierytrocytárních protilátek stanovena klinicky významná protilátka anti-K přibližně u 100 těhotných žen. Pokud má plod přítomné komplementární antigen na povrchu svých erytrocytů, tak je plod ohrožen HON. Komplementární antigen se stanovuje pomocí KEL genotypu. Přibližně u 95 plodů se nachází tento komplementární antigen. Protilátka anti-k je během screeningu nepravidelných



antierytrocytárních protilátek stanovena přibližně u 10 těhotných žen a u 9 plodů je stanoven komplementární antigen. Hlavní prevence proti vzniku HON způsobený Kell systémem je v podávání Kell negativních krevních přípravků během transfuze ženám v reprodukčním stádiu, kterým nebyly detekovány anti-k protilátky [24].

## 4 METODIKA

### 4.1 Reagencie

- Serigrup Diana A<sub>1</sub>/B (výrobce Grifols)
- DG Gel Sol (výrobce Grifols)
- Karta DG Gel AB<sub>0</sub>/Rh (výrobce Grifols)
- 0,9% NaCl (výrobce Baxter)
- Referencells A<sub>1</sub>, B (výrobce Immucor)
- Anti-A, anti-B (výrobce ImuMed)
- Anti-D IgM RUM1, anti-D IgM P3x61 (výrobce ImuMed)
- Control solution (výrobce ImuMed)
- ID-karta LISS/Coombs (výrobce Bio-Rad)
- ID-karta Neutral (výrobce Bio-Rad)
- ID-karta Reverse grouping with antibody screening (výrobce Bio-Rad)
- ID-diluent 2 (LISS) (výrobce Bio-Rad)
- ID-diluent 1 (bromelin) (výrobce Bio-Rad)
- Screeningové erytrocyty DiaCell I-II-III (výrobce Bio-Rad)
- Identisera Diana (výrobce Grifols)
- Identisera Diana P (výrobce Grifols)
- Identisera Diana Extend (výrobce Grifols)
- Identisera Diana Extend P (výrobce Grifols)
- DG Gel Coombs (výrobce Grifols)
- DG Gel Neutral (výrobce Grifols)
- DG Gel Neutral/Coombs (výrobce Grifols)
- Anti-C, c, E, e, C<sup>w</sup> (výrobce ImuMed)
- Karta DG Gel Rh Pheno+Kell
- Karta DG Gel Newborn (výrobce Grifols)
- ID-karta DAT IgG – Dilution (výrobce Bio-Rad)

## 4.2 Přístrojové vybavení a materiál

- Centrifuga Rotanta 460R
- Centrifuga DG Spin
- Promývací centrifuga Rotolavit
- Centrifuga MPV
- ID-centrifuga 24S
- Inkubátor DG Therm
- Automatické pipety a plastové pipetovací špičky
- Laboratorní stojan
- Plastové zkumavky
- Venózní krev, pupečnicková krev

## 4.3 Odběr biologického materiálu

Krev pacienta se odebírá převážně do odběrových systémů Vacuette K<sub>3</sub>EDTA, Serum 2 ml. Dále je možné využít odběrových systémů obsahující protisrážlivá činidla EDTA, heparin, ACD, CPD, CPDA anebo bez protisrážlivého činidla [25].

## 4.4 Vyšetření krevní skupiny AB0 Rh(D)

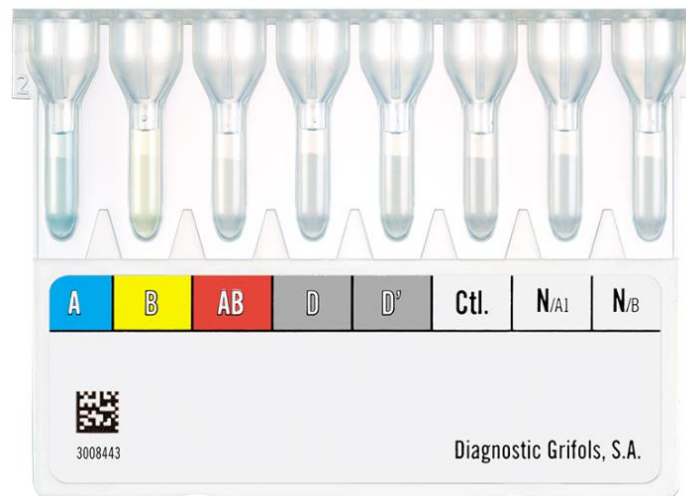
### 4.4.1 Sloupcová aglutinace DG Gel

#### Popis metody

Karta DG Gel obsahuje osm mikrozkušavek, ve kterých je gel se specifickými protilátkami. V případě reakce mezi vyšetřovanými erytrocyty a protilátkami, které jsou přítomny v gelu dochází k aglutinaci. Aglutinované erytrocyty se během centrifugace zachytávají v gelovém sloupci dle síly reakce. Na dnu zkumavky se zachytávají neaglutinované erytrocyty [25].

## Pracovní postup

Přijatý a zkontrolovaný krevní vzorek se vloží do centrifugy Rotanta 460 R na 3000 ot/min po dobu 5 minut. Oddělí se erythrocyty od séra nebo plazmy. Kartou DG Gel popíšeme jménem vyšetřovaného pacienta a odstraníme ochrannou fólii karty. Do nové a čisté zkumavky si připravíme 5% suspenzi vyšetřovaných pacientových erythrocytů v diluentu DG Gel Sol. Napipetuje se 50  $\mu$ l sedimentu pacientových erythrocytů a 1 ml diluentu. Do označených mikrozkuvek A, B, AB, D, D', Ctl se napipetuje 10  $\mu$ l připravené 5% suspenze pacientových erythrocytů. Do mikrozkuvky N/A<sub>1</sub>, N/B napipetujeme 50  $\mu$ l vyšetřované plazmy nebo séra a 50  $\mu$ l diagnostických erythrocytů A<sub>1</sub> a B. Napipetovaná karta DG Gel se centrifuguje v DG Spin. Po centrifugaci se karta DG Gel odečítá proti světlu výsledek, který se udává v rozsahu negativní až pozitivní [25].



Obrázek 5- Karta DG Gel AB0/Rh (Grifols) [26]

### 4.4.2 Zkumavková metoda

#### Popis metody

Princip metody spočívá ve stanovení neznámých aglutinogenů na vyšetřovaných erythrocytech pomocí známých antisér. Pro vyšetření neznámých aglutininů v pacientově séru se používají známé aglutinogeny na typových A<sub>1</sub> a

B erythrocytech. Známými antiséry anti-D se duplicitně stanovuje antigen D na vyšetřovaných erythrocytech [27].

### **Pracovní postup**

Přijatý a zkontrolovaný krevní vzorek se vloží do centrifugy Rotanta 460 R na 3000 ot/min po dobu 5 minut. Oddělí se erythrocyty od séra nebo plazmy. Do laboratorního stojanu se vloží označené zkumavky pro vyšetření aglutinogenů A, B (přední řady), pro vyšetření aglutininů A<sub>1</sub>, B (zadní řady) a vyšetření Rh(D) IgM RUM1, IgM P3x61, Ctl. Do zkumavek pro vyšetření aglutinogenů se nakape pomocí Pasteurovy pipety 1 kapka anti-A, anti-B. Do zkumavek pro vyšetření aglutininů se nakapou dvě kapky vyšetřovaného séra pacienta. Do zkumavek na vyšetření Rh(D) se kape po jedné kapce IgM RUM1, IgM P3x61, Ctl. V plastové zkumavce se připraví 5% suspenze erythrocytů vyšetřovaných erythrocytů pacienta v 0,9% NaCl. Suspenze se jedenkrát propere v 0,9% NaCl. Do každé zkumavky na vyšetření aglutinogenů a Rh se přidá 1 kapka 5% suspenze erythrocytů. Do zkumavek na vyšetření aglutininů se přidá 1 kapka diagnostických erythrocytů A<sub>1</sub> a B. Zkumavky se lehce promíchají a nechají se inkubovat po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci se zkumavky centrifugují po dobu 30 vteřin v promývací centrifuze. Poklepáním na dno zkumavky se odečítá výsledek v rozsahu negativní-pozitivní [27].

## **4.5 Screening antierythrocytárních protilátek – sloupcová aglutinace Bio-Rad**

### **Popis metody**

Screening antierythrocytárních protilátek ve vyšetřovaném séru pacienta využívá metody NAT. Zároveň se provádí enzymatický test, který umožní aglutinaci malého zastoupení protilátek. Aglutinované erythrocyty značí

pozitivitu reakce, kdy se inkompletní nepravidelné protilátky IgG navážou na povrch diagnostických erytrocytů. Umístění vytvořeného aglutinátu vyjadřuje sílu reakce. Erytrocyty, které neaglutinují sedimentují na dno mikrozkušavky [28].

### **Pracovní postup**

Krevní vzorek se vloží do centrifugy Rotanta 460 R na 3000 ot/min po dobu 5 minut. Oddělí se erytrocyty od séra nebo plazmy. ID-kartu Reverse grouping with antibody screening identifikujeme pacientem a vyznačíme číslicí screeningové erytrocyty. Do mikrozkušavek ID-karty dle čísel pipetujeme 50  $\mu$ l screeningových erytrocytů. Do všech mikrozkušavek pipetujeme po 25  $\mu$ l vyšetřovaného séra pacienta. Do mikrozkušavek ID-Neutral karty napipetujeme 25  $\mu$ l ID-diluentu. Do ID-inkubátoru se vloží napipetovaná ID-karta na 15 minut při 37°C. Po skončení inkubace se ID-karta centrifuguje v ID-centrifuze při 910 ot/min po dobu 10 minut. Pozitivita aglutinace se hodnotí semikvantitativně + až ++++ [28].

## **4.6 Identifikace antierytrocytárních protilátek – Grifols**

### **Popis metody**

Identifikací antierytrocytárních protilátek se stanovují neznámé protilátky ve vyšetřovaném séru pomocí známých aglutinogenů na typových erytrocytech [29].

### **Pracovní postup**

Přijatý a zkontrolovaný krevní vzorek se vloží do centrifugy Rotanta 460 R na 3000 ot/min po dobu 5 minut. Oddělí se erytrocyty od séra nebo plazmy. Na DG Gel kartě se 11 až 15 mikrozkušavek identifikuje pacientem a číslicí typových

erytrocytů. Do mikroskopavek se napipetuje 50  $\mu$ l 0,8% suspenze diagnostických erytrocytů a 25  $\mu$ l pacientova vyšetřovaného séra. DG Gel karta se inkubuje 15 minut při 37°C. Po inkubaci se karta centrifuguje v DG Spin. Pozitivita aglutinace se hodnotí semikvantitativně + až ++++ [29].

## **4.7 Vyšetření fenotypu**

### **4.7.1 V Rh systému - ImuMed**

#### **Popis metody**

Pokud erytrocyt nese odpovídající antigen dochází k aglutinaci, která znamená pozitivní výsledek vyšetření. Naopak nepřítomnost odpovídajícího antigenu nezpůsobuje aglutinace a dochází k negativnímu výsledku vyšetření. Kontrolní séra, která se používají při vyšetření neobsahují specifické protilátky jako diagnostická antiséra. Fenotyp v Rh systému uzavřít nelze pokud mají kontrolní séra jiný výsledek než negativní [30].

#### **Pracovní postup**

Krevní vzorek se vloží do centrifugy Rotanta 460 R na 3000 ot/min po dobu 5 minut. Oddělí se erytrocyty od séra nebo plazmy. Do laboratorního stojanu se připraví jedna plastová zkumavka a čtyři skleněné zkumavky, které jsou označené. Do plastové zkumavky se připraví 2-5% suspenze vyšetřovaných erytrocytů v 0,9% fyziologickém roztoku. Do každé skleněné zkumavky se přidá po jedné kapce 2-5% suspenze vyšetřovaných erytrocytů. Dále se do zkumavek přidá jedna kapka ImmuMed (C, c, E, e, C<sup>w</sup>, ctl). Inkubuje se při teplotě 15-30 °C po dobu 10 minut. Po inkubaci se zkumavky centrifugují při 1000 ot/min po dobu jedné minuty [30].

#### **4.7.2 Rh-Kell sloupcovou aglutinací**

##### **Popis metody**

Metoda má stejný princip stanovení jako v kapitole 4.7.2 V Rh systému – ImuMed.

##### **Pracovní postup**

Krevní vzorek se vloží do centrifugy Rotanta 460 R na 3000 ot/min po dobu 5 minut. Oddělí se erytrocyty od séra nebo plazmy. Připraví se 5% suspenze vyšetřovaných pacientových erytrocytů smícháním 50  $\mu$ l sedimentu erytrocytů a 1 ml diluentu DG Gel Sol. Do každé mikrozkušavky (D, C, Cw, c, E, e, K, Ctl) karty DG Gel se pipetuje po 10  $\mu$ l přichystané 5% suspenze erytrocytů. Karta se vloží do centrifugy DG Spin. Po centrifugaci se výsledek proti světlu odečítá [31].

#### **4.8 Titrace antierytrocytárních protilátek**

##### **Popis metody**

Titrací se geometrickou řadou zředí vyšetřované sérum. Titr příslušné antierytrocytární protilátky se vyjadřuje podle maximálně dosaženého zředění, při kterém ještě došlo k aglutinační reakci. Vyšetřením zjišťujeme aglutinační schopnost séra [32].

##### **Pracovní postup**

Krevní vzorek se vloží do centrifugy Rotanta 460 R na 3000 ot/min po dobu 5 minut. Oddělí se erytrocyty od séra nebo plazmy. Do všech zkumavek se napipetuje 200  $\mu$ l DG Gel Sol. Do první zkumavky se napipetuje 200  $\mu$ l vyšetřovaného séra a promíchá. Z první zkumavky se odpipetuje 200  $\mu$ l, které se



přenesou do druhé zkumavky. Opět se celý objem zkumavky promíchá a přenesou do další zkumavky. Pokračuje se tímto způsobem až na konec titrační řady. Z poslední zkumavky titrační řady se odebere 200 µl pacientova séra s DG Gel Sol do prázdné zkumavky. Do mikrozkušavek označené ID karty se napipetuje 50 µl 0,8% typových erytrocytů s antigenem proti titrované protilátce a 25 µl připraveného séra. ID karta se inkubuje při 37 °C po dobu 15 minut. Po skončení inkubace se ID karta cetrifuguje v centrifuze DG Spin po dobu 10 minut [32].

## **4.9 Vyšetření autoprotilátek v séru pacienta**

### **Popis metody**

V séru pacienta se autoprotilátky stanovují nepřímým antiglobulinovým testem a enzymatickým testem. Provádí se inkubace vyšetřovaného patientského séra s vlastními erytrocyty [33].

### **Pracovní postup nepřímého antiglobulinového testu**

Do mikrozkušavky ID karty LISS/Coombs se pipetuje 50 µl připravené 0,8% suspenze vyšetřovaných erytrocytů. Dále se napipetuje 25 µl séra nebo plazmy pacienta a inkubuje se při nastavené teplotě (37 °C, 18-25 °C, 2-8 °C) při 15 minutách. Po skončení inkubace se centrifuguje v centrifuze 24S [33].

### **Pracovní postup enzymatického testu**

Do mikrozkušavky ID karty Neutral se pipetuje 50 µl připravené 0,8% suspenze vyšetřovaných erytrocytů. Dále se napipetuje 25 µl séra nebo plazmy pacienta a 25 µl ID-Diluentu 1 (bromelin). Inkubuje se při nastavené teplotě (37 °C, 18-25 °C, 2-8 °C) po dobu 15 minut. Po skončení inkubace se centrifuguje v ID-centrifuze 24S [33].

## **4.10 Vyšetření krevní skupiny novorozence sloupcovou aglutinací DG Gel Newborn**

### **Popis metody**

Princip stanovení krevní skupiny novorozence sloupcovou aglutinací DG Gel Newborn je stejný jako v kapitole 4.4.1. Sloupcová aglutinace DG Gel.

### **Pracovní postup**

Přijatý a zkontrolovaný krevní vzorek se vloží do centrifugy Rotanta 460 R na 3000 ot/min po dobu 5 minut. Oddělí se erytrocyty od séra nebo plazmy. Do nové a čisté zkumavky si připravíme 1% suspenzi vyšetřovaných pacientových erytrocytů v diluentu DG Gel Sol. Napipetuje se 10  $\mu$ l sedimentu pacientových erytrocytů a 1 ml diluentu. Připravená 1% suspenze se pipetuje po 50  $\mu$ l do každé mikrozkušavky karty DG Gel Newborn. Napipetovaná karta DG Gel Newborn se centrifuguje v DG Spin. Po centrifugaci se karta DG Gel odečítá proti světlu výsledek, který se udává v rozsahu negativní až pozitivní [25].

## **4.11 Vyšetření volných imunních protilátek u novorozence**

### **Popis metody**

Vyšetřením volných imunních protilátek se prokazují anti-A, anti-B třídy IgG, které byly přeneseny placentou od matky. Využívá se metoda nepřímého antiglobulinového testu, kdy se vyšetřuje sérum novorozence s erytrocyty totožné krevní skupiny novorozence [34].

## **Pracovní postup**

Krevní vzorek se vloží do centrifugy Rotanta 460 R na 3000 ot/min po dobu 5 minut. Oddělí se erytrocyty od séra nebo plazmy. Do mikrozkušavky na kartě DG Gel Coombs se podle krevní skupiny novorozence napipetuje 50 µl 0,8% Serigroup Diana A1 nebo Serigroup Diana B. Dále se přidá 25 µl séra nebo plazmy novorozence. Připravená karta DG Gel Coombs se inkubuje při teplotě 37 °C po dobu 15 minut. Po skončení inkubace se centrifuguje v centrifuze DG Spin po dobu 10 minut. Následně se makroskopicky vyhodnotí výsledek [34].

## **4.12 Přímý antiglobulinový test**

### **4.12.1 Kvalitativní vyšetření**

#### **Popis metody**

Přímý antiglobulinový test je kombinací principů gelové filtrace a aglutinace. Gel v mikrozkušavkách karty LISS/Coombs obsahuje nasycený antiglobulinový reagent. V průběhu centrifugace karty LISS/Coombs neaglutinované erytrocyty klesají ke dnu zkumavky a aglutinované erytrocyty jsou umístěny v gelovém sloupci, kdy poloha ve sloupci určuje sílu reakce [35].

#### **Pracovní postup**

Krevní vzorek se vloží do centrifugy Rotanta 460 R na 3000 ot/min po dobu 5 minut. Oddělí se erytrocyty od séra nebo plazmy. Připraví se 0,8% suspenze erytrocytů v ID-Diluentu 2 (1 ml ID-Diluentu 2 + 10 µl sedimentu erytrocytů). Erytrocyty musí být před jejich použitím resuspendovány. Do mikrozkušavky ID-karty se napipetuje 50 µl 0,8% suspenze erytrocytů. ID-karta LISS/Coombs se v ID-centrifuze 24S centrifuguje při 910 ot/min po dobu 10 minut [35].

#### **4.12.2 Kvantitativní vyšetření**

##### **Popis metody**

ID-karta DAT IgG-Dilution obsahuje šest mikrozkušavek, kdy gel pěti mikrozkušavek je nasycen monospecifický AGH reagentem anti-IgG v ředěních 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000. Poslední tedy šestá mikrozkušavka není nasycená a využívá se pro negativní kontrolu [36].

##### **Pracovní postup**

Krevní vzorek se vloží do centrifugy Rotanta 460 R na 3000 ot/min po dobu 5 minut. Oddělí se erytrocyty od séra nebo plazmy. Připraví se 0,8% suspenze erytrocytů v ID-Diluentu 2 (1 ml ID-Diluentu 2 + 10 µl sedimentu erytrocytů). Do mikrozkušavek ID-karty DAT IgG-Dilution se pipetuje po 50 µl 0,8% suspenze erytrocytů. ID-karta DAT IgG-Dilution se v ID-centrifuze 24S centrifuguje při 910 ot/min po dobu 10 minut [36].

#### **4.13 Microsoft Excel**

Data pro statistické zpracování imunohematologických vyšetření HON z období let 2018-2022 byla poskytnuta Oddělením krevní banky v FN Motol. Následně byla data zpracována v programu Microsoft Excel. Získaná data pacientů za jednotlivé roky se nejprve se tabulkově zpracovaly. Vytvořené tabulky obsahují základní informace pacientů, výsledky provedených imunohematologických vyšetření a typy HON. Vytvořily se dvourozměrné výšečové grafy s typy HON v daném roce.

Dále byly tabulkově a graficky zpracována data přehledů prenatálních laboratorních vyšetření v daném roce. Jedná se převážně o prenatální vyšetření krevní skupiny, screening antierytrocytárních protilátek a identifikace

antierytrocytárních protilátek. Graficky je také znázorněno kolísání vyšetřených protilátek způsobující HON za období pěti let.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Data pacientů v období let 2018-2022

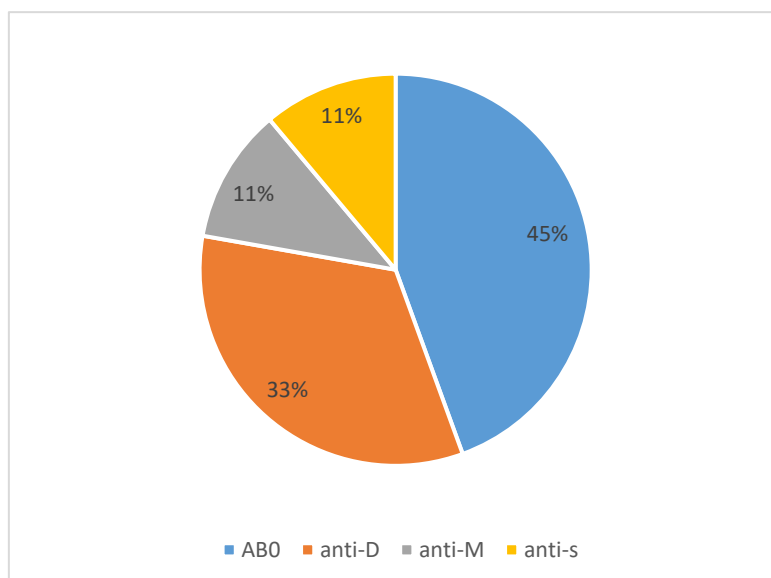
- **Přehled vyšetřených pacientů s rizikem HON v roce 2018**

Tabulka 4 obsahuje data imunohematologického vyšetření matky a dítěte při podezření HON. Krevní skupinu AB0 systému u dítěte VA 18 nešla uzavřít z důvodu zjištění dvojí populace s diagnostickým sérem anti-B a anti-AB. U vzorku dítěte VN 18 nebyl vzorek matky k dispozici.

Tabulka 4 - Vyšetřené HON na Oddělení krevní banky v FN Motol v roce 2018

| datum narození | matka | novorozenec | KS matky     | KS novorozence | SCR matky | SCR novorozence | identifikace Ab | PAT  | volné imunní Ab | typ HON |
|----------------|-------|-------------|--------------|----------------|-----------|-----------------|-----------------|------|-----------------|---------|
| 31.01.2018     | KL 76 | VR 18       | A Rh(D) neg. | A Rh(D) poz.   | poz.      | poz.            | anti-D          | poz. | -               | anti-D  |
| 15.02.2018     | VZ 84 | VME 18      | 0 Rh(D) poz. | A Rh(D) poz.   | neg.      | neg.            | -               | neg. | anti-A (2+)     | AB0     |
| 15.02.2018     | DP 90 | VA 18       | 0 Rh(D) neg. | -              | poz.      | poz.            | anti-D          | neg. | anti-B          | AB0     |
| 02.05.2018     | FH 89 | FB 18       | B Rh(D) neg. | 0 Rh(D) poz.   | poz.      | poz.            | anti-D          | poz. | -               | anti-D  |
| 11.05.2018     | ŠL 87 | PM 18       | A Rh(D) poz. | 0 Rh(D) poz.   | poz.      | neg.            | anti-M          | neg. | -               | anti-M  |
| 13.05.2018     | NP 81 | HL 18       | 0 Rh(D) poz. | 0 Rh(D) poz.   | poz.      | poz.            | anti-s          | poz. | -               | anti-s  |
| 11.06.2018     | TB 79 | TT 18       | 0 Rh(D) neg. | A Rh(D) poz.   | poz.      | neg.            | anti-D          | poz. | anti-A1 (2+)    | anti-D  |
| 13.09.2018     | -     | VN 18       | -            | A Rh(D) poz.   | -         | neg.            | -               | poz. | anti-A (2+)     | AB0     |
| 24.09.2018     | MH 87 | MA 18       | 0 Rh(D) poz. | A Rh(D) poz.   | neg.      | neg.            | -               | neg. | anti-A (2+)     | AB0     |

Obrázek 6 znázorňuje graf s procentuálním zastoupením vyšetřených typů HON za rok 2018. Největší zastoupení s 45 % měl HON způsobený inkompatibilitou v AB0 systému. HON vyvolaný aloprotilátkou anti-D má procentuální zastoupení 33 %. Následně byly po 11 % detekovány aloprotilátky anti-M a anti-s.



Obrázek 6 -Výšečový graf procentuálního zastoupení typů HON v roce 2018

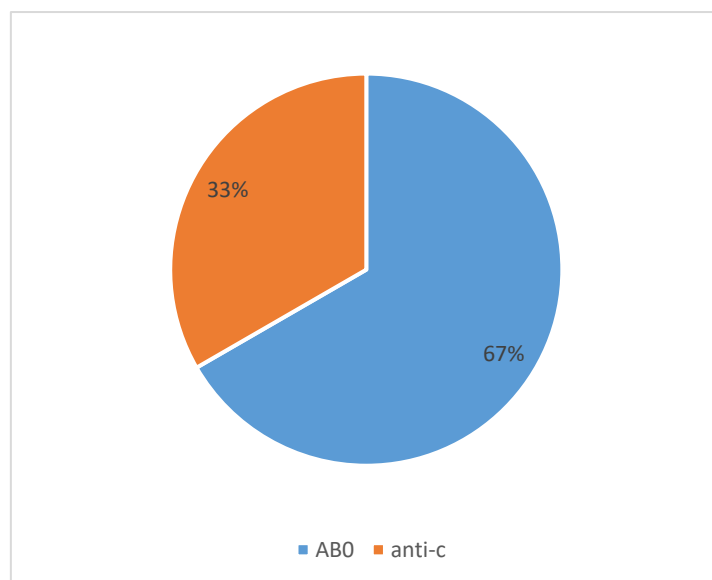
- **Přehled vyšetřených pacientů s rizikem HON v roce 2019**

Tabulka 5 znázorňuje pacienty s rizikem HON v roce 2019. U pacientů ME 19 a HN 19 nešla uzavřít krevní skupina AB0 systému ze stejného důvodu jako u pacienta VA 18 v roce 2018. U pacienta NH 19 nebyl vzorek matky k dispozici pro laboratorní vyšetření. U matky ZL 85 byla při prvním vyšetření zjištěna aloprotilátka anti-c. Při kontrolním vyšetření byla u matky zjištěna směs aloprotilátek jak je zobrazeno v tabulce 5. U dítěte ZZ 19 však screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek odpovídá protilátce anti-c, která byla přenesena od matky.

Tabulka 5 - Vyšetřené HON na Oddělení krevní banky v FN Motol v roce 2019

| datum narození | matka | novorozenec | KS matky     | KS novorozence | SCR matky | SCR novorozence | identifikace Ab        | PAT  | volné imunní Ab | typ HON |
|----------------|-------|-------------|--------------|----------------|-----------|-----------------|------------------------|------|-----------------|---------|
| 31.01.2019     | GY 90 | GM 19       | 0 Rh(D) poz. | A Rh(D) poz.   | neg.      | neg.            | -                      | poz. | anti-A (2+)     | AB0     |
| 13.02.2019     | MR 70 | ME 19       | 0 Rh(D) poz. | -              | neg.      | neg.            | -                      | neg. | anti-B (1+)     | AB0     |
| 23.03.2019     | HP 84 | HN 19       | 0 Rh(D) poz. | -              | neg.      | -               | -                      | poz. | neg.            | AB0     |
| 02.04.2019     | VL 79 | MK 19       | A Rh(D) poz. | A Rh(D) poz.   | poz.      | poz.            | anti-c                 | poz. | -               | anti-c  |
| 09.08.2019     | -     | NH 19       | -            | A Rh(D) poz.   | -         | neg.            | -                      | poz. | anti-A1 (2+)    | AB0     |
| 06.09.2019     | ZL 85 | ZZ 19       | 0 Rh(D) poz. | 0 Rh(D) poz.   | poz.      | poz.            | alo-anti-c + E + Fy(a) | poz. | -               | anti-c  |

Obrázek 7 znázorňuje graf procentuálního zastoupení typů detekovaných HON v roce 2019. V tomto roce bylo nejvíce detekovaných HON s inkompatibilitou v AB0 systému a to s 67 %. U dvou případů způsobily HON aloprotilátky anti-c, kdy se z celkového počtu rovnají 33 %.



Obrázek 7 - Výšečový graf procentuálního zastoupení typů HON v roce 2019

- **Přehled vyšetřených pacientů s rizikem HON v roce 2020**

V Tabulce 6 u pacienta ZJ 20 nelze s jistotou uzavřít krevní skupinu AB0 systému z důvodu dvojí populace s diagnostickými séry anti-A a anti-B. Krevní

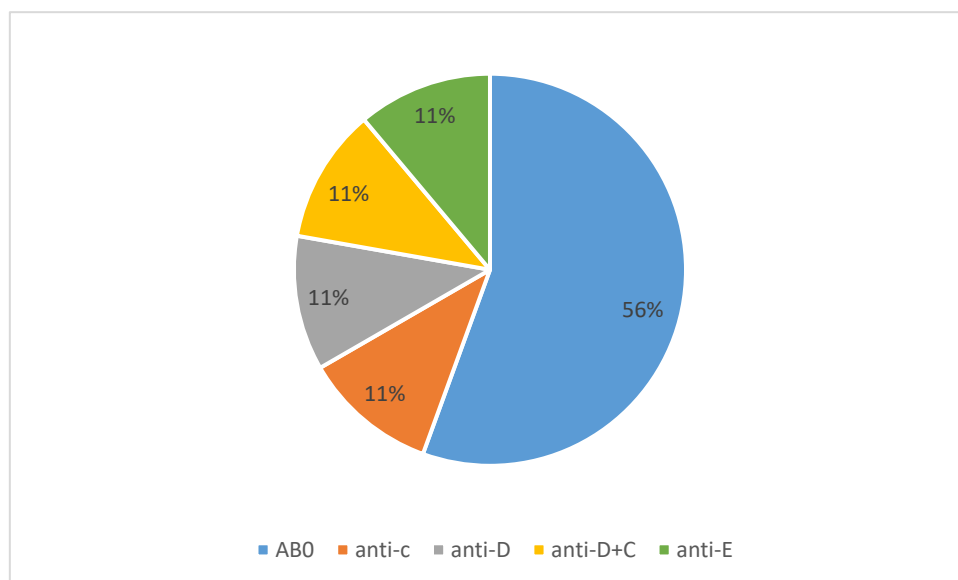


skupina AB0 systému také nešla uzavřít u pacienta HM 20 z důvodu dvojí populace s diagnostickými séry anti-A a anti-AB. Matce TA 91 byla podávána anti-D profylaxe, kdy protilátky anti-D byly následně přeneseny přes placentu dítěti TM 20. U dítěte TM 20 byl následně vyloučen HON.

Tabulka 6 - Vyšetřené HON na Oddělení krevní banky v FN Motol v roce 2020

| datum narození | matka  | novorozenec | KS matky     | KS novorozence | SCR matky | SCR novorozence | identifikace Ab | PAT  | volné imunní Ab | typ HON   |
|----------------|--------|-------------|--------------|----------------|-----------|-----------------|-----------------|------|-----------------|-----------|
| 31.01.2020     | HK 98  | HV 20       | 0 Rh(D) poz. | A Rh(D) poz.   | neg.      | neg.            | -               | poz. | anti-A (2+)     | AB0       |
| 19.04.2020     | SL 91  | SZ 20       | 0 Rh(D) poz. | A Rh(D) poz.   | neg.      | neg.            | -               | neg. | anti-A (1+)     | AB0       |
| 12.05.2020     | CHZ 75 | ZJ 20       | A Rh(D) poz. | -              | poz.      | poz.            | anti-c          | poz. | -               | anti-c    |
| 24.06.2020     | HI 86  | HM 20       | A Rh(D) neg. | 0 Rh(D) poz.   | poz.      | poz.            | anti-D, anti-C  | poz. | -               | anti-D+C  |
| 10.07.2020     | BI 91  | BM 20       | 0 Rh(D) poz. | A Rh(D) poz.   | neg.      | neg.            | -               | neg. | anti-A (2+)     | AB0       |
| 06.08.2020     | MZ 84  | MJ 20       | 0 Rh(D) poz. | A Rh(D) poz.   | neg.      | neg.            | -               | poz. | anti-A (2+)     | AB0       |
| 18.08.2020     | BM 89  | KM 20       | 0 Rh(D) poz. | A Rh(D) poz.   | neg.      | neg.            | -               | neg. | anti-A (1+)     | AB0       |
| 11.09.2020     | HV 85  | HM 20       | A Rh(D) poz. | -              | poz.      | poz.            | anti-E          | poz. | -               | anti-E    |
| 22.10.2020     | TA 91  | TM 20       | A Rh(D) neg. | A Rh(D) neg.   | poz.      | poz.            | ani-D           | neg. | -               | profylaxe |
| 27.11.2020     | PB 94  | PZ 20       | 0 Rh(D) neg. | 0 Rh(D) poz.   | poz.      | poz.            | anti-D          | poz. | -               | anti-D    |

Na Obrázku 8 je znázorněn graf procentuálního zastoupení typů HON za rok 2020. Přes polovinu vyšetřených typů HON tvoří HON způsobený inkompatibilitou AB0 systému. Následně po 11 % byly detekovány aloprotilátky anti-c, anti-D, směsi aloprotilátek anti-D+C a anti-E.



Obrázek 8 - Výšečový graf procentuálního zastoupení typů HON v roce 2020

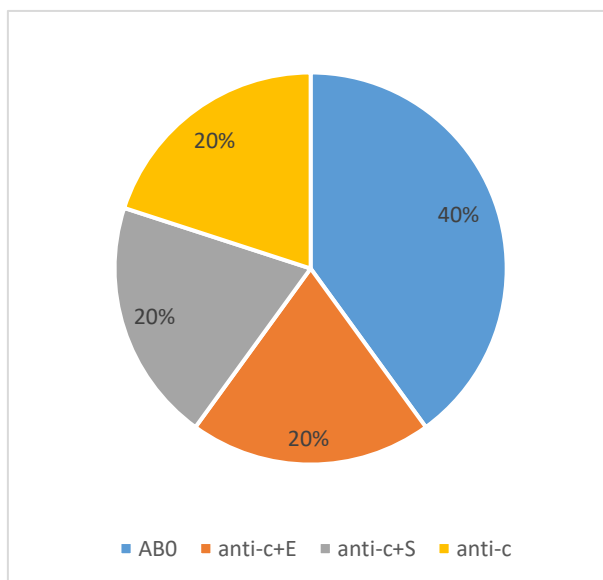
- **Přehled vyšetřených pacientů s rizikem HON v roce 2021**

Tabulka 7 zobrazuje pacienty s rizikem HON v roce 2021. Pacient OP 2021 neměl vzorek matky k dispozici.

Tabulka 7 - Vyšetřené HON na Oddělení krevní banky v FN Motol v roce 2021

| datum narození | matka    | novorozenec | KS matky      | KS novorozence | SCR matky | SCR novorozence | identifikace Ab | PAT  | volné imunní Ab | typ HON  |
|----------------|----------|-------------|---------------|----------------|-----------|-----------------|-----------------|------|-----------------|----------|
| 28.01.2021     | DL 92    | DK 2021     | 0 Rh(D) poz.  | A Rh(D) poz.   | neg.      | neg.            | -               | neg. | anti-A (1+)     | AB0      |
| 16.03.2021     | HCHTT 85 | NHD 2021    | A Rh(D) poz.  | 0 Rh(D) poz.   | poz.      | poz.            | anti-c+E        | poz. | -               | anti-c+E |
| 19.10.2021     | HJ 83    | HR 2021     | A Rh(D) poz.  | A Rh(D) poz.   | poz.      | poz.            | anti-c+S        | poz. | -               | anti-c+S |
| 21.06.2021     | PL 88    | KA 2021     | AB Rh(D) poz. | A Rh(D) poz.   | poz.      | poz.            | anti-c          | poz. | -               | anti-c   |
| 29.10.2021     | -        | OP 2021     | -             | A Rh(D) poz.   | -         | neg.            | -               | neg. | anti-A          | AB0      |

Na Obrázku 9 je znázorněn graf procentuálního zastoupení typů HON v roce 2021. Z následujícího grafu vyplývá, že největší zastoupení má opět jako v předchozích letech HON způsobený inkompatibilitou v AB0 systému a to s 40 %. Další zastoupení po 20 % mají aloprotilátky anti-c a směsi aloprotilátek anti-c+E a anti-c+S.



Obrázek 9 - Výšečový graf procentuálního zastoupení typů HON v roce 2021

- **Přehled vyšetřených pacientů s rizikem HON v roce 2022**

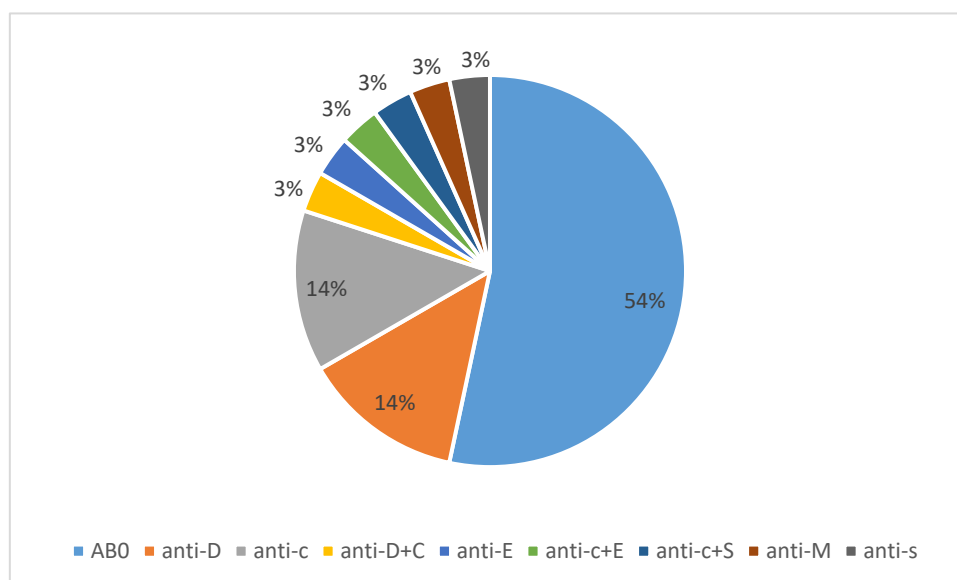
Jak je znázorněno v Tabulce 8 během roku 2022 byl vyšetřený pouze jeden pacient s rizikem HON. V případě pacienta DA 22 je jednalo o HON způsobený inkompatibilitou AB0 systému.

Tabulka 8 - Vyšetřené HON na Oddělení krevní banky v FN Motol v roce 2022

| Datum narození | matka | novorozenec | KS matky     | KS novorozence | SCR matky | SCR novorozence | identifikace Ab | PAT  | volné imunní Ab | typ HON |
|----------------|-------|-------------|--------------|----------------|-----------|-----------------|-----------------|------|-----------------|---------|
| 04.08.2022     | DA 89 | DA 2022     | 0 Rh(D) poz. | A Rh(D) poz.   | neg.      | neg.            | -               | neg. | anti-A (2+)     | AB0     |

- **Souhrn typů HON v období let 2018-2022**

Následující Obrázek 10 zobrazuje grafické znázornění souhrnu detekovaných typů HON. Největší zastoupení 54 % má inkompatibilita AB0 systému, která nejčastěji způsobila HON. Po inkompatibilitě AB0 systému byl HON způsobený aloprotilátkami anti-D a anti-c, kdy každá má procentuální zastoupení z celkového počtu HON 14 %. Dále po 3 % byly detekovány aloprotilátky způsobující HON anti-E, anti-M, anti-s a směsi aloprotilátek anti-D+C, anti-c+E, anti-c+S.



Obrázek 10 - Výšečový graf procentuálního zastoupení HON v období let 2018-2022

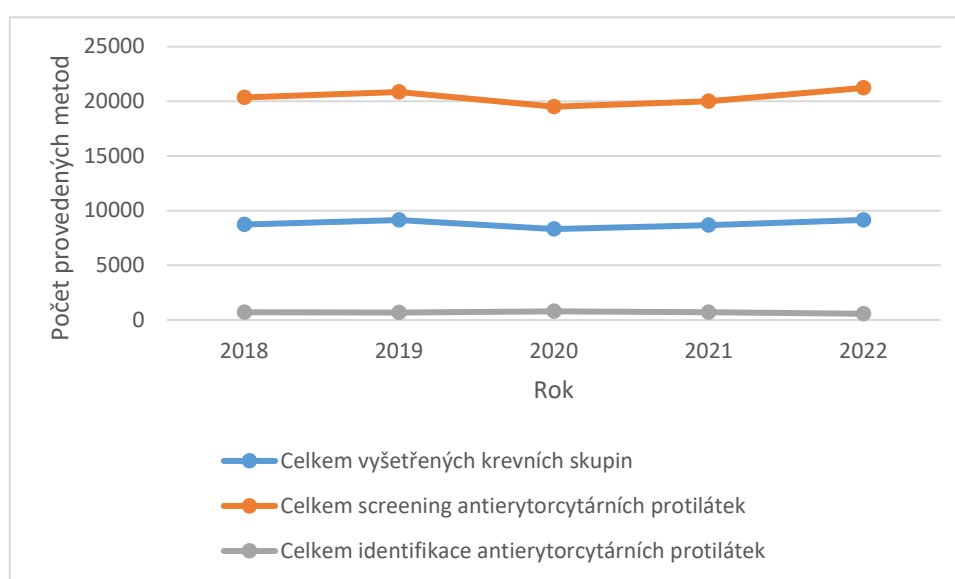
## 5.2 Přehled provedených laboratorních metod v období let 2018-2022

Tabulka 9 obsahuje počet celkově provedených vyšetření krevních skupin, screeningů antierytrocytárních protilátek a případných identifikací antierytrocytárních protilátek v období let 2018-2022. Screening antierytrocytárních protilátek je každý rok nejčastěji provedená metoda.

Tabulka 9- Přehled celkových laboratorních metod provedených na Oddělení krevní banky v FN Motol v období let 2018-2022

|  | 2018  | 2019  | 2020  | 2021  | 2022  |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| Celkem vyšetřených krevních skupin                 | 8730  | 9143  | 8313  | 8671  | 9148  |
| Celkem screening antierytorcytárních protilátek    | 20340 | 20849 | 19504 | 19992 | 21220 |
| Celkem identifikace antierytorcytárních protilátek | 705   | 675   | 786   | 700   | 568   |

Na obrázku 11 je zobrazen celkový přehled provedených metod za jednotlivé roky. Podle vytvořeného grafu je na Oddělení krevní banky FN Motol za posledních 5 let setrvalý trend v počtu provedených metod.



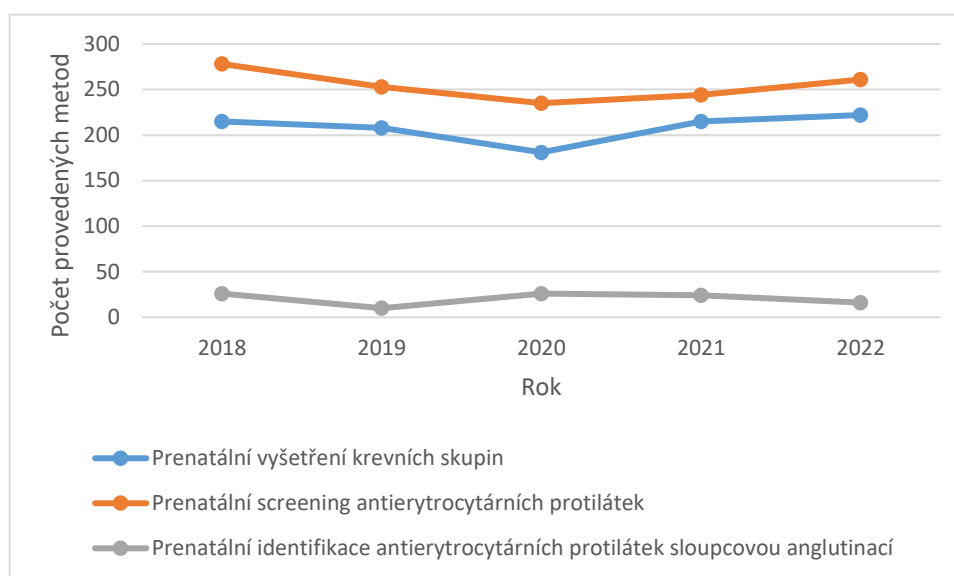
Obrázek 11 - Přehled celkově provedených laboratorních metod na Oddělení krevní banky v FN Motol v období let 2018-2022

V tabulce 10 jsou zobrazeny počty provedených prenatalních vyšetření za období pěti let. Nejméně prenatalně vyšetřených krevních skupin a screeningů antierytrocytárních protilátek bylo v roce 2020. V tomto roce bylo provedeno 181 určení krevních skupin a 235 screeningů antierytrocytárních protilátek. Provedených identifikací antierytrocytárních protilátek metodou sloupcovou aglutinací bylo vyšetřených nejméně v roce 2019 a to 10 testů. Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.4 Imunohematologické vyšetření těhotné ženy pacientky v prenatalním období dochází na vyšetření během 10.-16. týdne a 26.-32. týdne těhotenství.

Tabulka 10 - Prenatální vyšetření provedená na Oddělení krevní banky v FN Motol v období let 2018-2022

|  | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 |
|--|------|------|------|------|------|
| Prenatální vyšetření krevních skupin   | 215  | 208  | 181  | 215  | 222  |
| Prenatální screening antierytrocytárních protilátek                          | 278  | 253  | 235  | 244  | 261  |
| Prenatální identifikace antierytrocytárních protilátek sloupcovou aglutinací | 26   | 10   | 26   | 24   | 16   |

Na obrázku 12 je zobrazen přehled provedených prenatálních metod za jednotlivé roky. Tak jako u obrázku 11 také sledujeme setrvalý trend v počtu provedených metod.

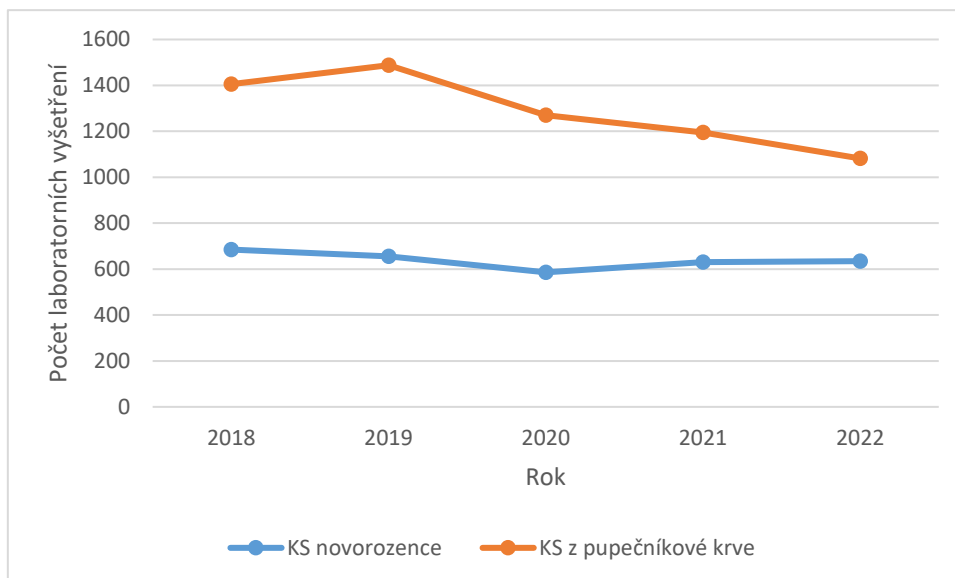


Obrázek 12 – Přehled prenatálně provedených laboratorních metod na Oddělení krevní banky v FN Motol v období let 2018-2022

Tabulka 11 a obrázek 13 zobrazuje přehled vyšetřených krevních skupin novorozence a krevních skupin vyšetřených z pupečnickové krve během pěti let.

Tabulka 11 - Přehled laboratorně vyšetřených krevních skupin novorozence na Oddělení krevní banky v FN Motol v období let 2018-2022

|                               | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|
| <b>KS novorozence</b>         | 685  | 656  | 586  | 630  | 635  |
| <b>KS z pupečnickové krve</b> | 1405 | 1488 | 1270 | 1195 | 1082 |



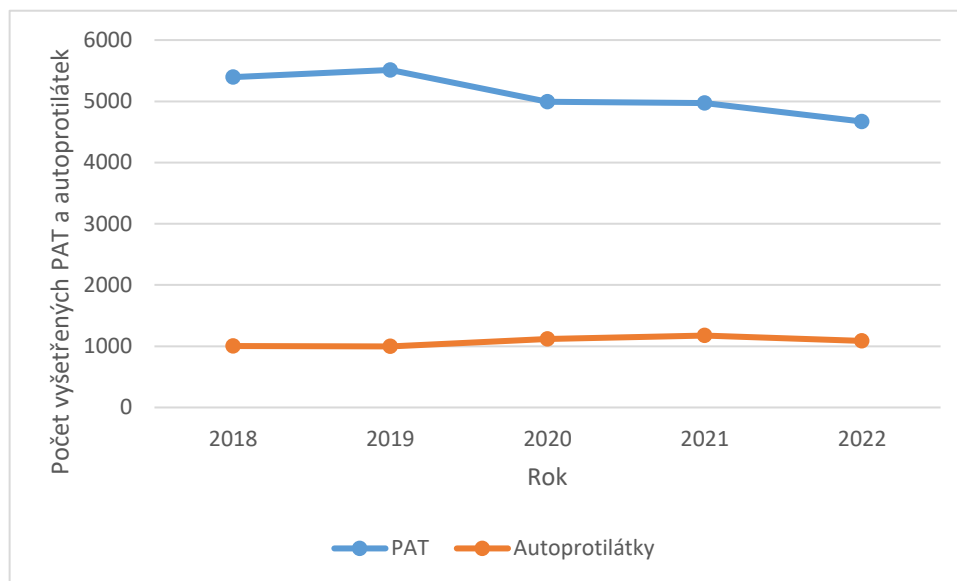
Obrázek 13 - Přehled laboratorně vyšetřených krevních skupin novorozence v období 2018-2022

Tabulka 12 zobrazuje počty provedených laboratorních metod. Jedná se o provedené přímé antiglobulinové testy (PAT), autoprotilátky, volné imunní protilátky (VIP) a počet provedených titrací protilátek. Z uvedené tabulky lze pozorovat pokles provedených přímých antiglobulinových testů v průběhu analyzovaného časového období.

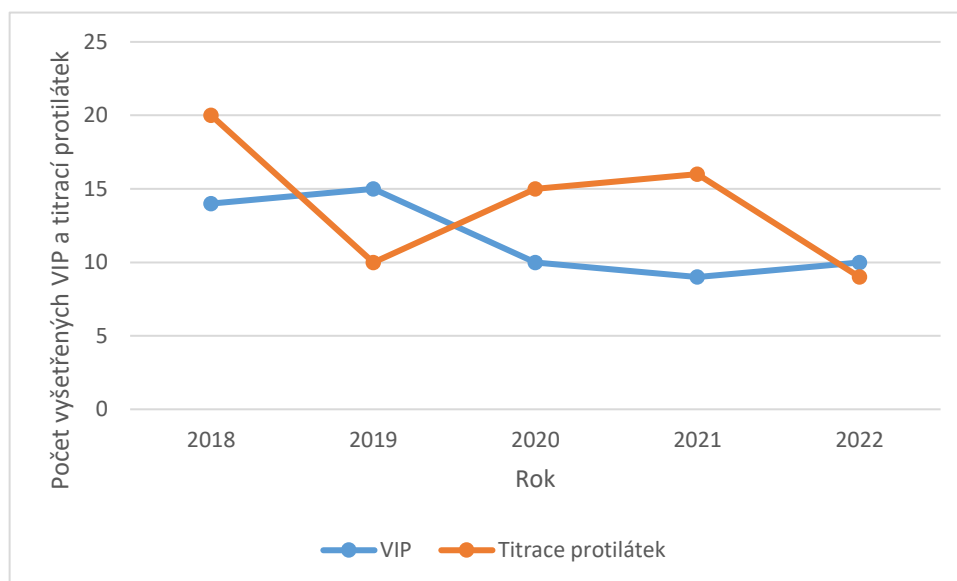
Tabulka 12 – Přehled provedených laboratorních metod na Oddělení krevní banky v FN Motol v období let 2018-2022

|                           | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 |
|---------------------------|------|------|------|------|------|
| <b>PAT</b>                | 5393 | 5512 | 4994 | 4972 | 4670 |
| <b>Autoprotilátky</b>     | 1002 | 997  | 1117 | 1174 | 1087 |
| <b>VIP</b>                | 14   | 15   | 10   | 9    | 10   |
| <b>Titrace protilátek</b> | 20   | 10   | 15   | 16   | 9    |

Obrázek 14 a 15 znázorňují počty provedených vyšetření PAT, autoprotilátek, VIP a titrací protilátek.



Obrázek 14 -Graf s přehledem počtu vyšetřených PAT a autoprotilátek za období let 2018-2022



Obrázek 15 - Graf s přehledem počtu vyšetřených VIP a provedených titrací protilátek

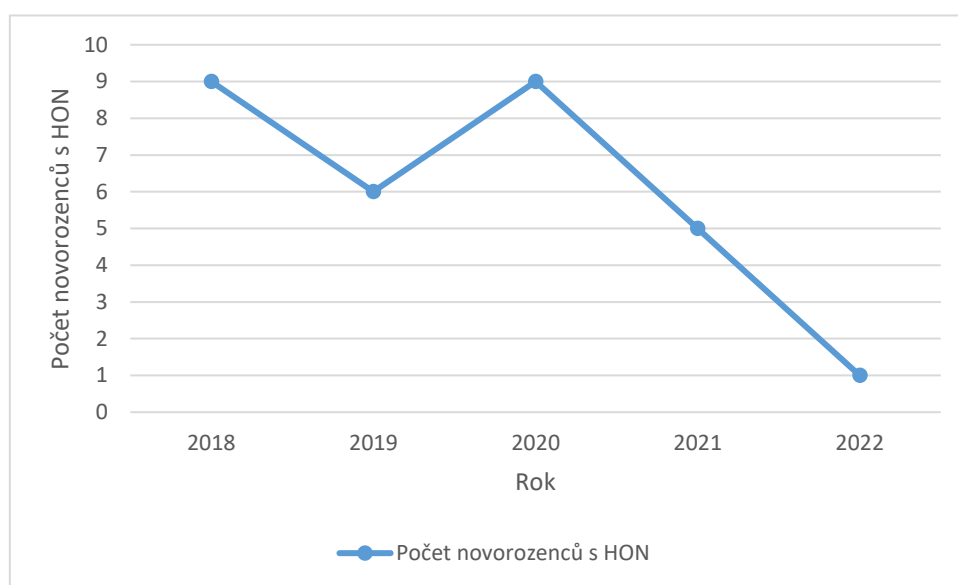


Následující tabulka 13 zobrazuje počet laboratorně vyšetřených pacientů s rizikem HON. Každý rok se vyskytují pouze jednotky případů.

Tabulka 13 – Přehled počtu novorozenců s HON za jednotlivé roky

|                         | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 |
|-------------------------|------|------|------|------|------|
| Počet novorozenců s HON | 9    | 6    | 9    | 5    | 1    |

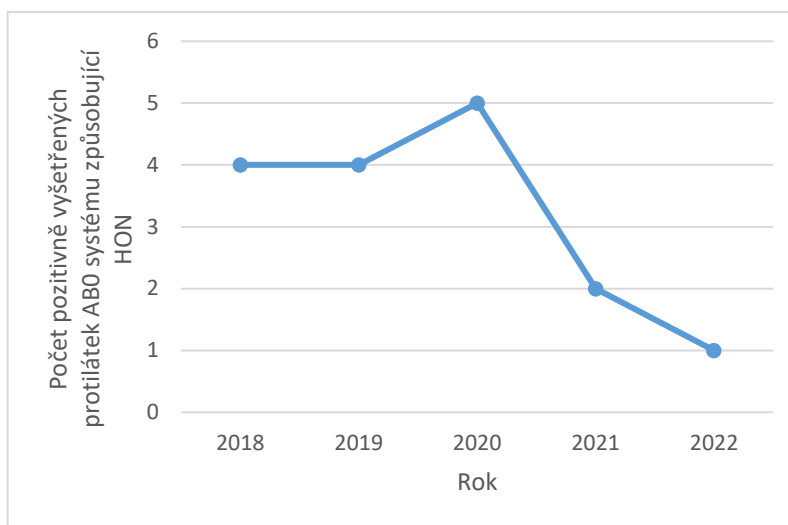
Obrázek 16 zobrazuje jak od roku 2020 počet vyšetřených pacientů s HON postupně klesá.



Obrázek 16 - Přehled novorozenců s HON za jednotlivé roky

- **Přehled pozitivně vyšetřených protilátek AB0 systému v období let 2018-2022**

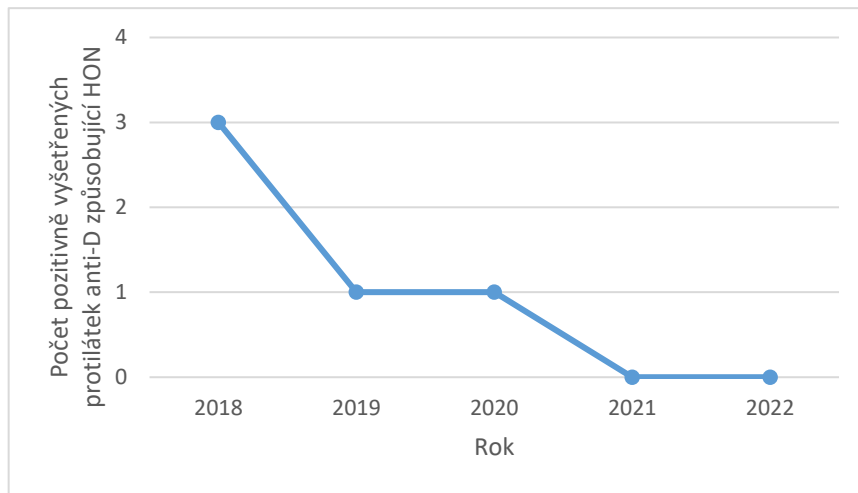
Na obrázku 17 je zobrazeno kolísání pozitivně vyšetřených protilátek AB0 systému za jednotlivé roky, které způsobují HON. Nejvíce pozitivně vyšetřených protilátek bylo v roce 2020 a od té doby je klesající trend v počtu pozitivně vyšetřených protilátek.



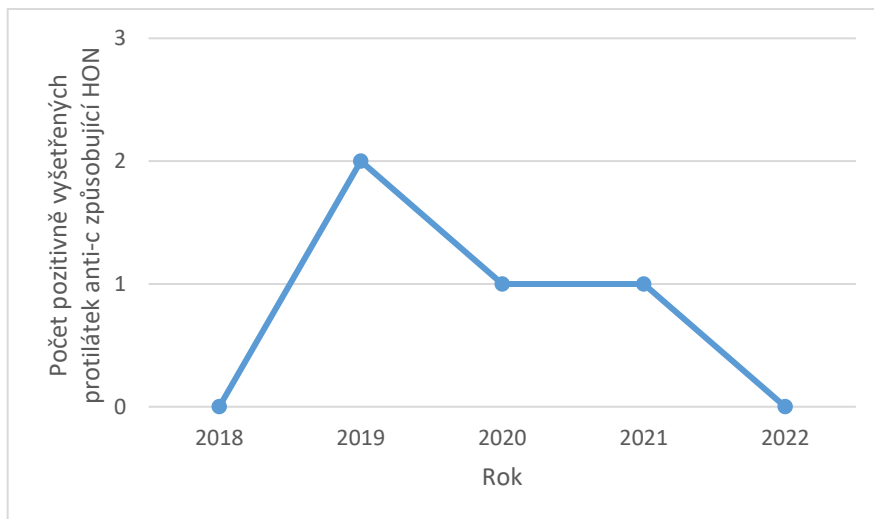
Obrázek 17 - Přehled pozitivně vyšetřených protilátek AB0 systému způsobující HON v období 2018-2022

- **Přehled pozitivně vyšetřených protilátek Rh systému v období let 2018-2022**

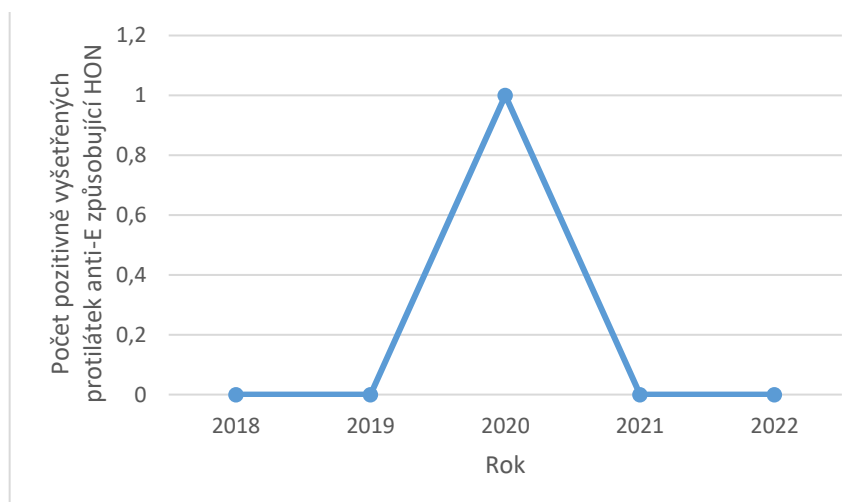
Na obrázku 18, 19, a 20 jsou zobrazeny grafické přehledy pozitivně vyšetřených protilátek anti-D, anti-c a anti-E, které způsobily HON. U protilátky anti-D sledujeme od roku 2018 postupně klesající trend v počtu pozitivně vyšetřených protilátek a od roku 2021 nebyly žádné pozitivně vyšetřeny. Protilátka anti-c byla pozitivně vyšetřena u HON v období 2019-2021. Pouze jednou, a to v roce 2020 byla pozitivně vyšetřena samostatně protilátka anti-E, která způsobila HON.



Obrázek 18 – Přehled pozitivně vyšetřených protilátek anti-D způsobující HON v období 2018-2022



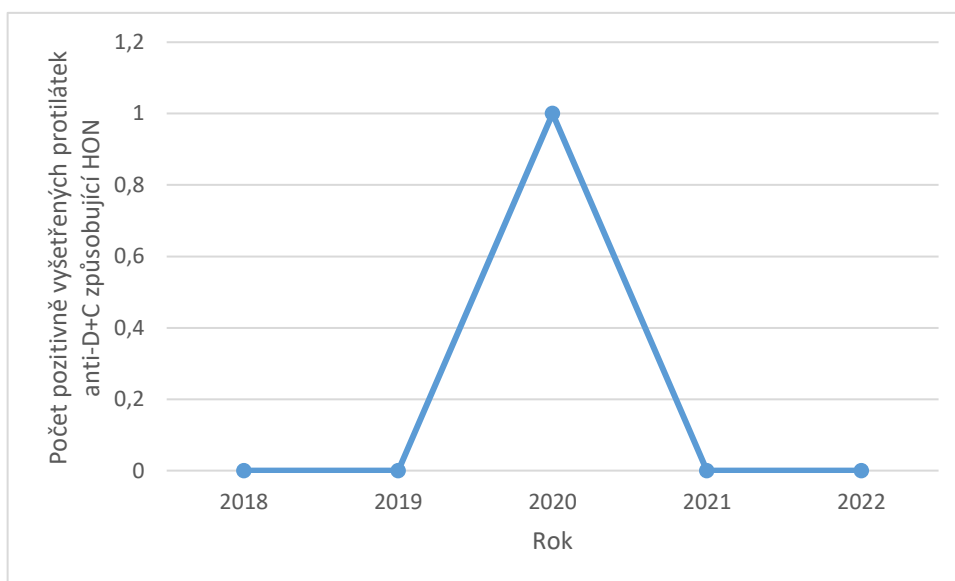
Obrázek 19 - Přehled pozitivně vyšetřených protilátek anti-c v období 2018-2022



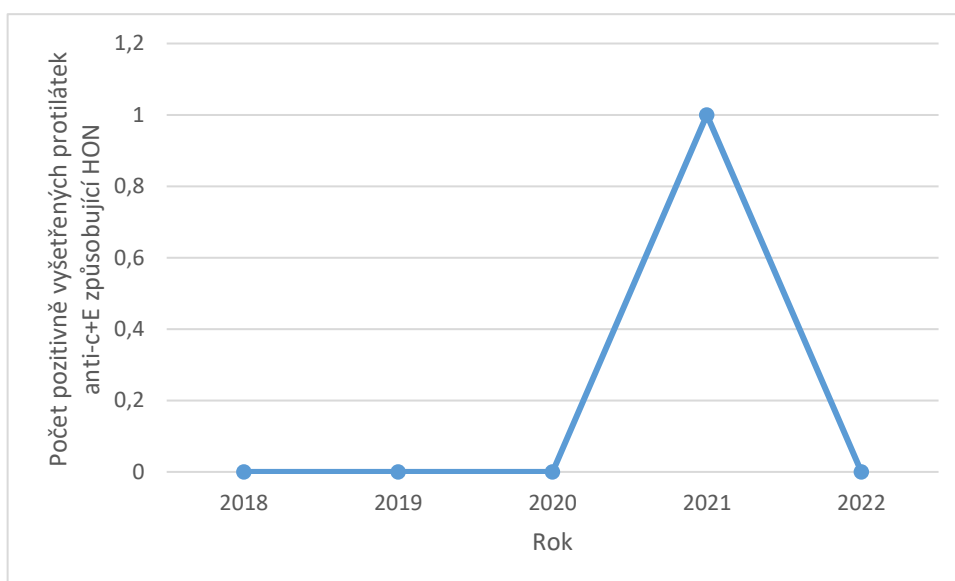
Obrázek 20 - Přehled pozitivně vyšetřených protilátek anti-E způsobující HON v období 2018-2022

- **Přehled pozitivně vyšetřených směsí protilátek v období let 2018-2022**

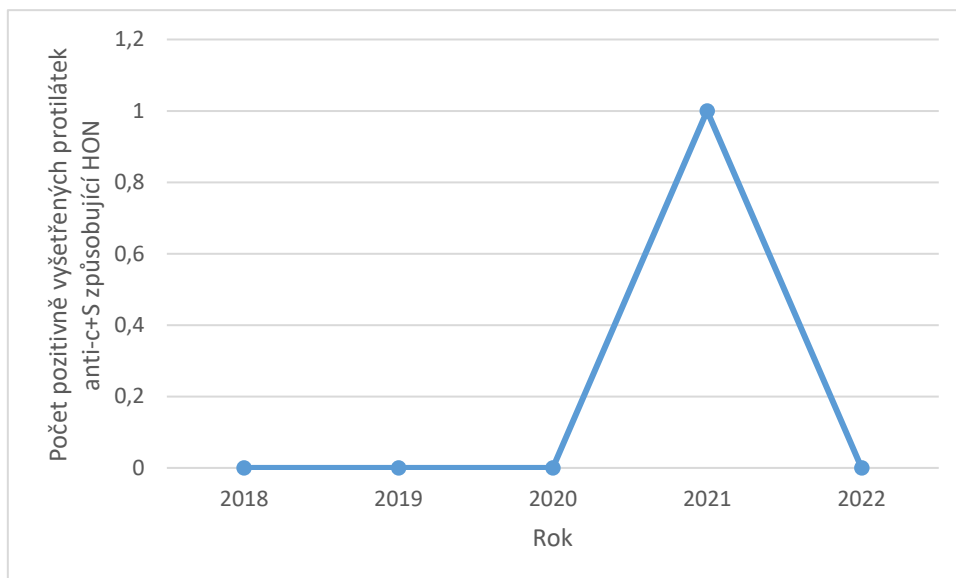
Na obrázku 21, 22, 23 jsou graficky zobrazeny přehledy pozitivně vyšetřených směsí protilátek, které způsobily HON v období let 2018-2022. Jedná se o směsi protilátek anti-D+C, anti-c+E, anti-c+S. Směs protilátek anti-D+C byla pozitivně vyšetřena u jednoho případu v roce 2020. V roce 2021 byla směs anti-c+E a anti-c+S také pozitivně vyšetřena pouze u jednoho případu.



Obrázek 21 - Přehled pozitivně vyšetřených směsí protilátek anti-D+C v období 2018-2022



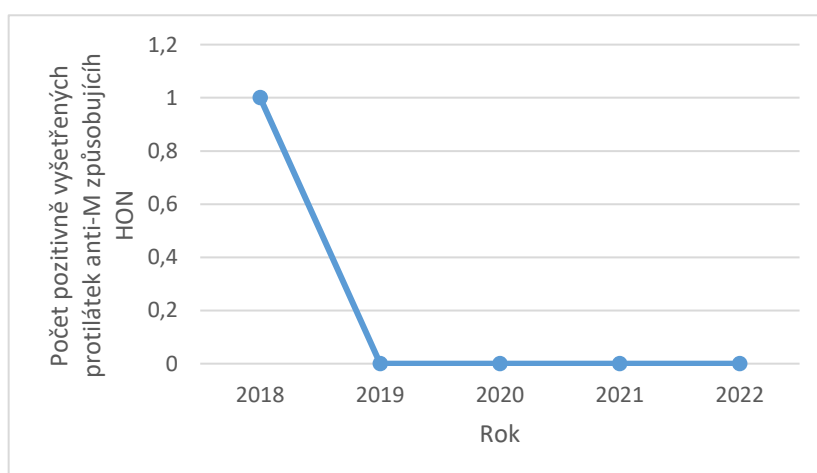
Obrázek 22 – Přehled pozitivně vyšetřených směsí protilátek anti-c+E v období 2018-2022



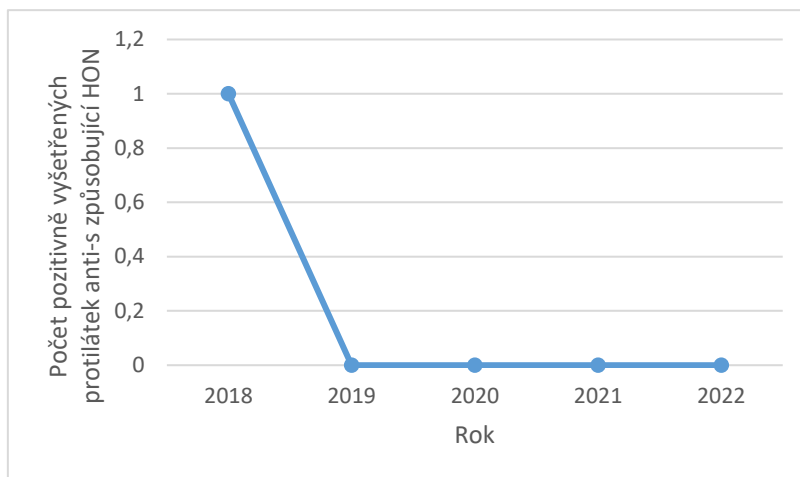
Obrázek 23 - Přehled pozitivně vyšetřených směsí protilátek anti-c+S v období 2018-2022

- **Přehled pozitivně vyšetřených protilátek MNS systému v období let 2018-2022**

Obrázek 24 a 25 zobrazuje grafický přehled pozitivně vyšetřených protilátek anti-M a anti-s, které způsobily HON za posledních pět let. Obě protilátky byly jednokrát pozitivně vyšetřeny v roce 2018.



Obrázek 24 – Přehled pozitivně vyšetřených protilátek anti-M v období 2018-2022



Obrázek 25 - Přehled pozitivně vyšetřených protilátek anti-s v období 2018-2022

## 6 DISKUZE

Předmětem bakalářské práce je imunohematologické vyšetření HON. Zahrnuje vyšetření těhotné ženy a novorozence. Pro zpracování byla poskytnuta data 31 pacientů, kteří byli vyšetřeni Oddělením krevní banky FN Motol v období let 2018-2022.

Na Oddělení krevní banky FN Motol byla provedena vyšetření krevní skupiny AB0 Rh(D), screeningu nepravidelných antierytrocytárních protilátek, identifikace antierytrocytárních protilátek, fenotypu, titru protilátek, autoproti látek, krevní skupiny novorozence a přímého antiglobulinového testu jak kvantitativně, tak kvalitativně. Tato vyšetření jsou relevantní a dobře detekují riziko HON. Na Oddělení krevní banky FN Motol bylo během pěti let provedeno prenatalně vyšetřených 1041 krevních skupin, 1271 screeningů antierytrocytárních protilátek, 102 identifikací antierytrocytárních protilátek. Během zkoumaného období se počet provedených laboratorních metod během let výrazně neměnil. V České republice má ročně 5 % těhotných žen pozitivní screening protilátek a u 1,5 % je identifikovaná klinicky významná protilátka [37]. Dle nejnovějších studií se odhaduje, že HON postihuje 3-8 na 100 000 pacientů za rok. Dále se odhaduje, že během těhotenství je 15-20 % inkompatibilit způsobených v AB0 systému a z toho se jen 1 % rozvine do HON. Výskyt onemocnění se také odlišuje podle rasy populace. V bělošské populaci se vyskytuje okolo 10 % RhD negativních těhotných žen. Největší zastoupení HON je u bílé rasy s 15-16 %. Druhá nejčastěji postihnutá rasa je Afroameričanů s 8 %. U Asiatů je procentuální zastoupení onemocnění pod 1 %. Je vhodné věnovat větší pozornost rase [38].

Můj soubor obsahoval 28 těhotných žen a 31 novorozenců s rizikem HON. V roce 2018 a 2020 bylo u devíti novorozenců stanovené riziko HON. Jedná se o nejvíce vyšetřených rizik HON za celých pět let. Z vyhodnocených dat lze považovat HON za ojedinělé onemocnění, které se ročně ve FN Motol vyskytuje

maximálně v desítkách případů. Dále z dat vyplývá, že nejčastěji byl HON způsobený inkompatibilitou AB0 systému. Jedná se o 16 případů (54 %) z 30 novorozenců. Toto tvrzení souhlasí i s literaturou ve které autoři tvrdí, že výskyt HON s příčinou v inkompatibilitě AB0 systému je způsoben častěji než HON v inkompatibilitě v Rh systému [39]. Dále 4 případy (14 %) s HON způsobila protilátka anti-D. Počet pozitivně vyšetřených protilátek anti-D má během posledních pěti let klesající trend. Také anti-c se vyskytovalo u 4 případů (14 %) s HON. Další protilátky, které způsobily HON byly jednotlivě vyšetřeny pozitivně u ostatních případů (3 %). Jedná se o směsi protilátek anti-D+C, anti-c+E, anti-c+S a protilátky anti-s, anti-M.

Byl zaznamenán pokles nových případů HON v letech 2020-2022. Toto klesání může být způsobeno důslednou profylaxí např. podáním anti-D ženám v druhém a dalším těhotenství po porodu RhD pozitivního novorozence. Od roku 1970 po zavedení profylaxe se sleduje pokles aloimunizace těhotné ženy způsobenou anti-D z 14 % na 2 %. Úmrtnost způsobená HON RhD klesla ze 46/100 000 porodů na 1,6/100 000 porodů. Dalším důvodem v častějším výskytu HON v inkompatibilitě AB0 systému autor uvádí ve větší frekvenci zastoupení antigenů AB0 systému v těle [40].

Kromě aplikování anti-D je další možnost profylaxe, a to v podávání ženám ve fertilním věku krevní transfuzní přípravky, které jsou Kell negativní. Na Transfuzním oddělení FN Olomouc byl zkoumán soubor 45 435 vyšetřených těhotných pacientek v období let 2000-2011. Za jedenáct let byl výskyt aloimunizace anti-K u 1,2 ‰ těhotných žen. Při porovnání získaných dat z Transfuzního oddělení FN Olomouc a mých zpracovaných dat z Oddělení krevní banky v FN Motol lze vyzorovat nulový výskyt protilátky anti-K, která by způsobila HON [41].



Klinické příznaky jako je anémie, hyperbilirubinémie a další se vyskytují i u jiných onemocnění a stavů. Proto je důležitá správná diagnostika pro potvrzení anebo vyvrácení HON. V medicíně neustále dochází k novým pokrokům v diagnostice. Tyto pokroky vedou ke zlepšení laboratorního vyšetření a následné diagnostice [40].

## 7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnuje imunohematologickému vyšetření HON. Teoretická část je zaměřena na krevní skupiny, typy HON, imunohematologickému vyšetření těhotné ženy a novorozence a popis klinického obrazu novorozence s HON.

Praktická část popisuje standardní operační postupy vyšetření těhotné ženy a novorozence, které vedou k případnému výslednému riziku HON. Dále se praktická část zaměřuje na statistické zpracování dat těhotných žen a novorozenců s rizikem HON, kteří byli vyšetřeni na Oddělení krevní banky v období let 2018-2022.

Po statistickém zpracování dat bylo největší zastoupení HON způsobených inkompatibilitou v AB0 systému. Statistický výsledek přehledu laboratorních metod ukazuje na setrvalý a během pěti let výrazně neměnný stav v počtu provedených vyšetření na Oddělení krevní banky v FN Motol. Na rozdíl od počtu pozitivně vyšetřených novorozenců s rizikem HON, kterých od roku 2020 ubývá.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|                      |   |
|----------------------|---|
| ACD                  | protisrážlivé činidlo s adeninem, citrátem a dextrosou            |
| Ag-Ab                | antigen-protilátka  |
| AGH                  | antiglobulinum humanum (protilátka proti lidskému imunoglobulinu) |
| APC                  | antigen prezentující buňky  |
| CPD                  | protisrážlivé činidlo s citrátem, fosfátem a dextrosou            |
| CPDA                 | protisrážlivé činidlo s citrátem, fosfátem, dextrosou a adeninem  |
| Ctl                  | Control   |
| D <sup>variant</sup> | variantní antigen D   |
| D <sup>weak</sup>    | slabý antigen D   |
| EDTA                 | kyselina ethylendiamnintetraoctová                                |
| FcRN                 | placentární receptory   |
| FMH                  | fetomaternální krvácení   |
| HDFN                 | hemolytic disease of the fetus and newborn                        |
| HON                  | hemolytické onemocnění plodu/novorozence                          |
| HTR                  | hemolytická potransfuzní reakce                                   |

|          |  |
|----------|--|
| Ig       | imunoglobulin                              |
| ISBT     | International Society of Blood Transfusion |
| KS       | krevní skupina                             |
| LISS-NAT | low ionic strenght solution                |
| MMS      | monocyto-makrofágový systém                |
| Např.    | například                                  |
| NAT      | nepřímý antiglobulinový test               |
| ot/min   | otáčky za minutu                           |
| PAT      | přímý antiglobulinový test                 |
| SCR      | screening antierytrocytárních protilátek   |

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CHOTTOVÁ-DVOŘÁKOVÁ, Magdalena a Eliška MISTROVÁ. *Fyziologie krve a základy imunity*. Vydání první. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2018. ISBN 978-80-246-3833-1.
- [2] PROCHÁZKOVÁ, Renata a Lenka ŘEHOŘOVÁ. *Klinická transfuziologie pro všeobecné sestry*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2010. ISBN 978-80-7372-676-8.
- [3] PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství II*. 1. vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3460-6.
- [4] MASOPUST, Jiří a Martin PÍSAČKA. *Praktická imunohematologie: erytrocyty*. První vydání. Praha: Mladá fronta, 2016. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-3740-2.
- [5] ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST. *Transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4534-3.
- [6] ULČOVÁ-GALLOVÁ, Zdenka a Jindřich MADAR. *Imunologie a imunopatologie lidské reprodukce: vybrané kapitoly*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Maxdorf, 2020. Jessenius. ISBN 978-80-7345-648-1.

- [7] JÍLEK, Petr. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně* [online]. 2. doplněné vydání. Praha: Grada, 2019 [cit. 2022-11-08]. ISBN 978-80-271-0595-3. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/kniha/imunologie-5316/>
- [8] KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět* [online]. 2. přepracované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2018 [cit. 2023-05-05]. ISBN 978-80-7592-013-3. Dostupné z: <https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?isid=978-80-7592-013-3>
- [9] ROUBALOVÁ, Lucie a Marek LUBUŠKÝ. Imunologický princip rozvoje erytrocytární aloimunizace těhotné ženy, hemolytické nemoci plodu a prevence RhD aloimunizace u RhD negativních žen. *Česká gynekologie* [online]. 2020, 85(6), 408-416 [cit. 2022-11-07]. ISSN 1805-4455. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2020-6-14/imunologicky-princip-rozvoje-erytrocytarni-aloimunizace-tehotne-zeny-hemolyticke-nemoci-plodu-a-prevence-rhd-aloimunizace-u-rhd-negativnich-zen-126026>
- [10] ROZTOČIL, Aleš. *Moderní porodnictví* [online]. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2017 [cit. 2022-11-19]. ISBN 978-80-247-5753-7. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/kniha/moderni-porodnictvi-3112/>
- [11] MAREŠOVÁ, Pavlína. *Moderní postupy v gynekologii a porodnictví*. 3., přepracované a doplněné vydání. Praha: Maxdorf, 2021. Medica (Maxdorf). ISBN 978-80-7345-709-9.

- [12] ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2013. ISBN 978-80-7492-062-2.
- [13] MASOPUST, Jiří a Martin PÍSAČKA. *Praktická imunohematologie - erythrocyty* [online]. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2022 [cit. 2023-02-22]. ISBN 978-80-271-3377-2. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/kniha/prakticka-immunohematologie-erythrocyty-11217/>
- [14] Blood typing results. In: *LABSTER THEORY* [online]. [cit. 2022-12-30]. Dostupné z: <https://theory.labster.com/blood-typing-results/>
- [15] Proposed Draft Package Insert for DG Gel 8 Direct Coombs card. In: *U.S. Food and Drug Administration* [online]. 2021 [cit. 2022-12-30]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/media/158613/download>
- [16] KERKAR, Alisha, Swarupa BHAGWAT a Jayashree SHARMA. A Study of Clinical and Serological Correlation of Positive Direct Antiglobulin Test in Blood Bank at a Tertiary Care Center. *Journal of Laboratory Physicians* [online]. 2022, **14**(03), 223-230 [cit. 2023-02-28]. ISSN 0974-2727. Dostupné z: doi:10.1055/s-0041-1741442
- [17] HOLUSKOVÁ, Iva, Marek LUBUŠKÝ, Studničková MARTINA a Procházka MARTIN. Erytrocytární aloimunizace těhotných žen, klinický význam a laboratorní diagnostika. *Česká gynekologie* [online]. 2013, **78**(1), 89-99 [cit. 2022-11-20]. ISSN 1210-7832. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2013-1->

3/erytrocytární-aloimunizace-tehotných-žen-klinicky-vyznam-a-laboratorni-diagnostika-40175

- [18] ĽUBUŠKÝ, Marek. Význam vyšetření protilátek a krevní skupiny v těhotenství. *Česká gynekologie* [online]. 2015, 80(3), 236-238 [cit. 2022-11-20]. ISSN 1210-7832. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2015-3/vyznam-vysetreni-protilateka-krevni-skupiny-v-tehotenstvi-52433>
- [19] ĽUBUŠKÝ, Marek a Martin PROCHÁZKA. Erytrocytární aloimunizace těhotných žen Hemolytická nemoc plodu a novorozence. In: PAŘÍZEK, Antonín. *Kritické stavy v porodnictví*. 1. vydání. Praha: Galén, 2012, s. 197-202. ISBN 978-80-7262-949-7.
- [20] DORT, Jiří, Eva DORTOVÁ a Petr JEHLIČKA. *Neonatologie* [online]. Praha: Karolinum, 2014 [cit. 2022-12-28]. ISBN 978-80-246-3936-9. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/e-kniha/neonatologie-1086256/>
- [21] GLEASON, Christine a Sandra JUUL. *Avery's diseases of the newborn*. Tenth edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2018. ISBN 978-0-323-40139-5.
- [22] BLÁHOVÁ, Květa, Filip FENCL a Jan LEBL. *Pediatrická propedeutika*. Třetí, přepracované a rozšířené vydání. Praha: Galén, 2019. ISBN 978-80-7492-442-2.
- [23] ĽUBUŠKÝ, Marek, Martin PROCHÁZKA, Ondřej ŠIMETKA a Iva HOLUSKOVÁ. Doporučení k provádění prevence RhD aloimunizace



uRhD negativních žen. *Česká gynekologie*. 2013, **78**(2), 132-133. ISSN 1210-7832.

- [24] DURDOVÁ, Veronika, Iva HOLUSKOVÁ, Tereza KRATOCHVÍLOVÁ, Petra STRAŠILOVÁ a Marek ĽUBUŠKÝ. Klinický význam neinvazivního stanovení KEL genotypu plodu v managementu těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. *Postgraduální medicína*. 2016, **18**(4), 358-361. ISSN 1212-4184.
- [25] LINHARTOVÁ, Eva a Michaela BECHYŇOVÁ. *Vyšetření krevní skupiny ABO Rh(D) sloupcovou aglutinací DG Gel: Standardní operační postup - metodický č. IISOPM\_8OKB\_L34/2008-6*. 6. Fakultní nemocnice v Motole - Oddělení krevní banky, 2008, 12 s. ČSN ISO 15189:2013.
- [26] DG Gel ABO/Rh (2D). In: *Grifols: Innovative diagnostic solutions* [online]. [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://www.diagnostic.grifols.com/en/dg-gel-cards/product-specifications>
- [27] LINHARTOVÁ, Eva, Martin MATĚJČEK a Michela BECHYŇOVÁ. *Vyšetření krevní skupiny ABO Rh(D) zkumavkovou metodou: Standardní operační postup - metodický č. IISOPM\_8OKB\_L01/2008-6*. 6. Fakultní nemocnice v Motole - Oddělení krevní banky, 2008, 11 s. ČSN ISO 15189:2013.
- [28] LINHARTOVÁ, Eva a Michaela BECHYŇOVÁ. *Screening antierytrocytárních protilátek – sloupcová aglutinace Bio-Rad: Standardní operační postup - metodický č. IISOPM\_8OKB\_L04/2008-8*. 8. Fakultní

nemocnice v Motole - Oddělení krevní banky, 2008, 10 s. ČSN ISO 15189:2013.

- [29] LINHARTOVÁ, Eva a Michaela BECHYŇOVÁ. *Identifikace antierytrocytárních protilátek- Grifols: Standardní operační postup - metodický č. IISOPM\_8OKB\_L11/2008-5*. 5. Fakultní nemocnice v Motole - Oddělení krevní banky, 2008, 10 s. ČSN ISO 15189:2013.
- [30] LINHARTOVÁ, Eva a Michaela BECHYŇOVÁ. *Vyšetření fenotypu v Rh systému- ImmuMed: Standardní operační postup - metodický č. IISOPM\_OKB\_L13/2008-6*. 6. Fakultní nemocnice v Motole - Oddělení krevní banky, 2008, 10 s. ČSN ISO 15189:2013.
- [31] LINHARTOVÁ, Eva a Michaela BECHYŇOVÁ. *Vyšetření fenotypu Rh-Kell sloupcovou aglutinací: Standardní operační postup - metodický č. IISOPM\_8OKB\_L36/2009-6*. 6. Fakultní nemocnice v Motole - Oddělení krevní banky, 2009, 12 s. ČSN ISO 15189:2013.
- [32] LINHARTOVÁ, Eva a Michaela BECHYŇOVÁ. *Titrace antierytrocytárních protilátek: Standardní operační postup - metodický č. IISOPM\_8OKB\_L10/2008-6*. 6. Fakultní nemocnice v Motole - Oddělení krevní banky, 2008, 11 s. ČSN ISO 15189:2013.
- [33] LINHARTOVÁ, Eva a Hermine OSWALD. *Vyšetření autoprotilátek v séru pacienta: Standardní operační postup - metodický č. IISOPM\_8OKB\_L24/2008-5*. 5. Fakultní nemocnice v Motole - Oddělení krevní banky, 2008, 12 s. ČSN ISO 15189:2013.

- [34] LINHARTOVÁ, Eva a Hermine OSWALD. *Vyšetření volných imunních protilátek u novorozence: Standardní operační postup - metodický č.* IISOPM\_8OKB\_L21/2008-8. 8. Fakultní nemocnice v Motole - Oddělení krevní banky, 2008, 12 s. ČSN ISO 15189:2013.
- [35] LINHARTOVÁ, Eva a Hermine OSWALD. *Přímý antiglobulinový test – kvalitativní vyšetření: Standardní operační postup - metodický č.* IISOPM\_8OKB\_L08/2008-5. 5. Fakultní nemocnice v Motole - Oddělení krevní banky, 2008, 11 s. ČSN ISO 15189:2013.
- [36] LINHARTOVÁ, Eva a Hermine OSWALD. *Přímý antiglobulinový test – kvantitativní vyšetření: Standardní operační postup - metodický č.* IISOPM\_8OKB\_L09/2008-5. 5. Fakultní nemocnice v Motole - Oddělení krevní banky, 2008, 11 s. ČSN ISO 15189:2013.
- [37] KOSTROUCHOVÁ, H., J. TYLEČKOVÁ a R. GERYCHOVÁ. Hemolytická nemoc plodu a novorozence. *Transfúze a hematologie dnes* [online]. 2022, (4), 221-225 [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: doi:10.48095/cctahd2022prolekare.cz13
- [38] MYLE, Akshay a Ghanim AL-KHATTABI. Hemolytic Disease of the Newborn: A Review of Current Trends and Prospects. *Pediatric Health, Medicine and Therapeutics* [online]. 2021, **12**, 491-498 [cit. 2023-05-05]. ISSN 1179-9927. Dostupné z: doi:10.2147/PHMT.S327032
- [39] In: *Praktická imunohematologie - erytrocyty. 2.*, přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2022, s. 315. ISBN 978-80-271-3377-2.

- [40] AJ, Esan. *Hemolytic Disorders of the Newborn, Current Methods of Diagnosis and Treatment: A Review Study* [online]. 2016, 3(1), 1-18 [cit. 2023-05-05]. ISSN 25722999. Dostupné z: doi:10.24966/HBTD-2999/100008
- [41] HOLUSKOVÁ, Iva, Marek LUBUŠKÝ, Martina STUDNIČKOVÁ a Martin PROCHÁZKA. Incidence erytrocytární aloimunizace u těhotných žen v olomouckém regionu. *Česká gynekologie* [online]. 2013, 78(1), 56-61 [cit. 2023-04-30]. ISSN 1210-7832. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2013-1-3/incidence-erytrocytarni-aloimunizace-u-tehotnych-zen-v-olomouckem-regionu-40169>

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 1 – Biochemické složení krevních skupin AB0 systému [4].....   | 13 |
| Obrázek 2- Stavba IgG [8] .....  | 18 |
| Obrázek 3 – Výsledky vyšetření krevních skupin AB0 systému a antigenu D [14].....  | 25 |
| Obrázek 4 - Vyhodnocení sloupcové gelové aglutinace [15].....  | 26 |
| Obrázek 5- Karta DG Gel AB0/Rh (Grifols) [26] .....  | 36 |
| Obrázek 6 -Výšečový graf procentuálního zastoupení typů HON v roce 2018 .....  | 47 |
| Obrázek 7 - Výšečový graf procentuálního zastoupení typů HON v roce 2019 .....   | 48 |
| Obrázek 8 - Výšečový graf procentuálního zastoupení typů HON v roce 2020 .....   | 50 |
| Obrázek 9 - Výšečový graf procentuálního zastoupení typů HON v roce 2021 .....   | 51 |
| Obrázek 10 - Výšečový graf procentuálního zastoupení HON v období let 2018-2022.....   | 52 |
| Obrázek 11 - Přehled celkově provedených laboratorních metod na Oddělení krevní banky v FN Motol v období let 2018-2022 .....    | 53 |
| Obrázek 12 – Přehled prenatálně provedených laboratorních metod na Oddělení krevní banky v FN Motol v období let 2018-2022 ..... | 54 |
| Obrázek 13 - Přehled laboratorně vyšetřených krevních skupin novorozence v období 2018-2022.....                                 | 55 |
| Obrázek 14 -Graf s přehledem počtu vyšetřených PAT a autoprotilátek za období let 2018-2022 .....                                | 56 |
| Obrázek 15 - Graf s přehledem počtu vyšetřených VIP a provedených titrací protilátek .....                                       | 56 |
| Obrázek 16 - Přehled novorozenců s HON za jednotlivé roky.....   | 57 |

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 17 - Přehled pozitivně vyšetřených protilátek AB0 systému způsobující HON v období 2018-2022 ..... | 58 |
| Obrázek 18 – Přehled pozitivně vyšetřených protilátek anti-D způsobující HON v období 2018-2022 .....      | 59 |
| Obrázek 19 - Přehled pozitivně vyšetřených protilátek anti-c způsobující HON v období 2018-2022 .....      | 59 |
| Obrázek 20 - Přehled pozitivně vyšetřených protilátek anti-E v období 2018-2022.....                       | 59 |
| Obrázek 21 - Přehled pozitivně vyšetřených směsí protilátek anti-D+C v období 2018-2022.....               | 60 |
| Obrázek 22 – Přehled pozitivně vyšetřených směsí protilátek anti-c+E v období 2018-2022 .....              | 60 |
| Obrázek 23 - Přehled pozitivně vyšetřených směsí protilátek anti-c+S v období 2018-2022.....               | 61 |
| Obrázek 24 – Přehled pozitivně vyšetřených protilátek anti-M v období 2018-2022.....                       | 61 |
| Obrázek 25 - Přehled pozitivně vyšetřených protilátek anti-s v období 2018-2022.....                       | 62 |

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

|   |    |
|---|----|
| Tabulka 1 – Charakteristika krevních skupin AB0 systému [1].....  | 14 |
| Tabulka 2- Nejčastější protilátky způsobující HON [4] .....   | 21 |
| Tabulka 3 – Kritické titry aloprotilátek [17] .....   | 28 |
| Tabulka 4 - Vyšetřené HON na Oddělení krevní banky v FN Motol v roce 2018 .....   | 46 |
| Tabulka 5 - Vyšetřené HON na Oddělení krevní banky v FN Motol v roce 2019 .....   | 48 |
| Tabulka 6 - Vyšetřené HON na Oddělení krevní banky v FN Motol v roce 2020.....  | 49 |
| Tabulka 7 - Vyšetřené HON na Oddělení krevní banky v FN Motol v roce 2021 .....   | 50 |
| Tabulka 8 - Vyšetřené HON na Oddělení krevní banky v FN Motol v roce 2022.....  | 51 |
| Tabulka 9- Přehled celkových laboratorních metod provedených na Oddělení krevní banky v FN Motol v období let 2018-2022 .....             | 53 |
| Tabulka 10 - Prenatální vyšetření provedená na Oddělení krevní banky v FN Motol v období let 2018-2022 .....                              | 54 |
| Tabulka 11 - Přehled laboratorně vyšetřených krevních skupin novorozence na Oddělení krevní banky v FN Motol v období let 2018-2022 ..... | 54 |
| Tabulka 12 – Přehled provedených laboratorních metod na Oddělení krevní banky v FN Motol v období let 2018-2022 .....                     | 55 |
| Tabulka 13 – Přehled počtu novorozenců s HON za jednotlivé roky .....   | 57 |

# 12 SEZNAM PŘÍLOH

F31: Imunohematologické vyšetření u suspektního HON  
Verze: 02

Platnost od: 1. 4. 2013  
Odd. krevní banky FN Motol

## IMUNOHEMATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ U SUSPEKTNÍHO HON

| MATKA        |
|--------------|
| Příjmení:    |
| Jméno:       |
| Rodné číslo: |

| DÍTĚ         |
|--------------|
| Příjmení:    |
| Jméno:       |
| Rodné číslo: |

### Výsledky vyšetření

| Krevní skupina:                      |
|--------------------------------------|
| Screening nepravidelných protilátek: |

| Krevní skupina:  |
|--|
| Přímý antiglobulinový test: IgG:   |
| Vyšetření volných protilátek v systému ABO ze séra dítěte:<br>s dg.erytrocyty KS<br>Kontrolní screening nepravidelných protilátek: |

### Další vyšetření

| Fenotyp Rh/Hr: |
|----------------|
|                |

| Fenotyp Rh/hr: |
|----------------|
|                |

Datum:

Datum:

Vyšetření provedl:

Vyšetření provedl:

| Závěr: |
|--------|
|        |

Hodnotil: