



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Stanovení titru anti-A a anti-B u dárců krve krevní skupiny 0

Measurement of anti-A and anti-B Titres at Blood Donors Group O

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: plk. MUDr. Miloš Bohoněk, Ph.D.

Kateřina Nováková

Kladno 2018

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Kateřina Nováková**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Stanovení titru anti-A a anti-B u dárců krve krevní skupiny 0**
Téma anglicky: Measurement of anti-A and anti-B Titres at Blood Donors Group 0

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Předmětem bakalářské práce bude měření titru protilátek anti-A a anti-B v plazmě dárců s krevní skupinou 0 a následné využití výsledků v rámci problematiky podávání plné krve jako transfuzního přípravku z vitální indikace při léčbě polytraumat a masivního krvácení.

V teoretické části budou popsány základy imunohematologie a předtransfuzního vyšetření a základy účelné hemoterapie, s důrazem na transfuzní léčbu masivního krvácení.

Praktická část bakalářské práce bude spočívat v měření titru pomocí analyzátoru Galileo NEO-Iris f.Immucor, v porovnání s manuálním stanovením titru metodou sloupcové aglutinace. Naměřené titry budou statisticky vyhodnoceny s grafickým porovnáním. Cílem bude mj. zjistit procento dárců s výskytem tzv. nízkého titru protilátek anti-A a anti-B využitelných pro výrobu „univerzální“ plné krve k použití z vitální indikace.

Seznam odborné literatury:

- [1] ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST, Transfuzní lékařství, Praha: Grada, 2013, 237 s., ISBN 978-80-247-4534-3
- [2] PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ, Hematologie a transfuzní lékařství, Praha: Grada, 2012, 192 s., ISBN 978-80-247-3460-6
- [3] YAZER M.H. et al., Initial safety and feasibility of cold-stored uncrossmatched whole blood transfusion in civilian trauma patients, J.Trauma Acute Care Surg, číslo 81, 2016, Nr 1: 21-26
- [4] BELIN T.R. et al., An evaluation of methods for producing low-titer group O whole blood to support military trauma resuscitation, J.Trauma Acute Care Surg, ročník 82, číslo 6, 2017, Supp 1: S79-85
- [5] SPROGOE U. et al., Minimal variation in anti-A and anti-B titers among healthy volunteers over time: implications for the use of out-of-group blood components, J.Trauma and Acute Care Surg, 2017, Publish Ahead of Print

Zadání platné do: 13.09.2019

Vedoucí: pplk. MUDr. Miloš Bohoněk, Ph.D.

Konzultant: Ing. Ludmila Landová, Ph.D.

vedoucí katedry / pracoviště

děkan

V Kladně dne 25.10.2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Stanovení titru anti-A a anti-B u dárců krve krevní skupiny 0 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).

V Kladně dne 18.05.2018

.....
Kateřina Nováková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé práce, panu plk. MUDr. Miloši Bohoňkovi, Ph.D. za ochotu vést moji práci, za cenné rady a připomínky a v neposlední řadě také za jeho čas, který mé práci věnoval. Dále bych chtěla poděkovat mé konzultantce, paní Ing. Ludmile Landové, Ph.D. za pomoc se zpracováním a vyhodnocením výsledků a také pracovníkům Oddělení hematologie a krevní transfuze v Ústřední vojenské nemocnici v Praze za jejich ochotu a pomoc při měření vzorků.

Abstrakt

Předmětem bakalářské práce je zjistit procentuální podíl dárců krve krevní skupiny 0 s tzv. nízkým titrem protilátek anti-A a anti-B v plazmě. Titrace byla prováděna na analyzátoru Galileo NEO Iris a část z nich porovnána s výsledky manuálních metod – zkumavkovým testem a sloupcovou aglutinací.

Teoretická část bakalářské práce se zabývá imunohematologií erytrocytů, kde jsou probrána především následující témata – erytrocytární antigeny, antierytrocytární protilátky a krevní skupiny s důrazem na AB0 a Rh systém. Kromě toho jsou zde popsány základní imunohematologické techniky. Dále jsou v práci popsány transfuzní přípravky, které jsou v současné době používány, předtransfuzní vyšetření prováděná před jejich aplikací a také základy účelné hemoterapie. V neposlední řadě jsou v práci také zmíněny potransfuzní reakce a komplikace, které mohou v důsledku podání transfuze nastat.

Metodika práce popisuje základní principy a pracovní postupy u použitých metod – analyzátoru Galileo NEO Iris, zkumavkového testu a manuální sloupcové aglutinace.

Ve výsledcích jsou naměřené hodnoty zpracované pomocí grafů a tabulek, nechybí ani jejich statistické zhodnocení, které poskytuje mj. informace o vzájemné korelaci použitých metod. Získané výsledky jsou porovnány s výsledky z jiných zemí světa.

Klíčová slova

hemoterapie; masivní krvácení; plná krev; potransfuzní reakce; protilátky proti erytrocytům; titrace protilátek

Abstract

The subject of the Bachelor's thesis is to find out the percentage of blood donors type O with low titer of anti-A and anti-B antibodies. The titration was made on the analyzer Galileo NEO Iris and some of them compared with the manual methods – the tube test and the column agglutination.

Theoretical part of the Bachelor's thesis describes the immunohematology of the red blood cells, especially these topics: red blood cells antibodies and antigens and blood groups (mainly ABO and Rh systems). There are also described the basic immunohematological tests. Blood products, pre-transfusion testing and the principles of effective hemotherapy and post-transfusion reaction and complication are also described there.

In the methods are the principles and the workflows of the used techniques – analyzer Galileo NEO Iris, tube test and column agglutination.

The results of the Bachelor's thesis are compared using the diagrams and tables. There is also a statistic evaluation of the results, which also provides information on the correlation of the methods used. The obtained results are compared with the results from other countries.

Keywords

hemotherapy; massive bleeding; whole blood; post-transfusion reactions; red blood cells antibodies; titration of antibodies

Obsah

1	Úvod	11
2	Současný stav	12
2.1	Obecné pojmy imunologie	12
2.1.1	Antigeny	12
2.1.2	Antigenicita	12
2.1.3	Imunogenicita	13
2.1.4	Protilátky	13
2.2	Imunohematologie erytrocytů	14
2.2.1	Erytrocytární antigeny (aglutinogeny)	14
2.2.2	Antierytrocytární protilátky (aglutininy)	15
2.2.3	Krevní skupiny	16
2.2.4	AB0(H) systém krevních skupin.....	16
2.2.5	Rh systém krevních skupin.....	20
2.2.6	Ostatní systémy krevních skupin.....	21
2.3	Základní imunohematologické techniky	22
2.3.1	Reakce antigenu a protilátky	23
2.3.2	Aglutinace.....	23
2.4	Transfuzní přípravky	25
2.4.1	Plná krev	26
2.4.2	Erytrocytární transfuzní přípravky.....	26
2.4.3	Trombocytární transfuzní přípravky	28
2.4.4	Plazmatické transfuzní přípravky	29
2.5	Předtransfuzní vyšetření	30

2.5.1	Vyšetření krevní skupiny AB0 a antigenu D.....	30
2.5.2	Screeningové vyšetření nepravidelných protilátek proti erytrocytům ...	31
2.5.3	Test kompatibility	32
2.5.4	Mimořádné situace.....	32
2.6	Hemoterapie	34
2.6.1	Imunologická rizika hemoterapie – stimulační a inhibiční účinky	34
2.6.2	Léčba erytrocytárními transfuzními přípravky	35
2.6.3	Léčba trombocytárními transfuzními přípravky	36
2.6.4	Léčba plazmatickými transfuzními přípravky	37
2.6.5	Léčba masivního krvácení.....	38
2.7	Polytrauma	38
2.8	Potransfuzní reakce	39
2.8.1	Reakce TRALI (transfusion related acute lung injury)	40
2.8.2	Bakteriálně toxická potransfuzní reakce.....	40
2.8.3	Akutní hemolytická potransfuzní reakce (HTR).....	40
2.8.4	Alergická potransfuzní reakce	41
2.8.5	Hypervolemie (reakce TACO).....	41
2.8.6	Hypotermie	42
2.8.7	Hyperkalemie	42
2.8.8	Potransfuzní infekce.....	42
3	Cíl práce	43
4	Metodika	44
4.1	Biologický materiál.....	44
4.2	Zkumavkový test.....	44

4.2.1	Vybavení potřebné pro provedení testu.....	44
4.2.2	Provedení testu.....	45
4.2.3	Hodnocení výsledku testu	46
4.3	Metoda sloupcové aglutinace	47
4.3.1	Vybavení potřebné pro provedení testu.....	47
4.3.2	Provedení testu.....	48
4.3.3	Hodnocení výsledku testu	49
4.4	Analyzátor Galileo NEO Iris	50
4.4.1	Princip metod.....	51
4.4.2	Postup měření.....	52
5	Výsledky.....	54
5.1	Měření na analyzátoru Galileo NEO Iris.....	54
5.1.1	Stanovení titru protilátek třídy IgM.....	55
5.1.2	Stanovení titru protilátek třídy IgG.....	56
5.2	Měření pomocí manuálních metod.....	57
5.2.1	Stanovení titru protilátek třídy IgM.....	57
5.2.2	Stanovení titru protilátek třídy IgG.....	58
5.3	Vzorky v rozsahu nízkého titru.....	59
5.3.1	Vzorky splňující možné podmínky pro výrobu univerzální plné krve..	60
5.4	Srovnání výsledků z analyzátoru a manuálních metod	61
5.4.1	Statistické zhodnocení měření.....	62
6	Diskuze	64
7	Závěr	68
8	Seznam použitých zkratk.....	69

9	Seznam použité literatury	72
10	Seznam použitých obrázků	75
11	Seznam použitých tabulek	76

1 ÚVOD

Imunohematologie erytrocytů se zabývá různými erytrocytárními antigeny a antierytrocytárními protilátkami. Pokud není v krvi přítomen daný antigen, je přítomna protilátka proti tomuto antigenu. V případě, že by došlo k současnému výskytu antigenu a protilátky proti danému antigenu v krvi jedince (např. po podání transfuze), dojde k destrukci vlastních erytrocytů. Přírozené protilátky proti erytrocytům anti-A a anti-B patří do třídy IgM. Jsou produkovány B lymfocyty jako odpověď na přítomnost antigenů na povrchu červených krvinek, které jsou v krvi daného jedince. Anti-A a anti-B protilátky mohou být i třídy IgG, ovšem ty již nejsou přírozené a vznikají jako důsledek imunizace (např. během těhotenství).

Stanovení titru anti-A a anti-B protilátek není rutinním imunohematologickým vyšetřením v rámci klinické imunohematologie ani při screeningu dárců krve a jejich složek. Transfuzní přípravky jsou pacientům podávány s ohledem na jejich krevní skupinu, tudíž je riziko reakce inkompatibilních antigenů a protilátek minimální. V případě indikace transfuzních přípravků z vitální indikace, kdy není známa krevní skupina příjemce, jsou podávány univerzální přípravky (plazma AB, erytrocyty 0). Současná transfuzní služba, v souladu se zásady účelné hemoterapie, vyrábí především jednotlivé krevní složky (erytrocyty, plazmu, trombocyty) a plná krev byla dlouhou dobu považována za přežitý přípravek zatížený řadou rizik. V poslední době ale ve světě dochází ke změně pohledu na použití plné krve, jako ideálního přípravku pro tzv. hemostatickou resuscitaci při masivním krvácení a polytraumatech. Aby mohla být plná krev krevní skupiny 0 používána jako univerzální transfuzní přípravek z vitální indikace, je vhodné mít k dispozici přípravky s nízkým titrem přírodních protilátek anti-A anti-B. O bezpečné výši „nízkého titru“ se vedou diskuze, jednou z obecně akceptovatelných možných horních hranic je titer 1:128.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Obecné pojmy imunologie

Mezi základní pojmy imunologie patří mj. antigeny a protilátky. [1]

2.1.1 Antigeny

Antigeny jsou obecně definovány jako substance, které je imunitní systém schopen rozpoznat a reagovat na ně prostřednictvím protilátek (produktů specifické imunitní odpovědi). Mohou to být v podstatě jakékoliv chemické struktury. Aby však antigen vyvolal reakci imunitního systému, je potřeba, aby byl rozeznán ve formě makromolekuly. Hapten (malá antigenní molekula) není sám o sobě schopen navodit imunitní odpověď, proto musí být navázán na imunogenní nosič. Nejčastějšími zástupci těchto makromolekul jsou proteiny či komplexní polysacharidy, dále pak lipidy či lipoproteiny. Část antigenu, kterou imunitní systém rozezná a reaguje na ni, se nazývá epitop (antigenní determinant). [2, 3, 4]

2.1.2 Antigenicita

Jako antigenicitu označujeme schopnost antigenu specificky vázat protilátky či receptory T lymfocytů. V rámci imuno hematologie se ve většině případů jedná o antigeny, které přímo aktivují B lymfocyty a tím zahájí proces tvorby protilátek, nepotřebují k tomu pomoc T lymfocytů. Jako příklad mohou být uvedeny polysacharidové antigeny krevních skupin. B lymfocyt nebo již vytvořená protilátka rozpoznají tento antigen podle uspořádání jeho molekuly v epitopu. Dojde k aktivaci B lymfocytů, při které různé klony lymfocytů, jež jsou specifické pro daný antigen, začnou produkovat protilátky (heterogenní směs protilátek), kdy každá z nich je specifická pro různé antigenní determinanty antigenu. [3]

2.1.3 Imunogenicita

Pojmem imunogenicita se rozumí navození imunitní odpovědi na patogenní molekulu, přičemž intenzita této odpovědi závisí na několika faktorech. Antigeny, které jsou schopny vyvolat imunitní odpověď organismu, se nazývají imunogeny. Obecně platí, že čím větší je patogenní molekula, tím silnějším je imunogenem; více imunogenní jsou také složené komplexy oproti „jednoduchým“ molekulám; co se týká fyzikální formy, platí, že pevná částice je více imunogenní než solubilní formy. Vliv na míru projevu imunogenicity má také způsob podání (např. intravenózní, subkutánní, perorální apod.) [1, 3, 5]

2.1.4 Protilátky

Protilátky (imunoglobuliny) jsou hlavní složkou γ -globulinové frakce plazmatických bílkovin. Z biochemického hlediska se jedná o glykoproteiny. Vznikají jako odpověď na přítomnost imunogenu (antigenu, který dokáže vyvolat imunitní odpověď organismu) v organismu, kdy s tímto antigenem začnou specificky reagovat. Tato reakce spočívá v komplementaritě protilátky a specifického antigenního epitopu. Další funkcí imunoglobulinů je např. schopnost vázat komplement, čímž dojde k uvolnění biologicky aktivních molekul, což může vést jednak k lýze buňky, nebo se tyto molekuly mohou připojit na jiné buňky, které pro ně mají receptor (např. lymfocyty, žírné buňky) a tím je aktivovat. [3, 6]

Molekula všech imunoglobulinů má obdobnou strukturu – skládá se ze dvou lehkých a ze dvou těžkých polypeptidických řetězců, které jsou vzájemně spojeny disulfidickými můstky. Rozlišujeme pět typů těžkých řetězců (γ , α , μ , δ a ϵ), které se liší ve složení a počtu aminokyselin. Na základě těchto odlišností rozlišujeme jednotlivé třídy imunoglobulinů – IgG, IgM, IgA, IgE a IgD. Lehké řetězce jsou dvojího typu – lambda nebo kappa. Molekula imunoglobulinu má vždy oba těžké a lehké řetězce identické. Každý ze zmíněných typů řetězců má variabilní (Fab) a konstantní (Fc) část. Vazba antigenu na protilátku je zprostředkována pomocí

oblastí variabilních částí (tzv. paratopů) lehkého a těžkého řetězce, které se u různých protilátek liší, a díky tomu se mohou jednotlivé protilátky zaměřovat proti rozdílným antigenům. Každý imunoglobulin může vázat dva totožné antigeny. Konstantní oblasti jsou u všech protilátek jedné třídy stejné. [4, 5, 6]

2.2 Imunohematologie erytrocytů

Imunohematologie erytrocytů se zabývá především krevními skupinami a s nimi spojenou problematikou, která se týká zejména antigenů krevních skupin a protilátek proti nim tvořených. [7]

2.2.1 Erytrocytární antigeny (aglutinogeny)

Z pohledu imunohematologie je antigen struktura membrány krevní buňky, která je definována lidskou aloprotilátkou. Erytrocytární antigeny zastávají v buňce různé funkce. Do membrány erytrocytu integrované strukturální glykosylující membránové lipidy a proteiny, vyskytující se u krevních skupin AB0, H, I, Lewis a P, se podílí na udržení tvaru erytrocytu. Oproti tomu funkční proteiny, které se vyskytují u krevních skupin Rh, Kidd, Colton, MNS, Lutheran, Kell a Ch/Rg, mají enzymatickou aktivitu, podílí se na transportu v buňce, regulují komplement, plní funkce receptorů pro ligandy a uplatňují se i v adhezi. Celkem bylo k roku 2016 identifikováno 346 erytrocytárních antigenů. Z tohoto počtu jich je 308 zařazeno do 36 systému krevních skupin, 15 antigenů je v 6 kolekcích antigenů, dalších 17 je v LFA sérii (antigeny s nízkou frekvencí výskytu) a zbývajících 6 antigenů je v HFA sérii (antigeny s vysokou frekvencí výskytu). Podle biochemického složení se jedná o:

- proteiny či glykoproteiny (proteinové antigeny), které se odlišují buď přítomností či absencí celé bílkoviny – příkladem je RhD antigen, nebo změnou jedné aminokyseliny v řetězci, což je případem většiny ostatních antigenů;

- terminální sacharidové/karbohydrátové oblasti glykoproteinů a glykolipidů (sacharidové antigeny). [3, 4, 7, 8]

Erytrocytární antigeny rozlišujeme podle místa syntézy na endogenní a exogenní. Syntéza endogenních antigenů probíhá přímo v erytrocytech a jsou zakotveny v jejich membráně. Řadí se sem většina systémů krevních skupin. Exogenní antigeny jsou syntetizovány v jiných buňkách než v erytrocytech; po uvolnění z místa syntézy jsou transportovány až k samotným erytrocytům, na jejichž povrch adherují a tím se stávají jejich antigeny. Mezi exogenní antigeny patří pouze dva systémy – Lewis a Chido/Rodgers. [4]

2.2.2 Antierytrocytární protilátky (aglutininy)

V rámci imunohematologie se setkáváme s protilátkami třídy IgG a IgM, vzácně s IgA protilátkami. Nejvíce jsou v plazmě zastoupeny protilátky třídy IgG, které se vyskytují ale i extravaskulárně, avšak v obou místech výskytu jsou přítomny ve formě monomerů. Na rozdíl od IgM protilátek mohou procházet přes placentární bariéru do oběhu plodu a způsobit senzibilizaci a destrukci erytrocytů plodu. IgG protilátky se označují jako imunitní či nepravidelné a tvoří se v přítomnosti cizích erytrocytů, které se do těla dotyčného dostanou pomocí krevní transfuze. Další způsob, jak mohou vznikat je v průběhu těhotenství. IgM protilátky se vyskytují v plazmě ve formě pentamerů. Oproti IgG protilátkám mají IgM vysokou lytickou schopnost, dokáží způsobit hemolýzu (např. při podání AB0 inkompatibilní transfuze). Tvar pentameru jim umožňuje snadněji aglutinovat. Protilátky třídy IgM jsou označovány jako přirozené či pravidelné a v plazmě se běžně vyskytují – jedná se o protilátky anti-A a anti-B (výjimku tvoří krevní skupina AB, která tyto protilátky přítomné nemá). [3, 6, 7]

2.2.3 Krevní skupiny

Krevní skupina je definována jako popis vlastností sacharidů a bílkovin (jedná se o „znaky“ neboli antigeny erytrocytů) vyskytujících se na buněčné membráně červených krvinek daného jedince. Antigeny na povrchu erytrocytů tedy určují krevní skupinu. [9, 10]

Jedná se o vlastnosti jedince, které jsou děděny, prostřednictvím genů, od obou rodičů – každý z rodičů předává svému potomkovi vždy polovinu genetické výbavy. Každý jedinec má tak krevní skupinu tvořenou dvěma geny, které určují genotyp jeho krevní skupiny. Pokud zdědí jedinec dva totožné geny, jeho antigen bude ve výsledku homozygotní. Naopak pokud zdě oba geny odlišné, projeví se jako heterozygot. Ve fenotypu jedince se pak uplatňují následující genetické vztahy:

- **dominance** – dominantní alela úplně potlačí projev druhé alely (recesivní);
- **kodominance** – obě alely se projeví společně;
- **recesivita** – projev recesivní alely je potlačen alelou dominantní, tudíž se ve fenotypu neprojeví. [9]

2.2.4 AB0(H) systém krevních skupin

Tento systém byl objeven a popsán již v roce 1900 Karlem Landsteinerem. Svými pokusy rozlišil tři krevní skupiny, které označil A, B a C (později byly reklasifikovány na dnes známé A, B a 0). Tohoto rozlišení docílil tak, že sledoval, jak červené krvinky vyšetřovaných osob reagují na přidání séra jiných osob. Tímto svým objevem postavil základy praktické imunohematologie. O dva roky později byla objevena i čtvrtá krevní skupina – AB, na jejímž objevení se podílel i český lékař Jan Janský. [3, 7, 10]

Jedná se o systém, který má z transfuzního hlediska největší význam. Oproti ostatním systémům krevních skupin má jednu jedinečnou vlastnost, a to přítomnost tzv. přirozených protilátek proti antigenu (anti-A a anti-B), který se nenachází

na erythrocytech dané konkrétní osoby. Tyto protilátky mají velmi často hemolytický potenciál - při podání inkompatibilní transfuze jsou schopné, pomocí aktivace komplementu, způsobit hemolýzu červených krvinek. Následkem toho může dojít u dotyčné osoby k akutní hemolytické reakci, mající často až fatální následky. [7]

AB0 antigeny se vyskytují na erythrocytech a na ostatních krevních buňkách kromě granulocytů; na trombocyty jsou adsorbovány z plazmy. Pravděpodobně jsou přítomny i na buňkách kmenových a progenitorových. Kromě krevních buněk se vyskytují i na většině endotelových a epitelových buněk (např. ledvin, srdce, plic a slinivky); v plazmě, v tělních tekutinách a v sekretech jsou přítomny v rozpustné formě (u sekretorů). AB0 antigeny nejsou přítomny v mozkomíšním moku. [4, 9]

Z chemického pohledu se jedná o terminální oligosacharidy glykosylačních řetězců glykolipidů a glykoproteinů, přítomných v membránách buněk. Tyto oligosacharidy se skládají z řetězců D-glukózy, D-galaktózy, D-manózy, N-acetyl-D-glukosaminu, N-acetyl-D-galaktosaminu a L-fukózy. [3, 7]

AB0 systém má celkem tři antigeny – A, B a H, které však nejsou přímým produktem alel genu AB0 (gen má celkem tři alely – dvě kodominantní – A, B a jednu recesivní – 0), ale alely tohoto genu kódují syntézu glykosyltransferázy. Jedná se o enzym, jež má za úkol katalyzovat přenos a připojení jednotlivých molekul monosacharidu ke galaktóze prekurzorového H antigenu. O tom, jaký monosacharid bude připojen rozhodují AB0 alely genu. [3, 4, 10]

Gen H podmiňuje syntézu H-transferázy – ta připojuje monosacharid L-fukózu ke galaktóze oligosacharidového řetězce, čímž vzniká prekurzorový H antigen. Pro krevní skupinu 0 je tento monosacharid terminální a imunodominantní, neboť u alel genu 0 nebyl zjištěný žádný proteinový produkt a pravděpodobně postrádá transferázovou aktivitu – je inaktivní. V důsledku toho nedochází k připojení žádného dalšího monosacharidu na H prekurzor. Pro ostatní krevní skupiny je

pouze receptorem pro připojení dalších sacharidů. Lidé s krevní skupinou A mají gen A, který dává vzniku A-transferáze. A-transferáza katalyzuje připojení N-acetyl-D-galaktosaminu k prekurzorovému H antigenu. Terminálním a imunodominantním monosacharidem antigenu A je tedy N-acetyl-D-galaktosamin. Obdobné je to i u krevní skupiny B – gen B podmiňuje tvorbu B-transferázy, která k H antigenu připojuje D-galaktózu. Pro antigen B tak platí, že jeho terminální imunodominantní monosacharid je D-galaktóza. [3, 4, 7, 9]

Schopnost sekretovat A, B a H substance má na starost sekretový gen, který má dvě alely – dominantní Se a recesivní se. Alely genu neovlivňují přímo transferázy, ale mají vliv na přítomnost či deficit H substance v sekretech. Přibližně 80% jedinců má schopnost tyto substance sekretovat, tím pádem musí být nosiči alespoň jedné dominantní alely genu – jejich genotyp je buď Se/Se, nebo Se/se a říkáme jim sekretoři. Naopak jedinci s genotypem se/se tuto schopnost postrádají, proto označení non-sekretoři. [3, 9]

V důsledku vzniku transferáz s odlišnými vlastnostmi jsou u jednotlivých fenotypů krevních skupin přítomny různé podskupiny. U fenotypu A jsou nejčastěji přítomny podskupiny A₁ nebo A₂. Liší se např. rozdílným počtem antigenních míst (A₁ jich má přibližně 3,5x více), dále přítomností antigenu – A₁ má kromě antigenu A i antigen A₁. Podskupina A₂ má přítomné protilátky anti-B a někdy navíc i anti-A₁. Kromě A₁ a A₂ podskupin existují i další – např. A₃, A_x, A_m, které vznikají při mutacích alel, mají sníženou biologickou aktivitu, což vede k slabé expresi A antigenu na povrchu erytrocytů. Jejich výskyt je však spíše vzácný. U fenotypu B většinou nebývají přítomné podskupiny, B-transferáza je obvykle uniformní. [3]

Tabulka 1 - Fenotypové projevy genotypů AB0 systému [9, vlastní zdroj]

Fenotyp	Genotyp	
A	A/A	A/0
B	B/B	B/0
AB	A/B	
0	0/0	

Protilátky, které se zde pravidelně vyskytují, se nazývají anti-A a anti-B. Tyto protilátky vznikají přirozenou imunizací a jejich výskyt u každého jedince závisí na jeho krevní skupině. Nejčastěji se jedná o imunoglobuliny třídy IgM. U jedinců s krevní skupinou 0 se vyskytuje protilátka anti-A, B, která je namířena proti antigenu A i B. V tomto případě se jedná o IgG protilátky. [3]

Při vyšetření AB0 skupiny se prokazuje přítomnost resp. absence A a B antigenu na povrchu membrány erytrocytů a AB0 protilátek v séru (či v plazmě) vyšetřované osoby. Je vyloučené, aby se v krvi jedince nacházel současně antigen a protilátka proti němu. V rutinním provozu se erytrocytové antigeny vyšetřují pomocí monoklonálních diagnostických protilátek anti-A a anti-B. AB0 protilátky se prokazují diagnostickými erytrocyty A₁ a B. Vyšetření se provádí při pokojové teplotě na sklíčku, v gelu, ve zkumavce aj. [3]

Tabulka 2 - Přehled antigenů a protilátek jednotlivých krevních skupin [3, vlastní zdroj]

Krevní skupina	AB0 antigeny	AB0 protilátky
0	H	anti-A, anti-B
A	A	anti-B
B	B	anti-A
AB	A, B	žádné

2.2.5 Rh systém krevních skupin

Tento systém je, hned po AB0, druhým nejvýznamnějším systémem krevních skupin. Celkově je u Rh systému známo 56 antigenů, přičemž mezi nejvýznamnější patří antigeny D, C, c, E a e. Tyto geny jsou kódovány dvěma homologními geny – RHCE a RHD, přičemž gen RHCE kóduje expresi antigenů C, c, E a e, zatímco gen RHD kóduje expresi D antigenu. Antigeny se vyskytují pouze na erytrocytech, případně i na jejich prekurzorech. V žádných jiných tkáních a buňkách není jejich přítomnost detekována. [3, 4]

Fyziologicky nejsou v séru žádného jedince přítomny přirozené protilátky proti antigenům tohoto systému, ojediněle se může vyskytovat anti-E. Příčinou vzniku Rh protilátek je podání inkompatibilní krevní transfuze, případně gravidita žen. [3]

Nejdůležitějším antigenem celého systému je antigen D. Podle toho, zda daný jedinec antigen D má či zda jej postrádá, rozlišujeme RhD pozitivní (mají D antigen) nebo RhD negativní (antigen D jim chybí) jedince. RhD pozitivní lidé mohou být pro tento antigen buď homozygoti (D/D), nebo hemizygoti (D/d). Antigen D nemá k sobě antitetický antigen d, toto označení se používá k vyjádření D negativního fenotypu. [3]

D antigen má za normálních okolností více než 30 epitopů. Existují ale případy, kdy se tyto epitopy odchylují, jak z kvalitativního, tak z kvantitativního pohledu od „normálu“ a takovým to antigenům říkáme variantní D antigeny. Řadíme sem v zásadě dva druhy, přičemž první z nich je tzv. slabý D antigen (D^{weak} , D^{w}). Příčinou vzniku takového antigenu je mutace genu, vedoucí k záměně aminokyselin D proteinu v jeho cytoplazmatické či membránové části. Důsledkem takovéto mutace je slabá exprese epitopů, ale jejich počet se nemění; liší se také reaktivitou s anti-D séry. Nositel této varianty genu nemá riziko vzniku anti-D protilátek a lze jej považovat za RhD pozitivního jedince. Druhou odchylku tvoří tzv. varianty antigenu D (D^{variant}), kdy příčinou jejich vzniku je mutace RHD genu či hybridní gen,

který vede k alteraci proteinu v jeho extracelulární části. V tomto případě dochází ke snížení počtu epitopů; s anti-D séry reagují též odlišně. Anti-D protilátky mohou vznikat u některých variant této mutace. Nositel D^{variant} antigenu je běžně považován jako RhD negativní jedinec, ovšem v případě, že se jedná o dárce krve, bere se jako RhD pozitivní. [3, 4, 7]

Při vyšetření fenotypu krevních skupin se vyšetřuje i C^w antigen. V tomto případě se nejedná o označení slabého antigenu C (jako je tomu u antigenu D, resp. D^w), ale přítomnost tohoto antigenu zeslabuje expresi antigenu C. V naší populaci je nositeli C^w antigenu zhruba 5 až 6 % obyvatel. I přes nízkou četnost jeho výskytu je potřeba jej vyšetřovat, neboť tento antigen je řazen k lokálně klinicky významným antigenům. [3, 4, 7]

2.2.6 Ostatní systémy krevních skupin

Kromě AB0 a RhD systémů existuje řada dalších, jejichž přehled je shrnut v následující tabulce. Vznik potransfuzních reakcí způsobených protilátkami některých z níže uvedených systémů není příliš častý, jedná se většinou o výjimečné případy. Příčinou této „výjimečnosti“ je velmi často fakt, že výskyt protilátek proti antigenům daných systémů je málo častý. [3, 7]

Tabulka 3 - Přehled systémů krevních skupin [7, vlastní zdroj]

ISBT No.	Systém	Hlavní antigeny
001	AB0	A, B
002	MNS	M, N, S, s, U
003	PIPk	P1
004	Rh	D, C, E, c, e, C ^w
005	Lutheran	Lu ^a , Lu ^b
006	Kell	K, k, Kp ^a , Kp ^b , Js ^a , Js ^b
007	Lewis	Le ^a , Le ^b
008	Duffy	Fy ^a , Fy ^b , Fy ³
009	Kidd	Jk ^a , Jk ^b , Jk ³
010	Diego	Di ^a , Di ^b , Wr ^a , Wr ^b
011	Yt	Yt ^a , Yt ^b
012	Xg	Xg ^a
013	Scianna	Sc1, Sc2
014	Dombrock	Do ^a , Do ^b , Gy ^a , Hy, Jo ^a
015	Colton	Co ^a , Co ^b , Co ³
016	Landsteiner-Wiener	LW ^a , LW ^b
017	Chido/Rodgers	Ch/Rg
018	H	H
019	Kx	Kx
020	Gerbich	Ge2, Ge3, Ge4
021	Cromer	Cr ^a
022	Knops	Kn ^a , Kn ^b
023	Indian	In ^a , In ^b
024	Ok	Ok ^a
025	Raph	MER2
026	John Milton Hagen	JMH
027	I	I
028	Globoside	P
029	Gill	GIL
030	RHAG	RHAG1, RHAG2

2.3 Základní imunohematologické techniky

Základní technikou používanou pro vyšetřování antigenů a protilátek jsou sérologické testy, které jsou založeny na hemaglutinaci (dále jen aglutinaci) erytrocytů. [7]

2.3.1 Reakce antigenu a protilátky

Připojení protilátky na antigen je možné díky nekovalentním vazbám. Mezi tyto vazby patří elektrostatické síly, vodíkové můstky, hydrofobní vazby a Van der Waalsovy síly. Jedná se o slabé reverzibilní vazby, které jsou schopny působit jen na malé vzdálenosti. Aby došlo k pevnému spojení antigenu a protilátky, je zapotřebí velké množství vazeb a zároveň jejich vzájemná komplementarita. Vliv na vznik spojení antigenu a protilátky mají následující faktory:

- **teplota** – teplotní optimum pro většinu klinicky významných IgG protilátek je 37°C, protilátky třídy IgM reagují nejlépe při laboratorní či nižší teplotě (patří sem i chladové protilátky, jejichž teplotní optimum je nižší než 20°C);
- **pH** – optimální průběh u většiny reakcí nastává při hodnotách pH kolem 7, k jehož udržení během vyšetření se používá pufovaný fyziologický roztok (PBS);
- **kvalitativní a kvantitativní vlastnosti antigenů a protilátek** – výsledek reakce je ovlivňován jak hustotou exprese antigenu na membráně erytrocytu, tak i množstvím (koncentrací) protilátky – protilátka je oproti antigenu v nadbytku, ovšem jedná-li se o extrémní nadbytek, dochází k inhibici aglutinace;
- **iontová síla prostředí** – ionty vyskytující se v prostředí reakce „obalují“ nabitě oblasti antigenů a protilátek, čímž znesnadňují jejich interakci – z toho tedy vyplývá, že snížením koncentrace Na⁺ a Cl⁻ iontů dojde ke usnadnění vazby protilátky, čehož docílíme použitím roztoku s nižším obsahem iontů (LISS); běžně se však jako diluent používá izotonický fyziologický roztok, který má významný obsah Na⁺ a Cl⁻ iontů. [3, 7]

2.3.2 Aglutinace

Ke shluku krvinek dochází při splnění dvou podmínek. První podmínka spočívá v navázání protilátky na antigen, tzv. senzibilizace erytrocytu. Druhou podmínkou je pak navázání alespoň jednoho dalšího erytrocytu na protilátku pomocí protilátkových vazeb. Zmíněné dvě podmínky splňují protilátky třídy IgM, proto se

v imunohematologii nazývají jako kompletní protilátky. Naopak IgG protilátky ve většině případů splňují pouze jednu podmínku, proto jsou označovány protilátkami inkompletními. Molekuly IgM aglutinují snadněji než IgG ze dvou hlavních důvodů – IgM protilátka má větší vzdálenost mezi vazebnými místy pro antigen a zároveň má pětkrát více vazebných míst než IgG. [3, 4, 7]

Obecný princip aglutinace je následující: erythrocyty mají na svém povrchu slabý záporný náboj. Diluent, který tvoří prostředí, v němž jsou erythrocyty rozptýleny, obsahuje ionty. Kolem erythrocytů tak tyto ionty vytváří další elektrostatické vrstvy, díky kterým se k sobě erythrocyty nemohou těsně přiblížit. Podle toho, zda dokáže určitá protilátka překonat takto vzniklou vzdálenost mezi dvěma erythrocyty, rozlišuje aglutinaci přímou a nepřímou. [3, 4, 7]

Přímá aglutinace je typická pro protilátky třídy IgM, neboť jsou schopny překonat vzdálenost mezi dvěma erythrocyty, čímž dochází ke vzniku aglutinace. Přímou aglutinující IgG protilátky se vyskytují pouze ojediněle, jako příklad můžeme uvést některé protilátky anti-A a anti-B. V laboratořích se přímé aglutinační testy mohou provádět sklíčkovou metodou, zkumavkovým testem, metodou pevné fáze či technikou sloupcové aglutinace. V praxi se přímá aglutinační vyšetření používají mj. k detekci erythrocytových antigenů AB0 systému, Rh systému či k detekci antierythrocytových protilátek. Aglutinační testy je možné také využít pro kvantitativní stanovení protilátky v geometricky ředěném vzorku séra. Nejvyšší ředění, při kterém dojde ještě k aglutinaci, označujeme jako titr. Vyšetřování titru protilátek se používá např. u těhotných žen a při vyšetření protilátek AB0 systému u dárců krve. [3, 4, 7]

Nepřímá aglutinace je typická pro většinu IgG protilátek, které nejsou schopny překlenout vzdálenost mezi dvěma erythrocyty, tudíž nedochází k aglutinaci erythrocytů, ale pouze k jejich senzibilizaci. Pro dosažení aglutinace je potřeba do reakce přidat další substance – např. anti-IgG antiglobulinové sérum (AGH)

či enzym, které zajistí spojení senzibilizovaných erytrocytů a vizualizuje tak aglutinační reakci. Nejdůležitější testy v rámci nepřímé aglutinace jsou antiglobulinové testy (též. AGH testy, Coombsovy testy), které rozlišujeme přímé a nepřímé. Přímý antiglobulinový test (PAT) nám umožňuje detekovat erytrocyty, které byly senzibilizovány protilátkou přímo v organismu. V praxi se PAT provádí při průkazu imunitního typu hemolýzy u pacientů po transfuzích, u potransfuzních reakcí, u hemolytického onemocnění novorozence a další. Pomocí nepřímého antiglobulinového testu (NAT) detekujeme protilátky proti erytrocytům, které jsou volně v plazmě či v séru. K jejich průkazu je potřeba použít AGH sérum a následná inkubace vyšetřovaného séra s antigeny erytrocytů. NAT se uplatňuje při průkazu klinicky významných nepravidelných protilátek proti erytrocytům, zjišťuje kompatibilitu, resp. inkompatibilitu erytrocytů v rámci předtransfuzního vyšetření a další. [3, 4, 7]

2.4 Transfuzní přípravky

Transfuzní přípravky (TP) patří mezi individuálně vyráběné léčivé přípravky (IVLP), které jsou vyráběny z krve dobrovolných dárců v zařízeních transfuzní služby. TP je obvykle vyroben od jednoho dárce z jednotlivého odběru plné krve nebo z aferézy. Výjimku tvoří směsné trombocyty, získávané z plné krve a směsný kryoprecipitát, které obvykle představují směs krevních složek od 4 – 6 různých dárců nebo kryokonzervované trombocyty rekonstituované v plazmě. [3, 11]

Běžně používanou jednotkou pro TP je transfuzní jednotka (T.U.). Ta udává množství transfuzního přípravku, pro jehož výrobu byl zpracován jeden standardní odběr plné krve, včetně konzervačního či náhradního roztoku. Běžný odběr plné krve od jednoho dárce činí $450 \text{ ml} \pm 10 \%$. Některé přípravky, jako např. trombocytární, jsou definovány jako terapeutické dávky (T.D.). [3]

TP jsou označovány štítkem, na kterém musí být následující údaje:

- identifikační číslo transfuzního přípravku;
- název transfuzního přípravku;
- název a sídlo výrobce (zařízení transfuzní služby);
- množství transfuzního přípravku (hmotnost nebo objem);
- název a objem použitého antikoagulačního roztoku, případně dalších použitých roztoků;
- teplota pro uchovávání a transport;
- datum odběru;
- datum použitelnosti;
- krevní skupina AB0 systému;
- antigen D krevní skupiny Rh, případně další antigeny erytrocytů;
- výsledky předepsaných vyšetření infekcí přenosných krví. [3]

2.4.1 Plná krev

Odebraná plná krev má v současné době své využití především jako surovina pro další zpracování, kdy se z ní vyrábí jednotlivé TP – erytrocyty, trombocyty a plazma. Podávání plné krve jakožto homologního TP je dnes málo časté a považuje se jako za překonané. Hlavní indikací plné krve jsou proto zejména autotransfuze. V poslední době ale ve světě dochází ke změně pohledu na použití plné krve, jako vhodného přípravku pro tzv. hemostatickou resuscitaci při masivním krvácení a polytraumatech. Plná krev se skladuje při teplotě 2 – 6°C s dobou použitelnosti 35 dní. [7, 11, 12]

2.4.2 Erytrocytární transfuzní přípravky

Léčebnou složkou erytrocytárních transfuzních přípravků jsou erytrocyty, které jsou získávány buď z plné krve centrifugací a následnou extrakcí, nebo odběrem na separátoru – erythrocytaferézou. Přípravky musí být skladovány při teplotě

od +2°C do +6°C s dobou použitelnosti 42 dní. Existuje několik druhů erytrocytárních transfuzních přípravků:

- **erytrocyty (E)** – jsou vyráběny z plné krve, centrifugací je odstraněna většina plazmy; leukocyty a trombocyty (buffy-coat) zůstávají;
- **erytrocyty bez buffy-coatu (EB)** – jsou vyráběny z plné krve, většina plazmy a buffy-coatu je odstraněna centrifugací;
- **erytrocyty resuspendované (ER)** – jsou vyráběny z plné krve, centrifugací se odstraní převážná část plazmy a přidá se resuspenzní roztok; leukocyty a trombocyty v přípravku zůstávají;
- **erytrocyty bez buffy-coatu, resuspendované (EBR)** – jsou vyráběny z plné krve, centrifugací je odstraněna většina plazmy a buffy-coat, přidá se resuspenzní roztok; počet leukocytů a trombocytů je snížen;
- **erytrocyty deleukotizované (ED)** – vyrábí se buď deleukotizací erytrocytů (E) či erytrocytů bez buffy-coat (EB), nebo odstraněním plazmy po centrifugaci deleukotizované plné krve; počet leukocytů v přípravku je snížen;
- **erytrocyty resuspendované, deleukotizované (ERD)** – vyrábí se deleukotizací ER nebo EBR, nebo přidáním resuspenzního roztoku do deleukotizované plné krve, ze které je odebrána plazma (po centrifugaci); počet leukocytů v přípravku je snížen;
- **erytrocyty z aferézy (EA, EAR, EAD)** – jsou získávány odběrem dárce na separátoru při erythrocytaferéze či při multikomponentním odběru; u EAR přípravků je použit resuspenzní roztok, EAD přípravky jsou deleukotizovány;
- **erytrocyty promyté** – jsou připravovány dodatečným zpracováním původního přípravku; po centrifugaci je odstraněn supernatant a přidán resuspenzní roztok – tento postup se opakuje 2 – 3 krát;
- **erytrocyty kryokonzervované** – k erythrocytům se do 7 dnů od odběru přidá jako kryoprotektivum glycerol a následně se směs zmrazí. [3, 7]

V současné době vyráběné a používané erytrocytární transfuzní přípravky jsou EBR a ERD s tím, že celosvětová tendence je přechod výhradně na ERD. Speciální indikace pak mají EP. Resuspenzní roztok zvyšuje dobu použitelnosti přípravků. Erytrocytární přípravky je možné ozářit (dávka 25 – 30 Gy), aby došlo ke zničení imunokompetentních lymfocytů, a tím ke snížení pravděpodobnosti vzniku reakce štěpu proti hostiteli. Ozáření je nutné provést krátce před předpokládanou dobou podání transfuze. V důsledku ozáření se v přípravcích uvolní z erytrocytů draslík, tím pádem je jeho koncentrace v přípravku zvýšená a je nezbytné konzultovat podání ozářené krevní transfuze s hematologem. Ozářené TP jsou určeny pro těžce imunokompromitované pacienty, tj. např. pro novorozence, pacienty po imunosupresivní terapii, po transplantaci kostní dřeně apod. [7, 11]

2.4.3 Trombocytární transfuzní přípravky

Suspenze trombocytů, léčebná složka trombocytárních TP, jsou získávány buď zpracováním plné krve, nebo z trombocytferéz. Trombocytární přípravky musí být uchovávány na třepačkách, které jsou v nepřetržitém režimu třepání, při teplotě od +20°C do +24°C. Doba skladování je krátká – 5 až 7 dnů. Mezi trombocytární TP patří:

- **trombocyty z plné krve** – získávají se centrifugací plné krve; k jejich přípravě se používá plazma bohatá na krevní destičky nebo buffy-coat, kdy při druhé centrifugaci dojde k oddělení trombocytů resuspendovaných v plazmě buď z plazmy bohaté na destičky, nebo z buffy-coatu;
- **trombocyty z plné krve směsné** – získávají se smísením 4 až 6 buffy-coatů, nebo 4 až 6 jednotek trombocytů z plné krve, v obou případech jsou odděleny centrifugací; trombocyty z plné krve směsné mohou být i deleukotizované – jsou navíc filtrovány přes deleukotizační filtr za účelem snížení počtu leukocytů;
- **trombocyty z plné krve směsné v náhradním roztoku** – vyrábějí se smísením 4 až 6 buffy-coatů a přidáním resuspenzního roztoku, následuje centrifugace,

při které dojde k oddělení trombocytů resuspendovaných v plazmě a v náhradním roztoku; trombocyty z plné krve směsné v náhradním roztoku mohou být i deleukotizované;

- **trombocyty z aferézy** – jsou získávány odběrem dárce na separátoru buď při trombocytaferéze, nebo při multikomponentním odběru; trombocyty z aferézy mohou být i deleukotizované;
- **trombocyty z aferézy resuspendované** – jsou získávány aferézou a resuspendovány ve směsi plazmy a náhradního roztoku; trombocyty z aferézy resuspendované mohou být i deleukotizované;
- **trombocyty kryokonzervované** – k trombocytárnímu přípravku je přidán kryoprotektivní roztok (do 24 hodin po odběru) a následuje zamražení přípravku; skladování je při teplotě -80°C (v elektrickém mrazícím boxu).
[3, 7]

2.4.4 Plazmatické transfuzní přípravky

Hlavní léčebnou složkou plazmatických transfuzních přípravků jsou především koagulační faktory a přirozené inhibitory koagulace, jejichž funkce je potřeba zachovat. Přípravky mohou být získány z plné krve, z plazmaferézy nebo též jako vedlejší produkty při trombocytaferéze či erythrocytaferéze. Pro zachování labilních koagulačních faktorů musí být plazma během jedné hodiny šokově zmrazena na teplotu -30°C v jádře vaku. Zmražená plazma může být skladována při teplotě -25°C a nižší po dobu 36 měsíců, při teplotě -18°C až -25°C po dobu 3 měsíců. Druhy plazmatických TP jsou následující:

- **plazma čerstvě zmrazená (FFP)** – jedná se o šokově zmrazenou plazmu, která byla oddělena z plné krve či o plazmu získanou z aferézy;
- **kryoprotein** – jedná se o složku plazmy; po rozmražení je plazma centrifugována a kryoprotein je oddělen od supernatantní plazmy, následně je šokově zamražen; obsahuje podstatnou část faktoru VIII,

von Willebrandova faktoru, fibrinogenu, faktoru XIII a fibronektinu z původní jednotky plazmy;

- **plazma bez kryoproteinu (K plazma)** – jedná se o část jednotky čerstvě zmrazené plazmy, ze které byl odebrán kryoprotein. [3, 7]

2.5 Předtransfuzní vyšetření

Hlavním úkolem předtransfuzního vyšetření je pomocí laboratorních testů potvrdit, respektive vyvrátit, že krev příjemce je slučitelná s krví dárce (transfuzním přípravkem). Díky těmto testům (imuno hematologickým vyšetřením) je možné pacientovi zajistit relativně bezpečnou transfuzi a minimalizovat nežádoucí reakce. Předtransfuzní vyšetření jsou prováděna před podáním TP, v němž jsou obsaženy erytrocyty. [3]

Předtransfuzní vyšetření se skládají:

- z určení AB0 skupiny a D antigenu,
- ze screeningového vyšetření nepravidelných protilátek proti erytrocytům,
- z testu kompatibility. [3]

2.5.1 Vyšetření krevní skupiny AB0 a antigenu D

Jedná se o nejdůležitější předtransfuzní vyšetření. Provádí se stanovení A a B antigenu na erytrocytech pomocí minimálně diagnostických anti-A a anti-B sér současně se stanovením pravidelných AB0 protilátek v séru či v plazmě pomocí A₁ a B diagnostických erytrocytů. Druhou částí vyšetření je stanovení antigenu D systému Rh (RhD). To se provádí duplicitně pomocí dvou různých klonů IgM monoklonálních anti-D diagnostických sér. U RhD negativních příjemců není potřeba (jako je tomu u dárců) došetření variantních D antigenů pomocí AGH testu, neboť příjemce by v takovémto případě měl vždy dostat RhD negativní transfuzi.

Vyšetření AB0 skupiny a D antigenu u příjemce erytrocytů je nezbytné provést z každého vzorku krve, který je odebrán a určen pro nové předtransfuzní vyšetření. Pokud má laboratoř o příjemci již předchozí záznamy, je nutné s nimi nové výsledky porovnat; v případě již zjištěné krevní skupiny je dostačující pouze orientační vyšetření pomocí diagnostických sér anti-A a anti-B a jednoho séra anti-D. [3, 4]

2.5.2 Screeningové vyšetření nepravidelných protilátek proti erytrocytům

Sérum či plazma příjemce je inkubována s diagnostickými erytrocyty za účelem prokázání přítomnosti resp. nepřítomnosti nepravidelných protilátek. Pozitivita screeningového testu se projeví aglutinací erytrocytů. Doporučuje se vyšetření provádět pomocí nepřímého antiglobulinového testu (NAT) s použitím erytrocytů resuspendovaných v roztoku o nízké iontové síle (LISS) a inkubaci při teplotě 37°C. Screening je možné doplnit také o další enzymové testy; tento postup se doporučuje především u pacientů po opakovaných transfuzích či při vyšetření potransfuzních reakcí. [3, 4]

V rámci screeningového vyšetření se používá panel tří či čtyř typů diagnostických erytrocytů krevní skupiny 0, u kterých jsou zastoupeny tyto antigeny: C, C^W, c, D, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, S, s, M, N, P1, Le^a a Le^b. Hodnocení výsledku se provádí pomocí příbalového letáku. Pozitivní výsledek signalizuje přítomnost jedné či více nepravidelných protilátek a je nezbytné protilátku identifikovat. Identifikace se provádí pomocí diagnostického panelu s více typy erytrocytů, jehož součástí je i autologní kontrola, která může odhalit např. nález autoprottilátky. Po identifikaci protilátky je vhodné prokázat na erytrocytech přítomnost antigenu, který koresponduje s přítomnou protilátkou. V případě, že zjištěná protilátka je aloprotilátka, bude výsledek detekce antigenu negativní. Pozitivní výsledek signalizuje, že se může jednat o autoprottilátku. [3]

Pokud identifikujeme protilátku, je podstatné stanovit její klinický význam. Mezi klinicky významné patří kromě AB0 protilátek ty, které jsou detekovatelné v NAT při teplotě 37°C. Jedná-li se o protilátky klinicky významné, budou příjemci podány erytrocytové přípravky, které budou pro daný antigen negativní a nebo pokud výsledek NAT ukáže, že je krev příjemce s daným erytrocytovým přípravkem kompatibilní. [3]

2.5.3 Test kompatibility

Testem kompatibility se rozumí tzv. test slučitelnosti krve dárce a příjemce. Sérum či plazma příjemce je smíchána s erytrocyty z transfuzního přípravku. Test kompatibility krve dárce a příjemce je obvykle prováděn sérologickým testem, alternativou může být tzv. elektronický test kompatibility. [3]

Sérologické testy kompatibility zaručují podání kompatibilní transfuze. Testy pomáhají zachytit klinicky významné protilátky. U příjemců, u kterých byly tyto nepravidelné protilátky detekovány je nezbytné sérologický test provést vždy; v laboratořích jsou však tyto testy většinou prováděny běžně i u osob neimunizovaných. [3]

Při elektronickém testu kompatibility je transfuzní přípravek pro „křížení“ krví vybírán počítačem. Podmínkou je, že u příjemce nesmí být detekovány žádné nepravidelné protilátky proti erytrocytům a jeho krevní skupina musí souhlasit s krevní skupinou dárce. Dále musí být do počítače zanesené záznamy o předchozích imuno hematologických vyšetřeních a musí se s nimi shodovat. V případě, že laboratorní informační systém, který má celý tento proces na starost, vyhodnotí neshodu výsledků, neumožní výdej transfuzního přípravku. [3, 4]

2.5.4 Mimořádné situace

Mezi mimořádné situace, které mohou nastat patří například potřeba masivních transfuzí nebo vydání TP z vitální indikace. [7]

Masivní transfuze

Při masivní transfuzi dochází k náhradě ztráty jednoho krevního objemu za 24 hodin. Běžně se jedná o podání více než 10 T.U. erytrocytů. Dalšími možnými definicemi jsou náhrada poloviny krevního objemu příjemce transfuzními přípravky během 2 až 3 hodin (většinou podání více než 5 T.U. erytrocytů); podání alespoň 4 T.U. erytrocytů během jedné hodiny; pokračující krevní ztráty 1,5 ml/kg tělesné váhy po dobu delší než 20 minut a nebo krevní ztráty více než 150 ml krve za minutu. Potřeba masivní transfuze nastává zhruba u 1 – 2 % pacientů s traumatem. Pro takovéto případy musí být ve zdravotnickém zařízení vypracovány postupy a krizové krevní plány. [7]

Pokud má pacient pouze minimum své vlastní krve, test kompatibility nemá smysl provádět a dodržuje se pouze shoda krevní skupině AB0. Jestliže byly příjemci nejprve transfundovány univerzální erytrocyty krevní skupiny 0, je potřeba co nejdříve začít podávat transfuzi, která je shodná s jeho původní krevní skupinou. [3, 7]

Terapeutické cíle při masivním krvácení:

- udržení perfuze a okysličení tkání, zabránění hypovolemického šoku v důsledku rychlého podání krystaloidů a koloidů – je potřeba dbát na prevenci hypotermie (a snížit tak riziko koagulopatie a nezvratného orgánového selhání);
- zástava krvácení – pomocí chirurgických postupů;
- korekce koagulopatie – dochází ke zhoršení krevního srážení, které může vést až k diseminované intravaskulární koagulopatii (DIC); řešením je podání plazmy, případně kryoprecipitátu či např. koncentrátů koagulačních faktorů;
- substituce krevní ztráty transfuzními přípravky – kromě doplnění krevního objemu slouží také jako prevence vzniku koagulopatie. [7]

Vitální indikace

Příkladem další mimořádné situace je požadavek transfuze z vitální indikace. Můžeme sem zařadit i masivní krvácení, ale i jiné situace (náhlé krvácení apod.). V případě, že od příjemce není doručen vzorek do laboratoře, jsou automaticky vydány univerzální transfuzní přípravky – erytrocyty krevní skupiny 0, přičemž 0 RhD negativní přípravky jsou preferovány především pro transfuzi dívkám a ženám fertilního věku, a plazma krevní skupiny AB. Pokud je možné během velmi krátké doby vyšetřit vzorek krve příjemce, stanoví se alespoň krevní skupina, aby mohly být vydávány přípravky stejnoskupinové. Všechna vyšetření, která z časových důvodů nemohla být provedena před vydáním transfuzních přípravků, musí být co nejdříve dovyšetřena a případné další transfuze již budou vyšetřovány standardním postupem. [3, 7]

2.6 Hemoterapie

Termín hemoterapie je označením pro léčbu pomocí transfuzních přípravků a krevních derivátů. Před zahájením hemoterapie musí lékař posoudit rizika podání a nepodání transfuze a také její očekávaný přínos pro pacienta, neboť v případě, že je možné pacienta léčit jinými léčenými postupy či léčivy, neměla by být transfuze podána. Rizika spojená s podáním krevní transfuze alespoň částečně eliminují zásady účelné hemoterapie, podle kterých jsou pacientovi podávány pouze ty složky krve, které vzhledem ke své diagnóze potřebuje, a nikoliv plná krev obsahující v některých případech pro pacienta zbytečné složky. Indikace podání krevních složek může být terapeutická (u pacienta již nastalo krvácení), nebo profylaktická (u pacienta je riziko, že krvácení nastane). [3, 7, 13, 14]

2.6.1 Imunologická rizika hemoterapie – stimulační a inhibiční účinky

Stimulace pacientovy imunity spočívá v tvorbě protilátek proti antigenům erytrocytům, trombocytům a leukocytům (včetně anti-HLA protilátek).

Vytvořené protilátky představují riziko pro případnou další hemoterapii, u těhotných žen mohou znamenat riziko reakce protilátek matky s antigeny plodu a u pacientů čekajících na transplantaci orgánů může dojít ke snížení šance přežití transplantovaného orgánu. [3]

Inhibiční účinek je odpovědí imunitního systému na přítomnost mononukleárních buněk, mediátorů zánětu (uvolněných z leukocytů) a solubilních HLA peptidů, které jsou do krevního oběhu příjemce transfundovány (jsou součástí plazmy v transfuzních přípravcích). Přestože mechanismus inhibice imunity v důsledku hemoterapie není zatím přesně popsán, je zřejmé, že v krevním oběhu příjemce dochází ke snížení poměru CD4+/CD8+ cirkulujících T lymfocytů, snížení funkce NK buněk (natural killer) a zhoršení protilátkové odpovědi lymfocytů. Pozitivní dopad může mít inhibice pro pacienty po transplantaci orgánů, kdy může být zvýšený efekt přežívání transplantátů. Naopak mezi nežádoucí komplikace způsobené inhibicí patří např. aktivace virů, přítomných v organismu pacienta, potenciace růstu nádorů či zvýšené riziko infekčních komplikací u základních onemocnění. Během skladování transfuzních přípravků jsou z leukocytů (které zbyly v transfuzním přípravku) uvolňovány cytotoxické enzymy a mediátory, díky kterým může dojít až k multiorganovému selhání. Riziko inhibičních účinků lze snížit de leukotizací transfuzních přípravků. [3]

2.6.2 Léčba erytrocytárními transfuzními přípravky

Substituční léčba erytrocyty je poměrně častá u krvácejících pacientů. Cílem transfuze erytrocytů je zvýšení transportní kapacity krve pro kyslík a následné zmírnění příznaků anemické hypoxie, především v případech, kdy není možné aplikovat jiný léčebný postup. Rozhodnutí o podání transfuze musí vždy vycházet z komplexního zhodnocení stavu pacienta a je ovlivněné několika faktory (příčina a tíže anémie, očekávané pokračování krevních ztrát aj.). [3, 11, 13]

Nejčastějšími indikacemi k podání erytrocytů jsou:

- akutní ztráty krve;
- anémie chronických chorob (ACD);
- anémie při selhání kostní dřeně u pacientů s leukemií, nádorovou infiltrací kostní dřeně nebo po chemoterapii;
- talasémie; autoimunitní hemolytická anémie (AIHA);
- srpkovitá, aplastická nebo sideropenická anémie. [3]

Jedním z hlavních parametrů pro podání transfuze erytrocytů je hodnota koncentrace hemoglobinu v krvi. Fyziologické hodnoty se pro muže pohybují v rozmezí 130 – 175 g/l, pro ženy jsou hodnoty nižší, 120 – 160 g/l. Pokud má pacient hodnotu nad 100 g/l, většinou není potřeba podávat erytrocyty. Při poklesu hemoglobinu na hodnotu nižší než 70 g/l je transfuze téměř vždy nutná. Pohybují-li se hodnoty mezi těmito dvěma hranicemi, není indikace jednoznačná. U dospělého stabilizovaného pacienta (průměrné hmotnosti), u kterého již krevní ztráty nepokračují, jsou obvykle podány 2 T.U. erytrocytárního TP, přičemž 1 T.U. zvýší koncentraci hemoglobinu přibližně o 10 g/l. [3, 15]

2.6.3 Léčba trombocytárními transfuzními přípravky

Trombocytární přípravky jsou užívány k léčbě či profylaxi krvácení navozeného trombocytopenií (vzácně i trombocytopatií). Z terapeutického pohledu jsou nejčastějšími indikacemi k podání trombocytů:

- těžká trombocytopenie u hematologických a hematoonkologických onemocnění, trombocytopenie iatrogenní po chemoterapii nebo radioterapii;
- masivní krvácení či podávání masivní transfuze;
- diseminovaná intravaskulární koagulopatie (DIC);
- krvácivé projevy při chirurgických zákrocích, zejména při kardiopulmonálním bypassu. [11, 13]

Rozhodnutí o podání trombocytů není jednoznačně definováno, závisí na lékaři, jak zhodnotí danou situaci. Je potřeba vzít do úvahy počet a funkčnost trombocytů, dále pak velikost krvácení a výskyt rizikových faktorů zvyšujících pravděpodobnost krvácení (např. infekce, horečka nad 38°C či koagulační poruchy). Fyziologické hodnoty počtu trombocytů jsou 150 – 350 x10⁹/l. Hraniční hodnota pro terapeutické podání trombocytů je 40 – 50 x10⁹/l. Existují ale výjimky (např. polytrauma, poranění centrálního nervového systému), kdy se tato hranice může posunout i na 100 x10⁹/l. U profylaktického podání je hranice snížena přibližně na 10 x10⁹/l. [7, 13]

2.6.4 Léčba plazmatickými transfuzními přípravky

Indikací pro transfuzi plazmy je krvácení či hrozící krvácení, které souvisí s operačními či jinými invazivními výkony. Hlavním cílem při podání čerstvě zmražené plazmy je předejít či zastavit krvácení, které vzniklo v důsledku nedostatku či vzájemném nepoměru koagulačních faktorů. Vzhledem k možnosti podání krevních derivátů (koncentráty jednotlivých koagulačních faktorů) namísto plazmy, které je méně rizikové, je plazma indikována hlavně v případech, kdy jsou poruchy krevního srážení kombinované (je potřeba dodat více různých faktorů). [3, 11]

Pro zlepšení krevní srážlivosti je potřeba dospělému pacientovi (s normální hmotností) podat asi 4 – 6 T.U. plazmy, které by měly zvýšit hladinu faktorů a inhibitorů zhruba o 20 – 25 %. U většiny pacientů je tato dávka dostačující a díky ní dosáhne minimálních hemostatických hodnot a klinického zlepšení. V některých případech (např. DIC) je potřeba v podávání plazmy pokračovat, neboť spotřeba koagulačních faktorů je zvýšená. [11]

2.6.5 Léčba masivního krvácení

O masivním krvácení hovoříme tehdy, pokud dojde v průběhu 3 hodin ke ztrátám a náhradám poloviny celkového objemu krve (masivní transfuze). Při velkých krevních ztrátách dochází k dalším komplikacím vznikem diluční koagulopatie – doplněním oběhu pacienta krystaloidy a koloidy dochází k poklesu hladin jednotlivých koagulačních faktorů pod hemostatické hodnoty. Proto je nutné transfundovat kromě erytrocytů také koagulační faktory plazmatických transfuzních přípravků. [7, 11, 13]

2.7 Polytrauma

Polytraumata jsou společně s mnohočetnými poraněními a závažnými monotraumaty klasifikována jako těžké úrazy. Smrt v důsledku těžkých úrazů může nastat:

- v prvních minutách přímo na místě nehody;
- během prvních hodin po přijetí do nemocnice;
- po osmi dnech, kdy jsou příčinou septické komplikace a multiorgánové selhání. [16]

Polytrauma je poranění více tělesných systémů či regionů najednou, přičemž alespoň jedním z nich je život raněného bezprostředně ohrožen. Závažná poranění v jednotlivých regionech jsou např.:

- při poranění hlavy – nitrolební krvácení, zlomeniny obličejového skeletu aj.;
- při poranění hrudníku – sériové zlomeniny žeber (tří a více), zlomeniny hrudní kosti, poranění nitrohrudních orgánů;
- při poranění břicha – poranění nitrobřišních a retroperitoneálních orgánů;
- při poranění pohybového aparátu – poranění páteře, dlouhých kostí, pánevního kruhu aj. [16]

Při mnohočetných poraněních je postižen pouze jeden tělesný systém (např. zlomeniny několika dlouhých kostí); raněný je ohrožen jejich potenciálními následnými komplikacemi. Závažná monotraumata jsou bezprostředně život ohrožující stavy (např. těžká poranění mozku či srdce). [16]

2.8 Potransfuzní reakce

Pojem potransfuzní reakce je souhrnné označení pro všechny neočekávané nežádoucí účinky, které nastaly v souvislosti s podáním transfuze. Nejčastějšími klinickými projevy jsou horečka, třesavka a kopřivka. Mezi nejčastěji se objevující závažné nežádoucí reakce jsou akutní hemolytická reakce po podání erytrocytů, akutní plicní nedostatečnost (TRALI) po podání plazmy a trombocytů (resuspendovaných v plazmě), bakteriálně-toxická reakce, způsobená kontaminací transfuzních přípravků (nejčastěji se jedná o trombocyty, neboť jsou skladovány při teplotě 20 – 24°C). [3, 7]

Základní parametry pro klasifikaci potransfuzních reakcí jsou:

- **příčina vzniku** – může se jednat o transfuzí přenosné infekce, imunitní komplikace transfuze či o kardiovaskulární a metabolické komplikace transfuze;
- **časový průběh** – u akutní formy se nežádoucí účinky objeví nejdéle do 24 hodin od doby podání transfuze; pozdní účinky přichází v intervalu od 24 hodin až řádově do několika dnů i týdnů od podání transfuze;
- **klinický průběh** – při lehkém průběhu nežádoucí účinky odezní po přerušení transfuze a po jednoduché léčbě; při závažném průběhu nastávají poruchy orgánů, pacient může být ohrožen na životě a na následky i zemřít. [7]

2.8.1 Reakce TRALI (transfusion related acute lung injury)

Jedná se o akutní poškození plic v důsledku podání jakéhokoliv transfuzního přípravku. Tento stav je život ohrožující (přibližně čtvrtina pacientů umírá), jeho průběh je akutní (do 6 hodin od podání transfuze nastupuje těžká dušnost, těžký oboustranný otok plic a hypoxie). Ve většině případů je příčinou přítomnost protilátek proti leukocytům (anti-HLA nebo anti-HNA) v plazmě transfuzního přípravku. Protilátky aktivují leukocyty a ty adherují k endotelu plicních kapilár, uvolní se proteolytické enzymy a kyslíkové radikály, následkem čehož dochází k obstrukci plicní mikrocirkulace a vzniku plicního edému. Jako prevence vzniku TRALI se doporučuje používat plazmu od mužských dárců, neboť u žen je výskyt anti-HLA či anti-HNA protilátek častější – jedná se o důsledek předchozí senzibilizace těhotenstvím. [3, 7]

2.8.2 Bakteriálně toxická potransfuzní reakce

Bakteriální kontaminace transfuzního přípravku může být způsobena odběrem krve od dárce, u kterého je přítomna bakteriémie (nejčastěji podcenění průjmovitých onemocnění; po stomatologickém zákroku či při lokální kožní infekci), kontaminací kožní mikroflórou při odběru, kontaminací přípravku během zpracování nebo kontaminací odběrových vaků. Nejvyšší riziko přenosu bakteriální infekce je při podání trombocytů (skladování při teplotě 20 – 24°C). Průběh bývá většinou akutní (projevy během několika hodin po podání transfuze). Klinickými projevy jsou horečka, zimnice, zvracení, průjem, tachykardie, hypotenze a šok. Prevence spočívá v kontrole vzhledu transfuzního přípravku (barva a homogenita) těsně před podáním a kontrola neporušenosti vaku. [3, 7]

2.8.3 Akutní hemolytická potransfuzní reakce (HTR)

Příčinou vzniku akutní HTR je přítomnost protilátek proti transfundovaným erytrocytům v séru pacienta. Nejčastěji se jedná o podání AB0 inkompatibilní transfuze erytrocytů (případně granulocytů s vysokou příměsí erytrocytů). Existují

případy, kdy AB0 kompatibilita je v pořádku, ale pacientovi byl podán přípravek s obsahem plazmy, ve které byl vysoký titr AB0 aglutininů, čímž dojde k aktivaci komplementové kaskády. Neimunitní příčinou vzniku HTR je podání poškozených (hemolyzovaných) erytrocytů v transfuzním přípravku. Charakteristickým projevem je intravaskulární hemolýza, která může vést k rozvoji život ohrožujících stavů – šoku, DIC či renálnímu selhání. Jedná se o velmi závažnou komplikaci transfuze, která často končí smrtí. Jedinou prevencí je striktní dodržování postupů při odběru vzorku krve pacienta pro předtransfuzní vyšetření a při aplikaci transfuzního přípravku. [3, 7]

2.8.4 Alergická potransfuzní reakce

Alergická reakce je důsledkem přítomnosti protilátek příjemce (obvykle třídy IgE) proti plazmatickým bílkovinám nebo alergenům, které jsou v transfuzním přípravku. Nejčastěji jsou způsobeny transfuzními přípravky obsahujícími plazmu či trombocyty (u erytrocytů je výskyt málo častý). Průběh alergických reakcí je většinou akutní (do 24 hodin). U pacientů, kteří mají vrozený defekt IgA imunoglobulinů a přítomné protilátky anti-IgA, může dojít až k anafylaktickému šoku. [3, 7]

2.8.5 Hypervolemie (reakce TACO)

TACO (transfusion associated circulatory overload) je přetížení krevního oběhu (hypervolemie), vyskytující se při podání většího množství transfuzních přípravků či při jejich podání velkou rychlostí – transfundovaný objem krve je větší než objem vlastní krve pacienta. Závažnějšími klinickými projevy jsou rozvoj akutního plicního edému, srdeční nedostatečnost, cyanóza a další. Největší riziko představuje TACO pro novorozence, děti a osoby starší 60 let. Prevencí je dodržování rychlosti podání transfuze. [3]

2.8.6 Hypotermie

Hypotermie neboli podchlazení může být důsledkem masivní transfuze. Při rychlém nahrazení přibližně 50% krevního objemu může klesnout tělesná teplota až na 32 – 34°C a tím ohrozit život pacienta (srdeční dysfunkce). Prevencí je ohřívání transfuzních přípravků při masivních transfuzích. [3, 7]

2.8.7 Hyperkalemie

Přílišné zvýšení hladiny draslíku je důsledkem rychlého podání transfuze (rychleji než 60 ml/min). následky jsou srdeční arytmie a/nebo dysfunkce. Zvýšená hladina kalia je přítomna také u ozářených erytrocytových transfuzních přípravků, které jsou skladovány – proto se doporučuje ozářené erytrocyty podávat co nejdříve po ozáření. [3, 7]

2.8.8 Potransfuzní infekce

Podání krevní transfuze s sebou vždy neslo riziko přenosu krevní infekce. Jedná se o biologické přípravky, které při zachování jejich léčebného účinku nelze výrobními postupy upravit tak, aby se tato rizika zcela odstranila. Ačkoli důsledným výběrem dárců krve a jejích složek a moderními vyšetřovacími technikami při screeningu dárců krve se toto riziko snižuje, stále trvá. Z hlediska dlouhodobých potransfuzních rizik i z hlediska forezního se jedná o jeden z nejpálčivějších problémů transfuzní služby. Pozornost je zaměřena zejména na včasnou detekci „tradičních“ infekcí, který mi jsou virová hepatitis B a C, HIV a syfilis a v endemických oblastech na malárii, ale též na tzv. „nové hrozby“, jako je virus západonilské horečky, virová hepatitis E a další. [3, 17]

3 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce je zjistit procentuální zastoupení dárců krve krevní skupiny 0 s tzv. nízkým titrem anti-A a anti-B protilátek v plazmě. Krev těchto dárců bude použita k výrobě tzv. univerzální plné krve, podávané pacientům z vitální indikace při masivním krvácení a polytraumatech.

Dalším cílem této práce je porovnat výsledky z analyzátoru Galileo NEO Iris od firmy Immucor s výsledky manuálně prováděné sloupcové aglutinace (titr protilátek třídy IgG) a zkumavkového testu (titr protilátek třídy IgM).

4 METODIKA

4.1 Biologický materiál

Výchozím biologickým materiálem pro všechna prováděná vyšetření je krev dárců, respektive krevní plazma získaná centrifugací plné krve, odebraná do zkumavky typu Vacuette, ve které je antikoagulant K₂EDTA. Vzorky jsou skladovány, dle doporučení ČLS JEP, při teplotě 4°C po dobu max. 7 dní. [18]

Případná výroba „univerzální“ plné krve je možná pouze z krve dárců s krevní skupinou 0 – stejně jako je tomu při výrobě univerzálních erytrocytárních transfuzních přípravků. Erytrocyty těchto dárců nemají na svém povrchu žádné antigeny (A a B). Tím je eliminováno riziko AB0 inkompatibility, jejíž následky mohou být fatální.

4.2 Zkumavkový test

Metoda detekuje pouze IgM protilátku, kdy k aglutinaci dochází přímým přemostěním krvinek IgM protilátkou navázanou na daný antigen. Inkubace a centrifugace je jednotná pro obě metody (anti-A, anti-B), vyhodnocení okem při manuálním třepání.

4.2.1 Vybavení potřebné pro provedení testu

Metoda zkumavkového test je relativně nenáročná jak na provedení, tak i na potřebné vybavení. Kromě vzorku vyšetřovaného séra potřebujeme typové krvinky krevní skupiny A a B (odebrané od dárců krve), ze kterých připravíme 2% suspenzi (postup uveden dále) a fyziologický roztok. Z přístrojového vybavení je potřeba pouze centrifuga a automatická pipeta s jednorázovými špičkami. Vyšetření provádíme v aglutinačních zkumavkách.

4.2.2 Provedení testu

Před samotným testem je potřeba připravit vždy čerstvou 2% suspenzi „propraných“ červených krvinek. Ta se provádí následovně:

- Ze vzorku krve od dárců skupiny A a B odebereme vždy cca 1 ml erytrocytů pomocí Pasteurovy pipety, které přeneseme do zkumavky.
- Fyziologickým roztokem doplníme objem zkumavek s krvinkami.
- Dáme do centrifugy – 3 min., 4 000 ot./min.
- Krvinky jsou usazené na dně, fyziologický roztok ze zkumavek vylijeme prudkým otočením zkumavek dnem vzhůru.
- Předchozí tři kroky zopakujeme ještě dvakrát (celkem jsou tedy krvinky „proprány“ třikrát).
- Na konec přidáme opět fyziologický roztok v takovém množství, aby suspenze krvinek odpovídala 2% zákalu.

Stanovení titru zkumavkovým testem se provádí dle následujícího postupu:

- Na pracovní stůl připravíme stojánek s celkem 20 zkumavkami, kdy deset z nich bude mít označení „A“ a zbylých deset označení „B“. Kromě toho všechny označíme čísly 1 – 10.
- Do všech zkumavek, kromě první, napipetujeme 100 μ l fyziologického roztoku.
- Do zkumavek č. 1 a 2 napipetujeme 100 μ l vyšetřovaného séra.
- Obsah ve zkumavce č. 2 promícháme (vznik homogenního roztoku séra a fyziologického roztoku).
- Provedeme ředění geometrickou řadou. Ze zkumavky č. 2 přeneseme 100 μ l vzorku do zkumavky č. 3, jejíž obsah opět promícháme. Tímto způsobem pokračujeme až ke zkumavce č. 10.

- 100 μ l vzorku, které jsme odpipetovali z poslední zkumavky, je vhodné uchovat v jiné zkumavce pro případ potřeby dalšího ředění.
- Do všech zkumavek přidáme 100 μ l 2% suspenze červených krvinek:
 - a. Do zkumavek označených písmenem A přidáme krvinky skupiny A – stanovíme tak anti-A protilátky.
 - b. Do zkumavek označených písmenem B přidáme krvinky skupiny B – stanovíme tak anti-B protilátky.
- Promícháme zkumavky a necháme 5 minut stát při pokojové teplotě.
- Zkumavky dáme točit do centrifugy – 1 minuta, rychlost 1500 ot./min
[19, vlastní zdroj]

4.2.3 Hodnocení výsledku testu

Hodnocení zkumavkového testu spočívá ve vizuálním zhodnocení vzniklé aglutinace. Každou zkumavkou zatřepeme tak, aby se případný aglutinát odlepil ze dna zkumavky. Pokud po zatřepání „plove“ v roztoku sraženina, je reakce v dané zkumavce pozitivní. V první zkumavce, v níž dojde k rozpuštění sraženiny, je výsledek negativní (nejsou zde přítomny protilátky umožňující vznik aglutinace). Hodnotu titru odečteme podle tabulky 4.

Tabulka 4 - Geometrická řada titrů [19, vlastní zdroj]

Číslo zkumavky	Titř
1	1
2	2
3	4
4	8
5	16
6	32
7	64
8	128
9	256
10	512
11	1024
12	2048

4.3 Metoda sloupcové aglutinace

Metoda sloupcové aglutinace se provádí pro vyšetření titru anti-A a anti-B protilátek třídy IgG. Vzhledem k malé molekule IgG protilátek (mající tvar dimeru) nedochází „samovolně“ k aglutinaci erytrocytů, ale pouze k jejich senzibilizaci. Do reakce je přidávána další protilátka – protilátka proti původní protilátce (AGH), která zprostředkuje aglutinaci senzibilizovaných erytrocytů. V případě stanovení titrů protilátek je využíván nepřímý antiglobulinový test (NAT), prováděný v gelových kartách, které již obsahují AGH.

Metoda detekuje IgG i IgM protilátky, kdy v průběhu inkubace k navázání protilátek IgG i IgM na antigeny testovacích krvinek a při centrifugaci dochází k zachycení krvinek s IgG protilátkou jejím navázáním Fc koncem na AGH v gelu a současně na zachycení na gelovém matrix krvinek aglutinovaných přímou vazbou IgM protilátky. K eliminaci tohoto jevu by bylo nutné ošetřit vzorek například dithiotreitem (DTT), který protilátky IgM inaktivuje.

Výhodou sloupcové aglutinace je, že odečet poslední reakce v gelovém sloupci je méně závislé na subjektivním odečtu laboranta, např. ve srovnání se zkumavkovou metodou.

4.3.1 Vybavení potřebné pro provedení testu

K provedení sloupcové aglutinace je již potřeba více vybavení, než je tomu u zkumavkového testu. Seznam použitých pomůcek, přístrojů a reagensů je následující:

- centrifuga DG Spin;
- inkubátor;
- automatická pipeta + jednorázové špičky;
- gelové karty DG Gel Coombs;

- fyziologický roztok DG Gel Sol (výrobce dodávaný fyziologický roztok zaručující správnost výsledků);
- sérum vyšetřovaného vzorku;
- 2% suspenze erytrocytů skupiny A a B;
- aglutinační zkumavky. [19, vlastní zdroj]

4.3.2 Provedení testu

Před samotným testem je potřeba připravit vždy čerstvou 2% suspenzi „propraných“ červených krvinek – postup je stejný jako při přípravě suspenze pro zkumavkový test.

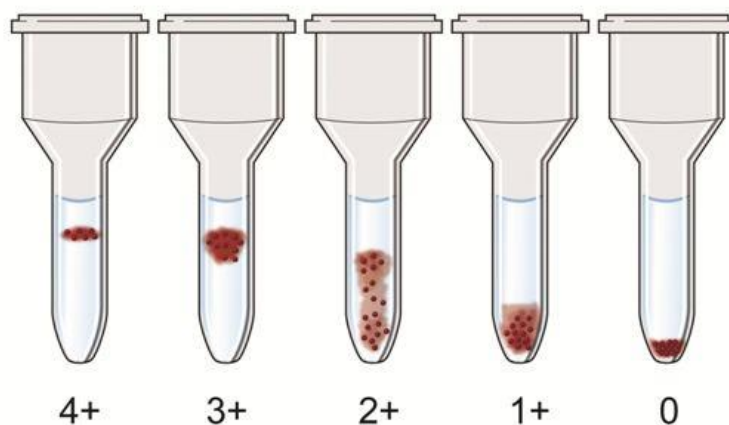
Stanovení titru metodou sloupcové aglutinace se provádí dle následujícího postupu:

1. Na pracovní stůl připravíme stojánek s 12 zkumavkami, které označíme čísly 1 až 12.
2. Do všech zkumavek, vyjma zkumavky č. 1, napipetujeme 100 μ l fyziologického roztoku DG Gel Sol.
3. Do první a druhé zkumavky napipetujeme 100 μ l vyšetřovaného séra.
4. Obsah ve druhé zkumavce promícháme (vznik homogenního roztoku séra a fyziologického roztoku).
5. Provedeme ředění geometrickou řadou. Ze zkumavky č. 2 přeneseme 100 μ l vzorku do zkumavky č. 3, jejíž obsah opět promícháme. Tímto způsobem pokračujeme až ke zkumavce č. 12.
6. 100 μ l vzorku, které jsme odpipetovali z poslední zkumavky, je vhodné uchovat v jiné zkumavce pro případ potřeby dalšího ředění.
7. Připravíme gelové karty (DG Gel Coombs), které popíšeme číslem vyšetřovaného vzorku, číslem ředění a symbolem A či B podle toho, jaké diagnostické krvinky budeme ke vzorku přidávat (pro stanovení anti-A nebo anti-B).

8. Do každé mikrozkušavky gelových karet označených „A“ napipetujeme 50 μ l typových červených krvinek krevní skupiny A.
9. Do každé mikrozkušavky gelových karet označených „B“ napipetujeme 50 μ l typových červených krvinek krevní skupiny B.
10. K 50 μ l erytrocytů přidáme vždy 25 μ l vyšetřovaného séra dle příslušného ředění.
11. Necháme inkubovat 15 minut při teplotě 37°C.
12. Centrifugujeme v centrifuze DG Spin.
13. Zhodnotíme výsledek. [19, vlastní zdroj]

4.3.3 Hodnocení výsledku testu

Výsledek reakce v každé mikrozkušavce odečteme podle obrázku 1. Pro účely této práce není potřeba rozlišovat sílu pozitivitu – je dostačující pouze hodnocení, zda je výsledek negativní či pozitivní, tedy zda v konkrétním ředění je protilátka je přítomna či nikoliv.



Obrázek 1 - Hodnocení výsledků aglutinace [20]

4.4 Analyzátor Galileo NEO Iris

Analyzátor Galileo NEO Iris, výrobce Immucor, USA, slouží k automatizaci imunohematologických diagnostických vyšetření in vitro. Přístroj využívá čárových kódů k identifikaci vzorků, mikrodesek a reagentů, čímž se zvyšuje stupeň automatizace. Čárové kódy reagentů kódují také informaci o identifikaci reagentu, číslu šarže, datu expirace a jedinečném identifikátoru každé lahvičky (Serial Number). [21]

Hlavní součásti analyzátoru:

- **kabinet** – slouží k ukotvení jednotlivých modulů zařízení a nachází se zde nádoby na odpad či zásobní roztoky;
- **vkładací věž** – slouží k vkládání mikrodesek následně upevněných do nosičů (= plastové rámečky, které umožňují manipulaci s mikrodesekami během zpracovávání vzorků);
- **transportní systém** – přenáší mikrodesečky v rámečcích k jednotlivým modulům analyzátoru;
- **prostor pro vkládání vzorků/reagencií;**
- **čtečky** pro snímání čárových kódů;
- **pipetovací systém** – obsahuje pipetory s jednotlivými jehlami a čtyři mycí stanice jehel; pipetuje vzorky a reagenty do definovaných pozic mikrodesek;
- **inkubátor** – obsahuje celkem 15 pozic (stejně jako vkładací věž), v šesti pozicích je zóna pokojové teploty, jedna pozice slouží jako izolační zóna a v osmi pozicích je tzv. zóna 37°C;
- **promývačka** – promývá jamky mikrodesek;
- **centrifuga** – plní dvě úlohy – centrifuguje desky a roztřepává obsah jamek;
- **CCD kamera** – snímá obrázky desek pro vyhodnocení výsledků. [21]

4.4.1 Princip metod

Stanovení titru anti-A a anti-B protilátek třídy IgM je prováděno aglutinační metodou.

Titrace protilátek třídy IgM

U zjišťování protilátek IgM k aglutinaci dochází přímým přemostěním krvinek IgM protilátkou navázanou na daný antigen. Inkubace, centrifugace a třepání je jednotné pro obě metody (anti-A, anti-B), vyhodnocovací algoritmus analýzy obrazu i následné převedení do aglutinační hodnoty a rozhodovací hodnota poslední zřetelné reakce podle aglutinační hodnoty je rovněž stejná.

Měření na přístroji Galileo NEO Iris je plně automatizovanou metodou v mikrotitrační jamce, vyhodnocení jednotným algoritmem barevnou CCD kamerou přístroje, převedení obrazu aglutinace do číselné „aglutinační“ hodnoty v rozsahu 0 až 100 a vyhodnocení hodnoty titru jako poslední reakce s aglutinační hodnotou větší než 25 (síla reakce 1+).

U IgM titrací aglutinační metodou je patrné postupné slábnutí reakce, při vyšším naředění protilátky se počet navzájem spojených krvinek snižuje a při roztřepání pak aglutinace odečítaná makroskopicky v jamce se blíží obrazu neaglutinovaných krvinek (negativní reakce).

Titrace protilátek třídy IgG

Principem detekce IgG protilátek je nepřímý antiglobulinový test, kdy nejprve dochází k navázání krvinek s odpovídajícím antigenem na povrch jamky Capture-R Select stripu (použití příslušných referenčních krvinek A₁ nebo B, obě RhD negativní). Pak jsou v průběhu inkubace na tyto antigeny navázány protilátky IgG i IgM a po promytí a přidání indikátorových krvinek dochází k navázání AGH na indikátorové krvince pouze na Fc konec IgG protilátky. Přímá vazba IgM

protilátky na antigen na indikátorové krvince není možná, protože indikátorové krvinky jsou krevní skupiny 0 RhD pozitivní, nenesou tedy antigeny A ani B. Inkubace a centrifugace je jednotná pro všechny Capture metody, vyhodnocovací algoritmus analýzy obrazu i následné převedení do „aglutinační“ hodnoty a rozhodovací hodnota poslední zřetelné reakce podle aglutinační hodnoty je rovněž stejná.

Měření na přístroji Iris je plně automatizovanou metodou v mikrotitrační jamce Capture-R Select desky v prostředí LISS – inkubace, promytí, vizualizace indikátorovou krvinkou s AGH IgM, vyhodnocení jednotným algoritmem barevnou CCD kamerou přístroje, převedení obrazu reakce do číselné „aglutinační“ hodnoty v rozsahu 0 až 100 a vyhodnocení hodnoty titru jako poslední reakce s aglutinační hodnotou větší než 30 (síla reakce 1+).

U IgG titrací Capture Select metodou je patrné náhlé zeslábnutí reakce u hodnot odpovídajících hraničnímu titru, při vyšším naředění protilátky se počet navázaných indikátorových krvinek náhle sníží a po centrifugaci se ve středu jamky zobrazí zřetelný terčík (negativní reakce).

IgG protilátky je na analyzátoru možné měřit v rozsahu nízkého titru (LT, low titre), tj. v hodnotách 1:1 – 1:128 nebo vysokého titru (HT, high titre), tj. v hodnotách 1:16 – 1:4096. Mód pro HT ale nebyl nainstalován a měření probíhalo pouze v módu LT.

4.4.2 Postup měření

Měření titru protilátek anti-A a anti-B na imunohepatologickém analyzátoru Galileo NEO Iris je prováděno dle následujícího postupu:

- Zkontrolujeme, zda je odpadní nádoba prázdná (pokud ne, odpojíme ji a vyprázdníme) a zároveň zkontrolujeme zásoby pufrovaného

fyziologického roztoku PBS (phosphate buffered saline) – při nedostatku doplníme.

- Vzorky, které budeme vyšetřovat, odzátkujeme a vložíme do stojánků a ty založíme do analyzátoru.
- Na obrazovce zkontrolujeme, že analyzátor zaznamenal a načtl všechny námi vložené vzorky. Pokud ano, zvolíme vyšetření, která budeme provádět – LT_IgM A₁, LT_IgM B, LT IgG A₁, LT_IgG B.
- Na základě počtu vložených vzorků a požadovaných vyšetření vyhodnotí analyzátor potřebné množství a druhy reagensů a reakčních mikrodisek.
- Do stojánků založíme potřebné reagensie (druh a množství jednotlivých reagensů vyhodnotí sám analyzátor).
- Do lahvíček obsahujících erytrocyty přidáme vždy po jedné magnetické kuličce, která umožní promíchávání krvinek v průběhu měření.
- Stojánky s reagensii vložíme do analyzátoru.
- Do zásobní věže dáme požadovaný počet mikrodisek (typ SC pro vyšetření IgG a typ UD pro vyšetření IgM) zacvaknutých do plastových rámečků.
- Na obrazovce zkontrolujeme, že analyzátor zaznamenal a načtl všechny námi vložené reagensie a mikrodisky.
- Pokud je vše v pořádku, můžeme analyzátor spustit.
- Vzhledem k časové náročnosti metody – inkubace, pipetování, promývání apod. trvá zpracování 48 vzorků několik hodin (cca 6 hodin).
- Poté, co analyzátor vzorky zpracuje a uvolní výsledky (ty jsou automaticky vytištěny), je možné z něj všechny reagensie, mikrodisky a vzorky odebrat a zlikvidovat je nebo případně uchovat pro další měření (to se týká především vzorků).
- Výsledky jsou zkontrolovány, zda nedošlo během měření k chybě – např. technická závada na analyzátoru apod. a archivovány pro další zpracování (statistické zhodnocení).

5 VÝSLEDKY

Pro zpracování výsledků této práce bylo změřeno celkem 536 vzorků krve od dárců s krevní skupinou 0 na analyzátoru Galileo NEO Iris. Z toho u 38 vzorků nedošlo během procesu měření na analyzátoru k vyhodnocení výsledku; nejčastěji se jednalo o problém s hodnocením aglutinace – nebylo jednoznačné, jaká hodnota titru je poslední, u které ještě nastává pozitivní reakce. Tím pádem je tedy pro účely této práce kompletně změřeno 498 vzorků, ze kterých jsou výsledky zpracovány.

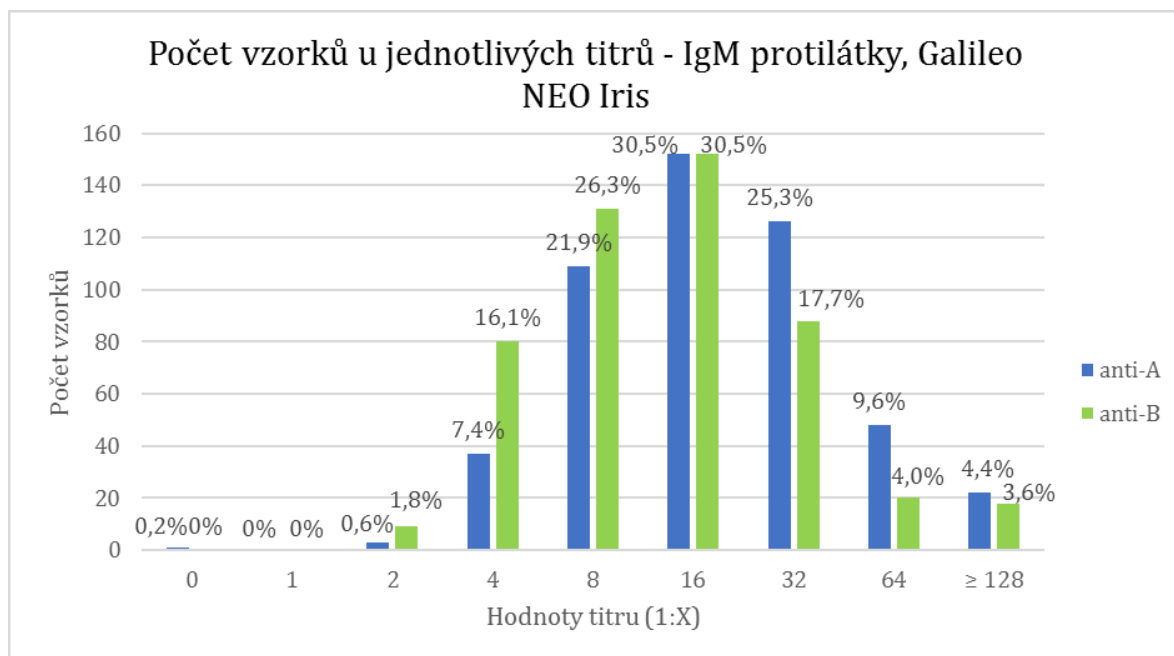
Kromě měření na analyzátoru jsem u části vzorků zjišťovala hodnoty titru pomocí manuálních metod – protilátky třídy IgM metodou zkumavkového testu a protilátky třídy IgG sloupcovou aglutinací. Titr anti-A a anti-B protilátek třídy IgM jsem měřila u celkem 139 vzorků a titr IgG protilátek u 106 vzorků.

5.1 Měření na analyzátoru Galileo NEO Iris

U všech vzorků byl měřen titr jak anti-A, tak anti-B protilátek. Pro stanovení titru protilátek anti-A byly použity typové krvinky skupiny A₁. Vzorky byly měřeny v rozsahu nízkého titru (LT), jehož maximální hodnota je 1:128. Z tohoto důvodu je u některých vzorků uvedena hodnota ≥ 128 , neboť v situaci, kdy byla analyzátorem zaznamenána pozitivní reakce (tedy vznik aglutinace) v pozici, ve které se nacházela mikrojamka s ředěním 1:128, vyhodnotil analyzátor tuto hodnotu jako ≥ 128 , protože neměl možnost pokračovat v dalším ředění. Pro další ředění (a tedy upřesnění hodnoty titrů) by bylo potřeba měřit v rozsahu vysokého titru (HT), což ale již není předmětem této práce. Naopak hodnota 0, která se ve výsledcích také vyskytuje, znamená, že vyšetřovaný vzorek nebyl pozitivní ani v ředění 1:1, tím pádem je negativní – nejsou přítomny žádné protilátky.

5.1.1 Stanovení titru protilátek třídy IgM

Titř protilátek třídy IgM je pro výrobu „univerzální“ plné krve klíčový, neboť právě přítomnost inkompatibilních IgM protilátek by mohla způsobit potransfuzní reakce či komplikace a následky by mohly být fatální.

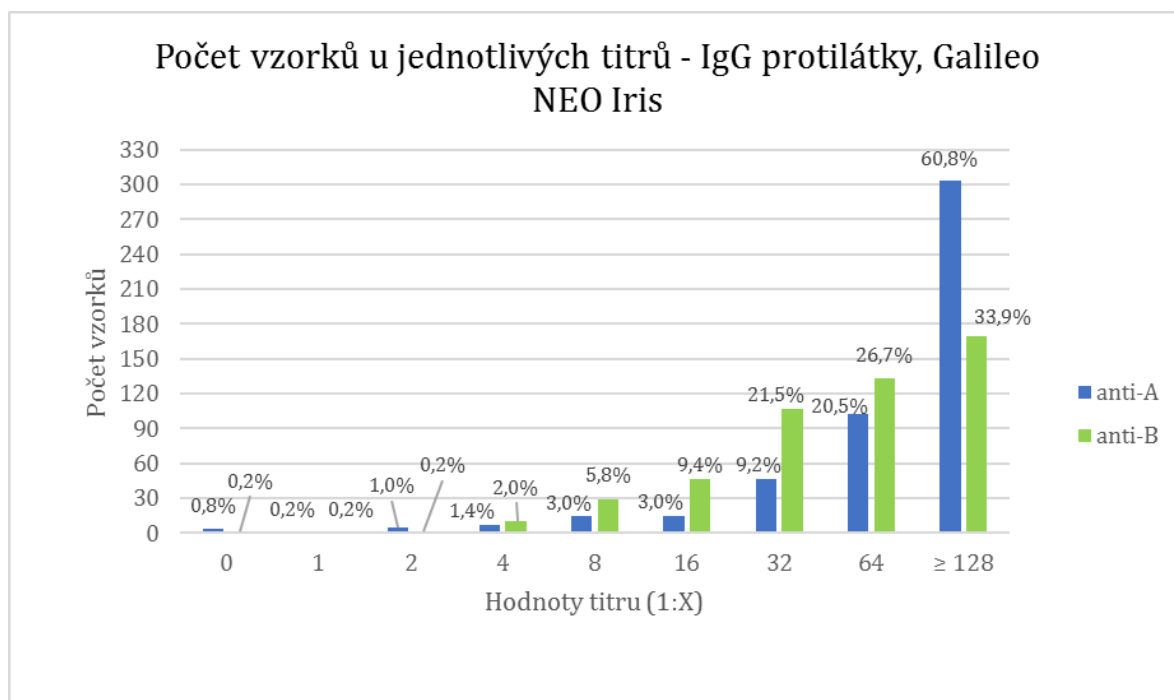


Obrázek 2 - Počet vzorků u jednotlivých hodnot titru IgM protilátek; měřeno na analyzátoru Galileo NEO Iris

Na obrázku 2 vidíme graf, který znázorňuje počet vzorků u každé hodnoty titru. Lze konstatovat, že rozložení četností titrů pravděpodobně odpovídá normálnímu rozložení dle Gaussovy křivky, kdy nejvíce vzorků má titř protilátek 1:16 – konkrétně se jedná o 152 vzorků v obou případech (anti-A i anti-B), přepočteno na procenta tato hodnota odpovídá 30,5 %. U protilátek anti-A je druhý nejčastější titř 1:32, který byl zjištěn celkem u 126 vzorků (25,3 %). U anti-B protilátek je to pak titř 1:8, jež byl naměřen ve 131 vzorcích (26,3 %). Z grafu můžeme také vyčíst jistý trend – hodnoty titrů anti-A protilátek jsou orientovány spíše na pravou část grafu, tedy do vyšších hodnot, zatímco anti-B protilátky jsou zastoupeny více v levé části – v nižších hodnotách. Nicméně vzhledem k povaze měřeného parametru (aglutinace a její vyhodnocení není tak exaktní metodou ve srovnání například s fotometrií) nelze tento rozdíl pravděpodobně zobecňovat.

5.1.2 Stanovení titru protilátek třídy IgG

Titry IgG protilátek vycházel obecně velmi vysoký – u většiny vzorků je hodnota titru ≥ 128 .



Obrázek 3 - Počet vzorků u jednotlivých hodnot titru IgG protilátek; měřeno na analyzátoru Galileo NEO Iris

Na obrázku 3 je již na první pohled patrný naprosto odlišný trend IgG protilátek, než jaký jsme pozorovali u protilátek IgM. V tomto případě jsou sice zastoupeny, alespoň jedním vzorkem, všechny hodnoty titrů, ale se vzrůstajícím titrem se zvyšuje i počet vzorků. Nejvíce vzorků spadá pod hodnotu ≥ 128 – v případě anti-A je to konkrétně 303 vzorků (60,84 %) a u anti-B se jedná o 169 vzorků (33,94 %). Zajímavostí je, že nárůst počtu vzorků u anti-B protilátek je relativně pozvolný, zatímco u anti-A protilátek pozorujeme prudký nárůst mezi titrem 1:64 a 1:128.

Obecně lze konstatovat, že rozložení četností titru protilátek IgG anti-A i anti-B dárců krevní skupiny 0 stoupá směrem k vyšším titrům, protože se ale neprováděla následná titrace pro vyšší titry (HT), nelze odhadnout výslednou podobu křivky. Pravděpodobně bude opět odpovídat normálnímu rozložení (Gaussova křivka)

s maximem okolo titru 256 – 512, kde anti-A bude asi mít titr vyšší. Je potřeba zdůraznit, že výška posledního sloupce neukazuje počet vzorků s hodnotou 1:128, ale součet všech počtů 1:128 a vyšší. Obalová křivka tedy nemůže směřovat k vrcholu těchto sloupců, musely by se vzít jen vzorky s aglutinační hodnotou reakce při 128 cca 1+ až max. 2+; vzorky, které tady byly 4+ budou mít titr výrazně vyšší.

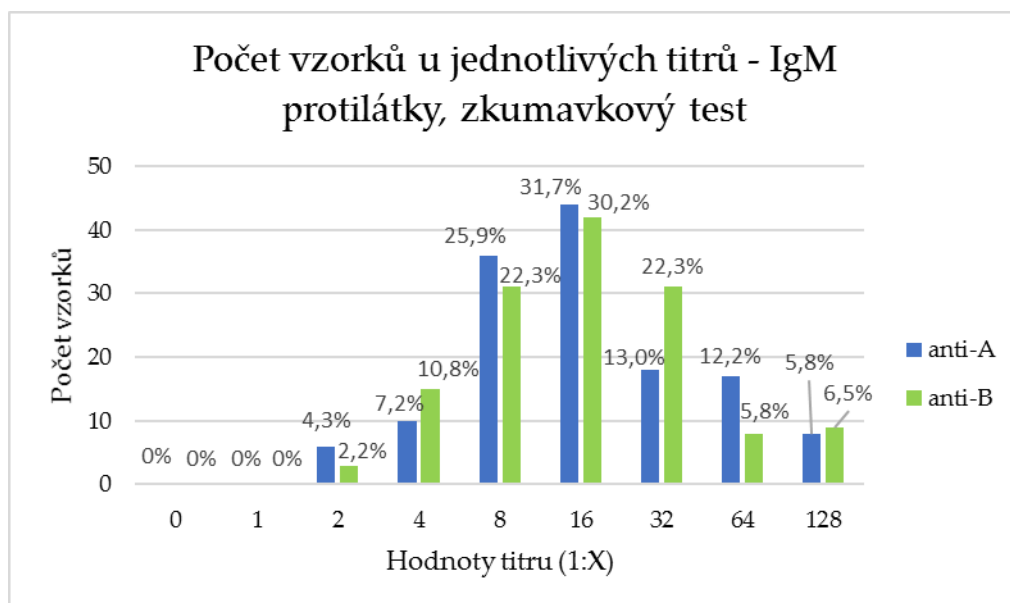
Přesto to se zdá, že shodně jako u IgM bude střední titr anti-B IgG mírně posunutý k nižší hodnotě a křivka bude méně strmá než u anti-A IgG.

5.2 Měření pomocí manuálních metod

Stanovení titrů pomocí manuálních metod – zkumavkového testu a sloupcové aglutinace bylo provedeno za účelem porovnání vzájemné shody výsledků z analyzátoru a manuálních metod. Jejich výhodou je možnost měřit i v rozmezí vysokého titru pro upřesnění výsledků z analyzátoru. Celkem bylo manuálními metodami změřeno méně vzorků než na analyzátoru, neboť provedení manuálních metod je časově náročné a nebylo tedy možné proměřit tak všechny vzorky jako na analyzátoru. Pro představu porovnání shodnosti výsledků je však naměřený počet vzorků dostačující.

5.2.1 Stanovení titru protilátek třídy IgM

Všechny naměřené hodnoty titrů IgM protilátek jsou v rozsahu LT – tedy do max. 1:128. I když byly výsledky titrovány až do hodnoty titru 1:512, v žádném vzorku nedošlo v hodnotách HT k aglutinaci.

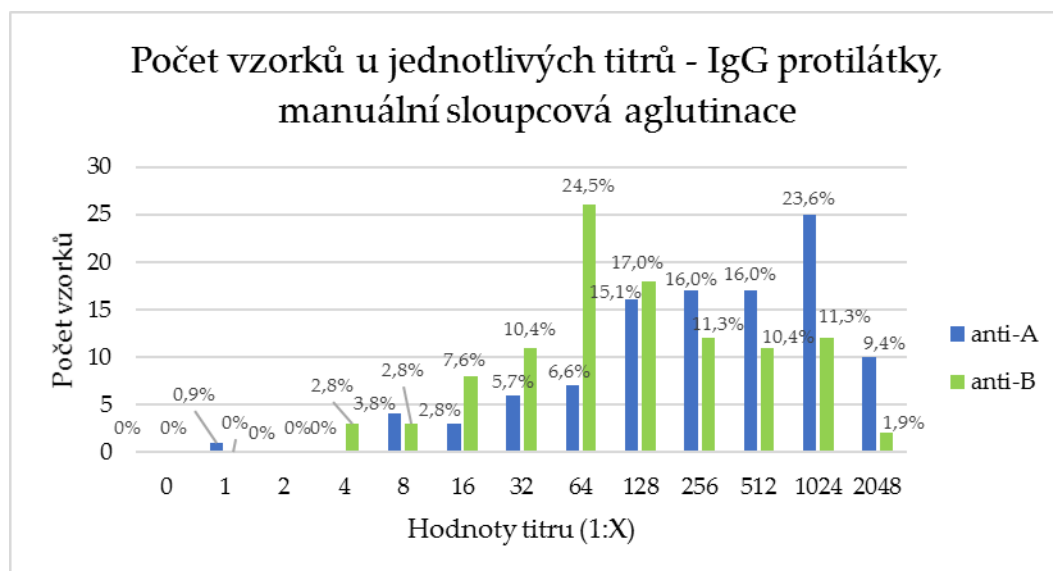


Obrázek 4 - Počet vzorků u jednotlivých hodnot titru IgM protilátek; měřeno zkumavkovým testem

U výsledků zkumavkového testu (viz obrázek 4) můžeme vidět, stejně jako u výsledků z analyzátoru, rozložení četností jednotlivých titrů připomínající Gaussovu křivku. Nejvíce vzorků mělo také titr 1:16, u anti-A se jednalo o 31,7 % vzorků (celkem 44 vzorků) a u anti-B to bylo 30,2 % (početně 42 vzorků). Změna nastala u anti-A, kdy druhým nejzastoupenějším titrem zde byl titr 1:8, u výsledků z analyzátoru to byl titr 1:32. U anti-B jsou na pomyslném druhém místě dva titry – 1:8 a 1:32, kdy oba jsou zastoupeny 31 vzorky, což odpovídá 22,3 %. Trend posunutí hodnot k jedné straně zde není tolik patrný – anti-B protilátky jsou v podstatě rovnoměrně rozptýleny na obě strany a anti-A protilátky jsou také téměř rovnoměrně zastoupené, i když na levé straně jich je nepatrně více. Horší shodu s obalovou ideální křivkou lze přisoudit právě zkumavkové metodě a subjektivnímu odečtu výsledků.

5.2.2 Stanovení titru protilátek třídy IgG

IgG protilátky byly zjišťovány pomocí sloupcové aglutinace. Jedním z cílů tohoto měření bylo upřesnění hodnoty titru z analyzátoru, neboť u většina vzorků byl titr vyhodnocen jako ≥ 128 . Sloupcová aglutinace umožnila upřesnit tyto hodnoty, jejichž výsledky jsou v následujícím grafu.



Obrázek 5 - Počet vzorků u jednotlivých hodnot titru IgG protilátek; měřeno manuální sloupcovou aglutinací

Na obrázku 5 je graf výsledků sloupcové aglutinace, jehož hodnoty zasahují až do vysokého titru. Přestože touto metodou bylo změřeno nejméně vzorků ze všech (celkem 106), jeví se graf jako relativně rovnoměrně rozložený. Nejčetnější zastoupení titrů se u obou protilátek významně liší – anti-A protilátky jsou nejvíce zastoupeny v hodnotě titru 1:1024, kde se nachází 23,6 % vzorků (tedy celkem 25 vzorků), zatímco anti-B protilátek je nejvíce zastoupeno při hodnotě 1:64, kde je 24,53 % vzorků (početně 26 vzorků). Zastoupení anti-A a anti-B je u IgG protilátek nerovnoměrné, protože ředění bylo provedeno do vyšších titrů než 128. Graf ukazuje, že rozložení četností titru protilátek IgG anti-A i anti-B dárců krevní skupiny 0 může odpovídat normálnímu rozložení s maximem 1:512-1024 pro anti-A a s maximem 1:64-128 pro anti-B. Je ale nutné zohlednit vliv IgM protilátky, tudíž vzorky s vysokou hodnotou titru IgM protilátky by pravděpodobně při ošetření DTT vyšly mnohem nižší.

5.3 Vzorky v rozsahu nízkého titru

Podle výsledků z analyzátoru Iris by teoreticky v rozsahu nízkého titru mohly být všechny vzorky, neboť u hodnoty 1:128 nevíme, zda titr daného vzorku bude opravdu 1:128 nebo již bude v hodnotách vysokého titru. Počet vzorků, které by

teoreticky nemusely být v rozsahu LT (titr ≥ 128) je pro IgM 33 vzorků a pro IgG 338 vzorků. Zatímco u IgG protilátek je theoreticky mimo LT většina vzorků (67,9 %), u protilátek třídy IgM je to pouze 6,6 %.

U manuálních metod víme jistě, že vzorky buď mají, nebo nemají nízký titr protilátek. Zkumavkovým testem jsme zjistili, že všechny měřené vzorky splňují pro IgM podmínky nízkého titru – jejich maximální hodnota byla 1:128. Naopak u protilátek třídy IgG je v rozmezí nízkého titru pouze 19 vzorků ze 106, tedy 17,9 %.

5.3.1 Vzorky splňující možné podmínky pro výrobu univerzální plné krve

V současné době není zatím určena pevná hranice titru IgM protilátek pro výrobu „univerzální“ plné krve. V laboratoři OHKT v Ústřední vojenské nemocnici je zatím považována za hranici pro IgM protilátky hodnota $\leq 1:50$, ovšem tato hodnota není ještě stoprocentně přijatá a definitivní. Na anti-A a anti-B protilátky třídy IgG nebude pravděpodobně brán zřetel, neboť se nejedná o klinicky významné protilátky. IgM protilátky anti-A a anti-B mohou způsobovat těžké potransfuzní reakce, a proto je potřeba, aby byl jejich titr v plné krvi, jakožto transfuzním přípravku, co nejnižší a bylo tak maximálně eliminováno riziko vzniku případných reakcí.

Ze všech vzorků změřených na analyzátoru odpovídá theoretické podmínce pro IgM – titr $\leq 1:50$ u anti-A i anti-B – celkem 407 vzorků, což je 81,7 %. Zbýlých 91 vzorků tuto podmínku nespĺňuje a nebylo by tedy možné je pro výrobu „univerzální“ plné krve použít.

Manuálním měřením byl titr IgM protilátek $\leq 1:50$ naměřen u celkem 104 vzorků, což představuje 74,8 % z celkového změřeného počtu 139 vzorků.

5.4 Srovnání výsledků z analyzátoru a manuálních metod

Jedním z cílů této práce bylo také zjistit, jaká je shoda mezi výsledky, které naměřil analyzátor a těmi, které jsme zjistili zkumavkovým testem respektive manuální sloupcovou aglutinací.

Tabulka 5 - Rozdíl výsledků z analyzátoru a manuálních metod

Rozdíl výsledků	IgM A ₁	IgM B	IgG A ₁	IgG B
Shoda	49	65	13	24
+1 řád	34	17	3	10
-1 řád	34	44	24	31
+ 2 řády	13	5	0	2
- 2 řády	7	6	29	24
+ 3 řády	1	1	0	1
- 3 řády	0	1	25	8
+ 4 řády	0	0	1	0
- 4 řády	0	0	11	5
+ 5 řádů	1	0	0	0
- 5 řádů	0	0	0	1
Celkem vzorků	139	139	106	106

V tabulce 5 je zpracován přehled shody, respektive rozdílnosti výsledků u měřených vzorků jednotlivými metodami. Rozdíly jsou vztaženy k hodnotám z analyzátoru – např. +1 řád znamená, že hodnota titru naměřená analyzátozem byla o jeden řád vyšší než výsledná hodnota manuální metody.

U stanovení anti-A protilátek třídy IgM nejsou patrné žádné velké neshody – u 49 vzorků jsou naměřené hodnoty shodné v obou metodách a u celkem 68 vzorků se hodnoty liší o jeden řád. To samé lze říci o anti-B protilátkách třídy IgM. Zde bylo dokonce 65 vzorků shodných a dalších 61 se lišilo pouze o jeden řád.

Vzájemné porovnání výsledků titrů IgG protilátek je obtížné. Výsledky jsou ovlivněny jednak měřením analyzátoru pouze v rozmezí LT – velká část vzorků měla titr $\geq 1:128$, čímž následně dochází k velkým rozdílům naměřených hodnot,

neboť analyzátor by teoreticky mohl naměřit shodné hodnoty, ale „neměl možnost“ dalšího ředění a měření a jednak také tím, že výsledky manuálně prováděné sloupcové aglutinace jsou zatíženy vlivem IgM protilátek. Proto na „aritmetické“ odchylky o několik řádů, uvedené v tabulce 5, je nutno hledět tímto úhlem pohledu a nelze z nich vyvozovat relevantní závěry.

5.4.1 Statistické zhodnocení měření

Hodnota korelace u stanovení titru IgM anti-A protilátek na analyzátoru a zkumavkovým testem je 0,690440; pro IgM anti-B protilátky pak 0,710613. Protilátky třídy IgG mají hodnoty korelace výsledků z analyzátorů a sloupcové aglutinace následující – 0,564453 pro anti-A a 0,509013 pro anti-B. Aby mohly být jednotlivé metody považovány za zastupitelné, je potřeba, aby se hodnota korelace pohybovala kolem 1, což je podmínka, která nebyla ani v jednom případě splněna.

Tabulka 6 - Přehled rozložení hodnot titrů

Metoda	Max. titr	Min. titr	Dolní kvartil	Horní kvartil
IgM A ₁ - IRIS	0,0	≥ 128,0	8,0	32,0
IgM B - IRIS	2,0	≥ 128,0	8,0	32,0
IgG A ₁ - IRIS	0,0	≥ 128,0	64,0	≥ 128,0
IgG B - IRIS	0,0	≥ 128,0	32,0	≥ 128,0
IgM A ₁ - ZT	2,0	128,0	8,0	32,0
IgM B - ZT	2,0	128,0	8,0	32,0
IgG A ₁ - SA	1,0	2048,0	128,0	1024,0
IgG B - SA	4,0	2048,0	64,0	256,0
Pozn.				
IRIS - měřeno na analyzátoru Galileo NEO Iris				
ZT - manuální metoda - zkumavkový test				
SA - manuální metoda - sloupcová aglutinace				

Tabulka 6 podává přehled o maximálních a minimálních hodnot, které byly u daných metod naměřeny a dále také horní a dolní kvartily. U výsledků z Iris jsou maximální hodnoty omezeny rozsahem měření analyzátoru (pouze LT).

Tabulka 7 - Přehled hodnot různých statistických veličin na hladině pravděpodobnosti < 0,0500

Metoda	Průměr	Směrodatná odchylka	Rozdíl	Pravděpodobnost p
IgM A ₁ - IRIS	25,5827	24,5097	-1,2662	0,5108
IgM A ₁ - ZT	26,8489	31,0082		
IgM B - IRIS	21,9137	25,5886	-4,2878	0,0224
IgM B - ZT	26,2014	30,6370		
IgG A ₁ - IRIS	97,0943	43,9030	-486,9151	5,2635 · 10 ⁻¹⁴
IgG A ₁ - SA	584,0094	600,5781		
IgG B - IRIS	71,7547	44,3207	-207,2264	1,5635 · 10 ⁻⁷
IgG B - SA	278,9811	400,0770		

Z tabulky 7 můžeme vyčíst následující poznatky. Jediné metody, u kterých je hodnota pravděpodobnosti $p > 0,05$ a můžeme je tedy považovat za spolehlivé, je stanovení titru anti-A protilátek třídy IgM zkumavkovým testem a na analyzátoru Iris, kde je rozdíl průměrů naměřených hodnot pouze -1,2662. U dalších metod to již ale neplatí; jediné, kde je rozdíl ještě přípustný, ale stejně již nemůžeme říci, že jsou metody zastupitelné, je stanovení titru IgM anti-B protilátek, kdy je hodnota pravděpodobnosti 0,0224. U IgG anti-A i anti-B protilátek jsou hodnoty pravděpodobnosti velmi nízké, a proto nelze považovat výsledné hodnoty titrů z analyzátoru a sloupcové aglutinace za srovnatelné.

6 DISKUZE

Cílem praktické části bakalářské práce bylo zjistit, kolik procent dárců s krevní skupinou 0 na území České republiky, má nízký titr protilátek a jejichž krev by tak mohla být použita k výrobě „univerzální“ plné krve. Takovéto transfuzní přípravky by byly podávány pacientům pouze v případech život ohrožujících stavů, jakými jsou např. polytraumata a masivní krvácení.

V současné době je transfuze homologní plné krve využívána především ve vojenském zdravotnictví a v některých zemích na urgentních příjmech, v leteckých ambulancích a v odlehlých oblastech. V polní válečné medicíně a v odlehlých oblastech se jedná o čerstvě odebranou plnou krev, na urgentních příjmech a leteckých ambulancích o plnou krev skladovanou při 2-6°C, maximálně 1-2 týdny. Přesto, že aktuální snahou je vyhnout se teoretickému poškození pacienta hemolýzou působením aglutininů v podané krvi, jedná se na základě dlouhodobých klinických přehledů o riziko velmi malé. Například během války ve Vietnamu bylo mezi lety 1967 a 1969 vojenskými lékaři USA podáno více než 350 000 jednotek „univerzální“ plné krve krevní skupiny 0 a hlášený počet vzniku hemolytických reakcí byl velmi nízký – 1:10 000 transfundovaných jednotek plné krve a navíc se jednalo převážně o reakce klinicky nevýznamné. [22]

V rámci zavedení transfuzí plné krve pro civilní obyvatelstvo by byla používána pouze „univerzální“ plná krev; tedy taková, která by byla výhradně od dárců krevní skupiny 0, aby ji bylo možné používat bez ohledu na krevní skupinu příjemce, stejně jako je v současné době podávána univerzální plazma skupiny AB a univerzální erytrocytární přípravky skupiny 0 RhD negativní, případně trombocytární přípravky. Dárci, jejichž krev by byla použita na výrobu „univerzální“ plné krve by museli splňovat nejen standardní požadavky na krevní dárce, ale také by musel být titr přirozených protilátek anti-A a anti-B v jejich plazmě co nejnižší. Tím by došlo ke snížení rizika vzniku potransfuzních reakcí či komplikací, které by mohly

vzniknout v případech, že by měl příjemce jinou krevní skupinu než 0, a tím pádem by protilátky přítomné v transfundované krvi byly inkompatibilní s erytrocytárními antigeny příjemce.

Při podání anti-A a anti-B protilátek z plné krve krevní skupiny 0 příjemcům s krevní skupinou A, B nebo AB je vyšší riziko vzniku imunitně zprostředkovaných hemolytických potransfuzních reakcí. Typické pro IgM protilátky je vznik intravaskulární hemolýzy, zprostředkované složkami komplementu, která může vést k ohrožení pacienta na životě v důsledku selhání orgánů. Protilátky třídy IgG (anti-A a anti-B) vyvolávají extravaskulární hemolýzu, jež ve většině případů neohrožuje pacienta na životě a zároveň její výskyt není příliš častý. Ke snížení rizika vzniku těchto komplikací by mělo přispět vybírání dárců s nízkým titrem protilátek. [23]

Pro zavedení výroby transfuzních přípravků „univerzální“ plné krve pro rutinní použití je potřeba zvolit metodu, která by byla pro stanovení titrů protilátek spolehlivá a přesná a bylo možné ji automatizovat. V Ústřední vojenské nemocnici v Praze se nyní intenzivně pracuje na standardizaci a nastavení titrace prostřednictvím automatického analyzátoru Galileo NEO Iris, ke kterému by měla přispět i tato práce. Zatím jsou v této problematice prováděna zkušební měření, která srovnávají výsledky analyzátoru s výsledky odpovídajících manuálních metod.

Na jiných pracovištích České republiky byly také prováděny srovnávací studie na stanovení titru přirozených protilátek anti-A a anti-B, většinou však v trombocytárních přípravcích. Každopádně i tyto výsledky lze použít pro srovnání shodnosti měření. Například ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové byla takováto studie provedena v roce 2014 a výsledky jsou následující. Celkem bylo vyšetřeno 252 vzorků různých krevních skupin – A, B i 0. Výsledky byly porovnávány s manuálně provedeným zkumavkovým testem a rozdíly se pohybovaly od jednoho

až do pěti řádů. Celkově byly hodnoty titrů naměřené analyzátozem nižší než u manuálních metod. [24]

Obecně lze o výsledcích z analyzátozu říci, že metody titrací IgG protilátek vycházejí více shodně s výsledky manuálních metod z důvodu nižší citlivosti metody na centrifugaci a odečítání výsledku bez potřeby roztřepání. Titry protilátek IgM vycházejí na analyzátozech většinou nižší než z manuálních metod, neboť analyzátoz roztřepe krvinky mnohem intenzivněji, než je tomu v případě manuálního stanovení. Tomuto lze však zabránit individuálním nastavením parametrů centrifugace a třepání v konkrétní laboratoři při validaci metody. [24]

Výsledky našeho měření jsou však v rozporu s výše zmíněnými závěry. Hodnoty titrů IgM protilátek vycházely často naprosto shodně, případně se lišily většinou pouze o jeden řád, a to i přes zatíženost metody chybou v podobě subjektivního hodnocení výsledku – intenzita roztřepání a přesnost odečtení pozitivita, respektive negativita výsledku. Naopak IgG protilátky vykazovaly velké neshody a výsledné hodnoty manuální sloupcové aglutinace vycházely vysoké. I když se hodnoty často lišily o několik řádů (většinou o dva až tři řády), je nutné brát v úvahu, že jsme měřili pouze v rozsahu nízkého titru, tudíž dochází ke zkreslení shodnosti výsledků. Všechna hodnocení a srovnání, která jsou v této práci obsažena, jsou srovnávána s hodnotou 1:128, i když ve skutečnosti analyzátoz udával hodnotu $\geq 1:128$ (tedy součet všech titrů od hodnoty 1:128 včetně) a je tak možné, že by v případě dalšího ředění (v hodnotách vysokého titru) stanovil stejnou hodnotu, kterou jsme naměřili manuálně. Není možné zpracovávat statistické zhodnocení dat z hodnoty, která není jasně číselně definovaná. Vysoké hodnoty titru u IgG protilátek naměřené manuální sloupcovou aglutinací jsou ovlivněny IgM protilátkami, jejichž interference výsledky falešně zvyšuje.

Kromě metody je také potřeba stanovit hranici, která bude rozhodovat o tom, zda bude daná krev vhodná pro výrobu „univerzální“ plné krve či nikoliv. Momentálně

není v České republice žádná pevná hodnota stanovena, ale za zatím nejvíce diskutovanou a pravděpodobně i v budoucnu přijatou hodnotu pro anti-A a anti-B protilátky třídy IgM je titer $\leq 1:50$. Co se týče protilátek IgG anti-A a anti-B, nepředpokládá se, že budou hrát významnou roli při vybírání dárců s nízkým titrem, neboť nejsou, oproti IgM, klinicky významné.

Na několika zdravotnických zařízeních v USA již aplikaci plné krve na urgentních příjmech praktikují. Zajímavostí však je, že ani v tomto případě neexistuje jednotné kritérium pro výběr dárců. V jednom zařízení mají hranici nastavenou na titer < 50 , zatímco na druhém je hraniční hodnota titru < 200 . Při aplikaci jedné až dvou jednotek „univerzální“ plné krve s titrem anti-A a anti-B < 50 není zatím evidován případ, kdy by na základě transfuze plné krve došlo k náznakům hemolýzy. [25]

Jedna ze studií se zabývala mj. otázkou stálosti titru protilátek v krvi dárců. Celkem bylo testováno 56 dobrovolníků (muži i ženy) po dobu 12 měsíců, přičemž krev kontrolu titru jim byla odebírána pravidelně každé tři měsíce. Zjistilo se, že titer protilátek je po dobu jednoho roku víceméně stabilní, pod podmínkou, že dárci darují v intervalu ≥ 3 měsíce. Maximální odchylky titru se průměrně pohybují v rozmezí jednoho řádu. [25]

Hlavní výhodou plné krve při léčbě masivního krvácení, oproti jednotlivým složkám je, že obsahuje všechny důležité složky – erytrocyty, koagulační faktory obsažené v plazmě i trombocyty a splňuje tak podmínky pro účinnou hemostatickou resuscitaci. Současně dojde ke snížení počtu transfundovaných přípravků, a tedy i k množství tekutin, které jsou v transfuzních přípravcích obsaženy a nemají přímý vliv na hemokoagulaci či přenos kyslíku v krvi pacienta. Výhodou je též zjednodušení postupu při aplikaci transfuzních přípravků pro zdravotnický personál. [22]

7 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, kolik procent dárců krevní skupiny 0 má nízký titr anti-A a anti-B protilátek a zároveň porovnat výsledky naměřené na analyzátoru Galileo NEO Iris s výsledky manuálních metod – zkumavkovým testem a sloupcovou aglutinací.

Vzhledem k tomu, že měření na analyzátoru Iris probíhalo pouze v nízkém titru, tak by teoreticky všech 498 vzorků mohlo nízký titr mít. Ve skutečnosti je ale u 6,6 % vzorků titr IgM ≥ 128 , a tím pádem nemusí být v rozmezí nízkého titru. Obdobně je tomu protilátek IgG, kdy hraniční hodnotu titru má dokonce 67,9 % vzorků.

Manuálním zkumavkovým testem jsme zjistili, že všechny testované vzorky jsou pro IgM protilátky v rozmezí nízkého titru. Naopak u IgG protilátek jsme manuální sloupcovou aglutinací zjistili, že 82,1 % leží mimo hranice nízkého titru.

Vzájemným porovnáním výsledků z analyzátoru a manuálních metod jsme došli k závěru, že před zavedením použití „univerzální“ plné krve v transfuziologii bude potřeba ještě laboratorní metody standardizovat pro rutinní použití tak, aby byly robustní, spolehlivé a vzájemně srovnatelné. Kromě toho je za potřebí stanovit pevnou hranici titru IgM protilátek, která by určovala vhodnost, respektive nevhodnost použití dárcovské krve pro výrobu „univerzální“ plné krve.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AB0	skupinový systém erytrocytů AB0
ACD	anémie chronických chorob (anaemia of chronic diseases)
AGH	antiglobulinové sérum (antiglobulinum humanum)
AIHA	autoimunitní hemolytická anémie
anti-HLA	protilátky proti antigenům leukocytů
anti-HNA	protilátky proti antigenům neutrofilů
CCD	charge-coupled device
CD4+	diferenční znak pomocných T lymfocytů
CD8+	diferenční znak cytotoxických T lymfocytů
ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulopatie (disseminated intravascular coagulopathy)
DTT	dithiotreitol
D ^{variant}	parciální D antigen Rh systému erytrocytů
D ^{weak} , D ^w	slabý D antigen Rh systému erytrocytů
E	erytrocyty (transfuzní přípravek)
EA	erytrocyty z aferézy
EAD	erytrocyty z aferézy, deleukotizované
EAR	erytrocyty z aferézy, resuspendované
EB	erytrocyty bez buffy-coatu

EBR	erytrocyty bez buffy-coatu, resuspendované
ED	erytrocyty deleukotizované
ER	erytrocyty resuspendované
ERD	erytrocyty resuspendované, deleukotizované
FFP	čerstvě zmrazená plazma (fresh frozen plasma)
HFA	antigen s vysokou frekvencí výskytu (high frequency antigen)
HIV	virus lidské imunodeficiency (human immunodeficiency virus)
HT	vysoký titr (high titer)
HTR	hemolytická potransfuzní reakce
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgG A ₁	metoda stanovení titru IgG anti-A protilátek
IgG B	metoda stanovení titru IgG anti-B protilátek
IgM	imunoglobulin M
IgM A ₁	metoda stanovení titru IgM anti-A protilátek
IgM B	metoda stanovení titru IgM anti-B protilátek
IVLP	individuálně vyráběné léčivé přípravky
K ₂ EDTA	draselná sůl etylendiaminotetraoctové kyseliny
LFA	antigen s nízkou frekvencí výskytu (low frequency antigen)
LISS	roztok o nízké iontové síle (low ionic strength salt solution)

LT	nízký titer (low titer)
NAT	nepřímý antiglobulinový test
NK	přírození zabíječi (natural killers)
OHKT	Oddělení hematologie a krevní transfuze
PAT	přímý antiglobulinový test
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
Rh	skupinový systém erytrocytů Rhesus
se	recesivní alela sekretorového genu
Se	dominantní alela sekretorového genu
T.D.	terapeutická dávka
T.U.	transfuzní jednotka
TACO	transfuzí vyvolané oběhové přetížení (transfusion associated circulatory overload)
TP	transfuzní přípravek
TRALI	akutní poškození plic v důsledku podání transfuze (transfusion related acute lung injury)

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LOCHMANOVÁ, Alexandra. *Základy imunologie*. 1. Ostrava: Ostravská univerzita, Zdravotně sociální fakulta, 2006. ISBN 80-736-8153-6.
- [2] HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 5. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
- [3] PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství II: Transfuzní lékařství*. 1. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3460-6.
- [4] MASOPUST, Jiří a Martin PÍSAČKA. *Praktická imunohematologie: Erytrocyty*. 1. Praha: Mladá fronta, 2016. ISBN 978-80-204-3740-2.
- [5] LAB Guide: Průvodce laboratoří. *LAB Guide: Průvodce laboratoří* [online]. 2014 [cit. 2018-01-27]. Dostupné z: <http://labguide.cz/protilatky/>
- [6] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.
- [7] ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST. *Transfuzní lékařství*. 1. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4534-3.
- [8] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny: II. díl*. 2. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1415-1.
- [9] BOHONĚK, Miloš. *Imunohematologie erytrocytů*. Praha, 2017.
- [10] MURRAY, Robert, Daryl GRANNER, Peter MAYES a Victor RODWELL. *Harperova Biochemie*. 23. Jinočany: Nakladatelství H&H, 2001. ISBN 80-7319-003-6.
- [11] ŠEVČÍK, Pavel. *Intenzivní medicína*. 3. Praha: Galén, 2014. ISBN 978-80-7492-066-0.

- [12] Co se z dárcovy krve použije. *Český červený kříž: Oficiální stránky Českého červeného kříže* [online]. b.r. [cit. 2018-05-10]. Dostupné z: http://www.cervenyriz.eu/cz/bdk_typy.aspx
- [13] PENKA, Miroslav, Igor PENKA a Jaromír GUMULEC. *Krvácení*. 1. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-0689-4.
- [14] *Účelná hemoterapie* [online]. In: . b.r. [cit. 2018-05-10]. Dostupné z: http://public.fnol.cz/www/3ik/data/soubory_cz/sulovska_ucelna_hemoterapie.pdf
- [15] PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství I: Hematologie*. 1. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [16] POKORNÝ, Jan. *Lékařská první pomoc*. 2. Praha: Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-322-8.
- [17] BOHONĚK, Miloš. *Účelná hemoterapie, potransfuzní reakce a komplikace*. Praha, 2017.
- [18] PŘIBYLOVÁ, Milena. *Vyšetření krevní skupiny AB0 RhD, ... na automatickém analyzátoru GALILEO NEO IRIS TM u dárců krve*. ÚVN-VFN Praha, 2017, 7 s.
- [19] HORČIČKOVÁ, Dana. *Stanovení titru antierytrocytárních protilátek*. ÚVN-VFN, Praha, 2017.
- [20] Transfusion. In: *Clinical Biology and Medical Microbiology Blog* [online]. b.r. [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: http://medimic.blogspot.cz/2014/05/transfusion_23.html
- [21] *NEO Iris - návod k použití*. b.r.

- [22] YAZER, Mark H., Byron JACKSON a Jason L. SPERRY. Initial safety and feasibility of cold-stored uncrossmatched whole blood transfusion in civilian trauma patients. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* [online]. 2016, **81**(1), 21-26 [cit. 2018-05-10]. DOI: 10.1097/TA.0000000000001100. ISSN 2163-0755. Dostupné z: https://journals.lww.com/jtrauma/Abstract/2016/07000/Initial_safety_and_feasibility_of_cold_stored.5.aspx
- [23] BELIN, Tamara, Mark YAZER a Michael MELEDEO. An evaluation of methods for producing low-titer group 0 whole blood to support military trauma resuscitation. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* [online]. 2017, **82** [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.1097/TA.0000000000001437. ISSN 2163-0755.
- [24] TSOUASSA, Zlata. *Titrace - zkušenosti IgG + IgM*. 2015.
- [25] SPROGØE, Ulrik, Mark YAZER a Mads RASMUSSEN. Minimal variation in anti-A and -B titers among healthy volunteers over time. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* [online]. 2017, **82**, 87-90 [cit. 2018-05-10]. DOI: 10.1097/TA.0000000000001432. ISSN 2163-0755. Dostupné z: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=01586154-201706001-00013>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Hodnocení výsledků aglutinace [20]	49
Obrázek 2 - Počet vzorků u jednotlivých hodnot titru IgM protilátek; měřeno na analyzátoru Galileo NEO Iris	55
Obrázek 3 - Počet vzorků u jednotlivých hodnot titru IgG protilátek; měřeno na analyzátoru Galileo NEO Iris	56
Obrázek 4 - Počet vzorků u jednotlivých hodnot titru IgM protilátek; měřeno zkumavkovým testem	58
Obrázek 5 - Počet vzorků u jednotlivých hodnot titru IgG protilátek; měřeno manuální sloupcovou aglutinací	59

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 - Fenotypové projevy genotypů AB0 systému [9, vlastní zdroj]	19
Tabulka 2 - Přehled antigenů a protilátek jednotlivých krevních skupin [3, vlastní zdroj]	19
Tabulka 3 - Přehled systémů krevních skupin [7, vlastní zdroj]	22
Tabulka 4 - Geometrická řada titrů [19, vlastní zdroj]	46
Tabulka 5 - Rozdíl výsledků z analyzátoru a manuálních metod	61
Tabulka 6 - Přehled rozložení hodnot titrů	62
Tabulka 7 - Přehled hodnot různých statistických veličin na hladině pravděpodobnosti $< 0,0500$	63