

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Vyšetření krevních skupin v terénní hematologické laboratoři

Bakalářská práce

Vypracovala: Eva Ondrušková

Vedoucí práce: MUDr. Karel Blažek

České Budějovice 2010

ABSTRACT:

Ondrušková, E. 2010: Field detection of blood groups in haematological laboratory

This thesis „Field detection of blood groups in haematological laboratory“ deals with questions concerning blood groups .

In the theoretical part I deal with historical aspects, the role of antigens and antitoxins, the importance of the ABO system, the Rh factor and with other blood group systems. A part of my bachelor thesis is a description of the importance of blood group qualities in transfusion medicine and in immunogenetics too. The latter deals with the danger of post-transfusions and hemolytic disorders of new born babies. At the end of the theoretical part I mention detection methods which can be used to verify the blood group of the examined patient.

In the practical part of this thesis I examined 75 blood samples from different patients by means of three different detection methods. These samples were delivered in the laboratory Laboma s.r.o. in České Budějovice. The aim was to detect the blood groups and compare these methods to each other in respect of their time consumption, financial means, work demand and reliability. After all results have been compared, it is obvious that all methods are useful for a correct detection of blood groups and can be applied in each laboratory. Therefore, this result has confirmed my hypothesis. Nevertheless, during my examination work new hypothesis have arisen because I had decided to compare the occurrence of blood groups with men and women who descend from the region of southern Bohemia.

This thesis could be useful as a study aid for students of the Faculty of Health and Social Studies and as a comprehensive study material for experts.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci **Vyšetření krevních skupin v terénní hematologické laboratoři** vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách

České Budějovice 5. 5. 2010

.....

PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomohli s touto prací. Především bych ráda poděkovala svému školiteli MUDr. Karlovi Blažkovi za vedení bakalářské práce a přátelský přístup. Dále bych chtěla poděkovat paní Aleně Fálové za cenné rady, pomoc při práci v laboratoři a trpělivost. Dík patří mé rodině a příteli za podporu při studiu.

OBSAH:	5
Úvod	7
1. Současný stav	8
1. 1 Krevní skupiny.....	8
1.1.1 Historické aspekty	8
1.1.2 Současné poznatky.....	8
1.1.3 Protilátky (aglutininy) krevních skupin	9
1.1.4 Antigeny (aglutinogeny) krevních skupin	10
1.2 Skupinový systém erytrocytů	10
1.2.1 AB0 – systém.....	10
1.2.1.1 Dědičnost krevních skupin	11
1.2.1.2 Biochemie, struktura.....	12
1.2.1.3 Krevní podskupiny	13
1.2.1.4 H deficitní fenotyp.....	13
1.2.1.5 Získané změny	13
1.2.1.6 Význam skupinového systému AB0 pro transfuzi	14
1.2.1.7 Výskyt krevních skupin	15
1.2.2 Rh – systém	16
1.2.2.1 Historie	16
1.2.2.2 Struktura a funkce.....	16
1.2.2.3 Rh antigeny	16
1.2.2.4 Rh protilátky	17
1.2.2.5 Dědičnost	18
1.2.2.6 Výskyt.....	18
1.3 Ostatní krevní skupinové systémy	19
1.4 Význam krevních skupinových vlastností v lékařství	20
1.4.1 Krevní transfuze.....	20
1.4.2 Hemolytické onemocnění novorozenců	22
1.4.3 Imunogenetika	23
1.4.4 Hemolytické anémie a jiné onemocnění.....	24

1.5 Imunohematologické vyšetřovací metody	25
1.5.1 Laboratorní důkaz krevních skupin	25
1.5.1.1 Sklíčková metoda.....	26
1.5.1.2 Zkumavková metoda	26
1.5.1.3 Mikrotitrační metoda	27
1.5.1.4 Vyšetřování na automatických přístrojích	27
2. Cíl práce a hypotézy	28
2.1 Cíl bakalářské práce.....	28
2.2 Předpokládané hypotézy	28
3. Materiál a použitá metodika.....	29
3.1 Materiál.....	29
3.2 Použitá metodika	29
3.2.1 Sklíčková metoda.....	29
3.2.2 Zkumavková metoda	31
3.2.3 Metoda na mikrotitračních destičkách.....	32
4. Výsledky	35
4.1 Rozdělení vyšetřovaných pacientů podle pohlaví	35
4.2 Vyšetření krevních skupin u žen	35
4.3 Vyšetření krevních skupin u mužů	38
4.4 Porovnání metod u vyšetřovaných krevních skupin v systému AB0 a Rh.....	46
5. Diskuse	49
6. Závěr	52
7. Seznam použité literatury a pramenů.....	53
8. Klíčová slova.....	56
9. Přílohy.....	57

Úvod

Téma „**Vyšetření krevních skupin v terénní hematologické laboratoři**“ jsem si vybrala, protože mě daná problematika zajímala a při mém zkoumání se mi i zalíbila. Zajímala mě otázka, zda je možné vyšetřit krevní skupiny třemi různými metodami, jestli se všechny tři shodnou na stejném výsledku a zda je lze vykonávat v každé laboratoři.

Při své práci jsem narazila na řadu překážek, které jsem se snažila vyřešit a zvládnout. Při čerpání z literárních pramenů jsem zjistila, jak je tematika krevních skupin a transfuzního lékařství rozsáhlá. Není možné se o všech informacích zmínit, proto jsem se ve své bakalářské práci snažila popsat nejdůležitější problematiku týkající se krevních skupin.

Bakalářská práce je rozdělena na část teoretickou, ve které se věnuji historii krevních skupin, současným poznatkům, ABO systému, Rh systému, krevním transfuzím, hemolytickému onemocnění novorozence, potransfuzním reakcím a také imuno hematologickým vyšetřovacím metodám. V praktické části popisuji, jak jsem jednotlivé metody prováděla.

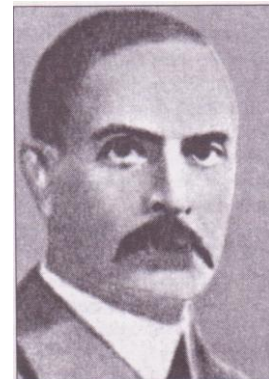
Doufám, že tato práce poslouží nejen jako studijní materiál pro studenty Zdravotně sociální fakulty, ale i jako ucelený materiál pro osoby, které se touto problematikou zabývají.

1. Současný stav

1.1 Krevní skupiny

1.1.1 Historické aspekty

Rakouský vědec Karl Landsteiner (obr. 1; Švejnoha, 2000) roku 1900 vydává dílo, ve kterém uvádí, že lidská krev musí obsahovat přirozené protilátky, protože často shlukuje cizí červené krvinky. A také tvrdí, že podle shlukovatelnosti krvinek určitými séry, které obsahují protilátky, se lidé sdružují do „skupin“ (Švejnoha 2000). Obdržel Nobelovu cenu za lékařství v roce 1930. Působil ve Vídni, Haagu a New Yorku a připsal si zásadní příspěvky v oblasti imunohematologie a to především u krevních skupin A, B, 0 a Rh faktoru (Gröger 2001).



Obr. 1 **Karl Landsteiner**

Profesor Jan Janský (obr. 2; Švejnoha, 2000) roku 1907 nezávisle na poznacích Landsteinera zjistil, že každého člověka lze zařadit podle vlastností séra a krvinek do jedné ze čtyř krevních skupin. Toto zjištění patří k velkému, celosvětově významnému objevu, kdy přesvědčivě prokazuje existenci čtvrté krevní skupiny a vytváří představu uzavřeného systému krevních skupin (Švejnoha 2000). Skupiny označil římskými číslicemi, ale ty byly nahrazeny písmeny A, B, 0 (Malaska 1957).



Obr. 2 **Jan Janský**

1.1.2 Současné poznatky

Díky objevu krevních skupin, které mají velký význam v medicíně a jsou základním pilířem v transfuzním lékařství, mohlo dojít k rozvoji dalších medicínských oborů, které jsou závislé na hemosubstituční terapii. Mají nezastupitelné místo i ve sféře

imunohematologické; a to ve fetální medicíně při diagnostice, monitorování, terapii a prevenci fetomaternálních cytopeniích.

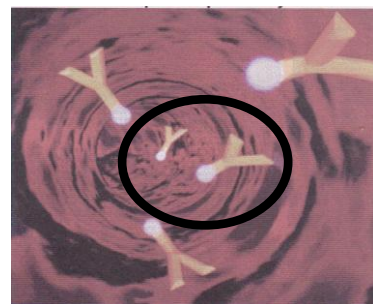
Rozvoj imunohematologie, která studuje příčiny, průběh a následky obranných reakcí organismu, které jsou vyvolány krevními antigeny a protilátkami (Bičík 1992), měl ve 20. století velký význam pro nové prohloubení poznatků na molekulární úrovni ve vědních oborech jako je biochemie, genetika a imunologie. Na úplném počátku byly známy pouze dva antigeny jednoho systému a v 21. století již rozeznáváme 308 antigenů, z nichž je 270 zařazeno do 30 systémů krevních skupin (Písačka 2009).

Klinický význam krevních skupin je daný pravidelnými lidskými protilátkami proti nim. Významné jsou protilátky, které způsobují rozpad červených krvinek, mohou způsobit hemolytické onemocnění novorozence, akutní nebo pozdní potransfuzní hemolytickou reakci (Písačka 2009).

Krevní skupiny vznikají expresí antigenů na extracelulární plochu membrány červených krvinek. V některých případech jsou tyto antigeny k dispozici pouze na erythrocytech (Kirkman 2007), některé antigeny jsou na všech krevních buňkách, na erythrocytech a tkáních (Čermáková et al. 2008).

1.1.3 Protilátky (aglutininy) krevních skupin

Protilátky krevních skupin (obr. 3; Engelfriet et al., 2003) hrají důležitou roli v transfuzním lékařství i v těhotenství. Klinicky významné protilátky jsou schopné způsobit nežádoucí účinky po transfuzi, a to od mírných až po těžké, a mohou být příčinou hemolytické nemoci plodu.



Obr. 3 Protilátky krevních skupin

Principy metodiky pro určování krevních skupin a identifikaci protilátek se změnily jen velmi málo a opírají se o sérologické metody, které vyvolávají aglutinaci červených krvinek (Poole and Daniels 2007).

1.1.4 Antigeny (aglutinogeny) krevních skupin

Biochemické a molekulárně genetické studie prokázaly, že antigeny krevní skupiny jsou přítomny na povrchu buněk včetně sacharidových epitopů pro glykoproteiny anebo glykolipidy a peptidové antigeny pro bílkoviny, které jsou vloženy do membrány přes jednu nebo více transmembránových domén nebo přes komplexy, které jsou složené z několika složek membrány (Cartron and Colin 2001).

1.2 Skupinový systém erytrocytů

Imunohematologie červených krvinek je definována vyšetřováním erytrocytárních protilátek a antigenů, kterými jsou krevní skupiny (Čermáková et al. 2008).

Jedná se o soubor fenotypů, které jsou definovány lidskými protilátkami, jež mají známou biochemickou podstatu, chromozomální lokaci s identifikovaným a sekvenovaným genem. V systému může být pouze jeden antigen (P, H), nebo i desítky antigenů (Rh, MNS).

Kolekce je soubor dvou a více antigenů se sérologickou, biochemickou a genetickou příbuzností, ale nesplňující všechna kritéria systému. Do sérií se zařazují antigeny, které zatím neodpovídají definovaným systémům a kolekcím (Písačka 2009).

V současné době existuje 30 uznávaných systémů krevních skupin, včetně systému Rh. Pochopení systémů krevních skupin má dopad i mimo transfuzní lékařství v oblastech, jako jsou transplantace, autoimunita a populační biologie (Baiochi and Nardoza 2009).

1.2.1 AB0 - systém

Skupinový systém AB0 je ze všech skupinových systémů erytrocytů nejdéle známý a má největší význam.

1.2.1.1 Dědičnost krevních skupin AB0

Tento systém určují 3 alelové geny – A, B, 0. Alely A, B, 0 se navzájem homozygotně a heterozygotně kombinují (tabulka 1; Engelfriet et al., 2003; upraveno) a díky tomu dávají vzniku čtyřem základním fenotypům - A, B, 0, AB. Geny A, B mají charakter dominantních genů a gen 0 je recesivní. Tím, že gen 0 má recesivní vlastnosti, nemá funkci a není schopný změnit antigen H na jiný. Navenek se projevuje jen tehdy, pokud se v genotypu nachází v homozygotní formě 00. Tento genotyp reprezentuje krevní skupinu 00. Geny A a B vytváří aglutinogeny nejen, když se nachází ve formě homozygotní, ale i když jsou v heterozygotní kombinaci. Vždy se jedná o skupinu AB, pokud jsou geny A a B v heterozygotní kombinaci. Pokud jsou v kombinaci s genem 0, tak dominantní gen A potlačuje recesivní gen 0 a projevuje se navenek jako krevní skupina A. Totéž platí i pro skupinu B (Kubisz et al. 2006).

Tabulka 1. Genotyp a fenotyp krevních skupin

Krevní skupina	Genotyp	Alely v zygote	Fenotyp	Antigeny
A	AA	Homozygotní	A	A
A	A0	Heterozygotní	A	A
B	BB	Homozygotní	B	B
B	B0	Heterozygotní	B	B
AB	AB	Heterozygotní	AB	A i B
0	00	Homozygotní	0	není

Každý člověk má dvě alely AB0 systému, jedna se dědí od otce a druhá od matky, díky tomu vzniká šest možných kombinací a vznikají tyto genotypy AA, A0, BB, B0, AB, 00 (Engelfriet et al. 2003).

Základem rozdělení lidí do 4 krevních skupin je skutečnost, zda se na červených krvinkách vyskytují či nikoli aglutinogeny A a B. Lidé, jejichž krevní skupina je A, mají ve svých krvinkách aglutinogen A. Lidé se skupinou B mají přítomný aglutinogen B ve svých krvinkách. Aglutinogeny A i B vlastní lidé s krevní skupinou AB, zatímco lidé s krevní skupinou 0 nevlastní aglutinogen ani A ani B.

Uvedené krvinkové aglutinogeny doprovází protilátky, jejichž přítomnost v krevní plazmě je přirozená a mají vlastnost shlukovat krvinky opačné krevní skupiny. Tyto protilátky nazýváme aglutininy a jsou označeny řeckými písmeny α a β . Aglutinin α se nazývá také anti-A a má schopnost shlukovat krvinky s krvinkovou vlastností A. Zatímco aglutinin β , který se značí také anti-B, shlukuje krvinky s krvinkovou vlastností B. Je více než jasné, že člověk za normálních okolností nemůže mít ve svém séru aglutinin proti jeho vlastním krvinkám, neboť by docházelo ke shlukování a následovala by hemolýza vlastních krvinek. Proto plazma člověka, který má krevní skupinu A, obsahuje aglutinin β , plazma skupiny B obsahuje aglutinin α , skupina AB neobsahuje žádný aglutinin, kdežto skupina 0 má aglutinin α i β (Malaska 1957).

1.2.1.2 Biochemie, struktura

Antigeny A i B jsou koncové sacharidy glykoproteinů a to z 65-75% a glykolipidů, které zaujímají 25-35% erytrocytární membrány (obr. 4; Engelfriet, 2003; viz přílohy). Skupinu A určuje přítomnost sacharidu N-acetylgalaktosamin (GalNac), skupinu B zastupuje D-galaktóza (Gal) a skupinu 0 L-fukóza (obr. 5; Sakalová et al., 1995; upraveno; viz přílohy). Skupina 0 vzniká připojením sacharidu L-fukózy pomocí specifické transferázy k prekurzorovému řetězci. Syntéza antigenů A a B pak probíhá připojením sacharidů GalNac a Gal pomocí specifických transferáz k antigenu H (Čermáková et al. 2008).

1.2.1.3 Krevní podskupiny

V roce 1911 Dungern a Hirszfild zjistili, že aglutinogen A není jednotný a existují dva aglutinogeny A a označili je A_1 a A_2 (Malaska 1957). Asi 80% jedinců s krevní skupinou A jsou A_1 a pouze 20% A_2 (Sakalová et al. 1995). V dalších letech byly objeveny další tři aglutinogeny A_3 , A_4 a A_5 . Krvinky obsahující tyto aglutinogeny, které se vzájemně liší tím, že jsou různě rychle a různě silně shlukovány aglutininem α . Nejvíce shlukovatelnými se jeví krvinky, které obsahují aglutinogen A_1 , zatímco A_5 je naopak nejméně shlukovatelná. Stejný princip platí také pro krevní skupinu AB podskupiny A_1B , A_2B a A_3B (Malaska 1957).

1.2.1.4 H deficitní fenotyp

Nositelé genotypu h/h neprodukují danou specifickou transferázu a na jejich erythrocytech se nenachází antigen H, ale pouze prekurzorový řetězec. Nedochází tedy k syntéze AB0 antigenů, když jsou přítomné jak AB0 geny, tak i příslušné specifické transferázy. H deficitní fenotyp se ve světové populaci vyskytuje velice ojediněle, prakticky jen u kmene Parsů v městě Bombay. Proto je tento H deficitní fenotyp nazýván „typ Bombay“.

Antigeny A, B, H se vyskytují téměř na všech buňkách a tkáních, ovšem mimo centrální nervový systém a mohou být vylučovány ve formě solubilních glykoproteinů do plazmy a tělesných sekretů; jako jsou sliny, slzy, pot, žaludeční šťáva (Čermáková et al. 2008).

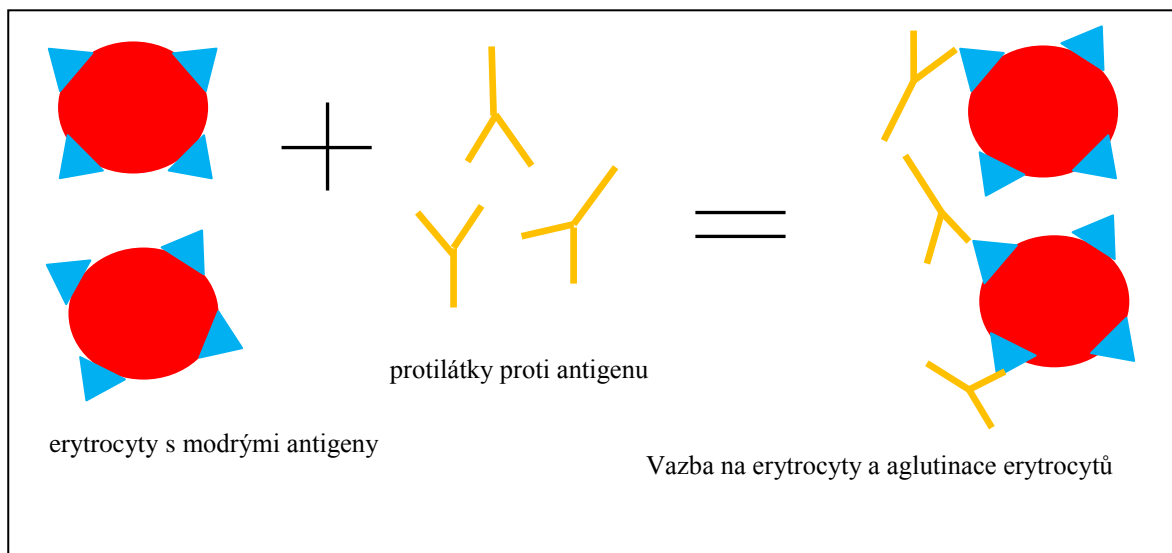
1.2.1.5 Získané změny

Krevní skupina je od narození neměnná, avšak stanou se výjimečné události, kdy se krevní skupina změní – přechodně nebo trvale. Tyto změny jsou pozorovány u lidí, kteří přijali transfuzi velké množství jiné skupiny nebo po transplantaci kostní dřeně od dárce jiné krevní skupiny. Ke změně krevní skupiny může dojít i za různých patologických stavů, kterými jsou bakteriální infekce či hematologické malignity. Vzácně se vyskytuje získaný antigen B u jedinců skupiny A, kteří trpí onemocněním

zažívacího traktu provázeného infekcí (*Escherichia Coli*, *Clostridium tertium*). Oslabená exprese antigenů A, B, H na erythrocytech může být prokázána u akutní leukemie (Čermáková et al. 2008).

1.2.1.6 Význam skupinového systému AB0 pro transfuzi

Přítomnost pravidelných přirozených protilátek anti-A a anti-B má velký význam při výběru slučitelné krve. Příjemce může dostat pouze takovou krev, ve které nejsou červené krvinky aglutinované jeho vlastními protilátkami. To je zásadní předpoklad slučitelné krve a následné nerespektování této důležité skutečnosti způsobuje prudkou reakci mezi protilátkami příjemce a krvinkami dárce a jejich rozpad v krevním řečišti. Organismus se dokáže vyrovnat s protilátkami od dárce jen do určitého množství a kvality. Po překročení neutralizační a ředící kapacity příjemce se protilátky dárce vážou na červené krvinky (obr. 6; Engelfriet et al., 2003), čímž vzniká jejich hemolýza a klinický obraz neslučitelné transfuze.



Obr. 6 Reakce antigenu a protilátky

Při transfuzi celé krve i při transfuzi erythrocytů musí být dodrženy zásady kompatibility krevních skupin. Příjemce jiné krevní skupiny než 0 může přijmout krev skupiny 0, aniž by došlo ke komplikacím, protože nositelé krevní skupiny 0 se označují

jako univerzální dárci. Nositel krevní skupiny AB, může přijmout kteroukoliv krevní skupinu bez závažných komplikací a jedná se o univerzálního příjemce, protože neobsahuje anti-A ani anti-B protilátky (Kubisz et al. 2006).

1.2.1.7 Výskyt krevních skupin

Výskyt krevních skupin A, B, AB a 0 u obyvatelstva jedné oblasti a jedné rasové skupiny bývá poměrně stálý. Avšak jisté rozdíly ve výskytu krevních skupin zaznamenáváme mezi jednotlivými rasami a národnostmi. Je známá skutečnost, že směrem od západu k východu ubývá u bělochů skupina A a přibývá skupina B. V České republice (tabulka 2; Hrubíško et al., 1983; upraveno) má 44% lidí krevní skupinu A, skupina 0 se vyskytuje u 31% naší populace, zatímco skupinu B vlastní 17% lidí a pouze 8% obyvatel žije s krevní skupinou AB (Hrubíško et al. 1983).

Skupina 0 se vyskytuje nejčastěji u původního obyvatelstva Ameriky, Austrálie a částí Afriky a to s četností nad 60%. Obyvatelstvo krevní skupiny A je nejčastěji zaznamenána v rozmezí 40-60% v Evropě, hlavně ve Skandinávii a střední Evropě, dále u původního obyvatelstva jižní Austrálie až 77% a u některých domorodých amerických kmenů až 50%. Zatímco skupina B se vyskytuje u obyvatelstva ve střední Asii kolem 40% (Čermáková et al. 2008).

Tabulka 2. Relativní četnost krevních skupin [%]

Krevní skupina	Zastoupení krevních skupin v populaci ČR	
A+	37,4	
A-	6,6	44,0
B+	14,4	
B-	2,6	17
AB+	6,8	
AB-	1,2	8
0+	26,3	
0-	4,7	31

1.2.2 Rh – systém

1.2.2.1 Historie

Tento významný skupinový systém erytrocytů objevili v roce 1940 Karl Landsteiner a Alexander Wiener při imunizaci opic rodu *Macacus Rhesus*. Od tohoto pojmu je následně odvozen název aglutinogenu a systému: faktor Rhesus a zkráceně Rh faktor (Pecka 2005). Krvinky, které mají tento antigen, byly označeny jako Rh pozitivní neboli Rh+, ostatní jako Rh negativní čili Rh- (Malaska 1957).

1.2.2.2 Struktura a funkce

Rh systém je nejpolymorfnější systém s častou tvorbou IgG protilátek, které působí hemolytické onemocnění novorozence a to zejména anti-D a anti-c; ale také způsobuje mírné až těžké hemolytické transfuzní reakce pozdního typu. Molekulárním podkladem jsou dva blízké geny, kdy jejich produktem jsou dva proteiny, jež se účastní výstavby Rh komplexů erytrocytové membrány (Pisačka 2009).

1.2.2.3 Rh antigeny

Tyto antigeny jsou lokalizovány na RhD a RhCcEe proteinech. Počty molekul antigenů na jeden erytrocyt se u normální exprese pohybují v řádu desítek tisíc a jsou závislé na genotypovém a fenotypovém uspořádání, ale také na homzygocii nebo heterozygocii pro daný antigen. Zvýšené počty D antigenů jsou nacházeny na erytrocytech s tím, že tam chybí některé nebo všechny C/c a E/e antigenů, naopak snížené počty antigenů jsou u slabých D antigenů a u některých typů D variant (Čermáková et al 2008).

Rh/D antigen patří mezi nejimunogennější ze všech struktur erytrocytu. Je to zapříčiněno výjimečným charakterem Rh pozitivního fenotypu, kdy je membrána erytrocytu nositelem jednoho zcela odlišného proteinu a to D proteinu; na rozdíl od membrány erytrocytů, která nemá D protein a je Rh/D negativní. Z toho vyplývá vysoká imunogenicita D antigenu až 80%. Ostatní antigeny mají odlišnost v rozdílném obsahu aminokyselin v jinak stejných proteinech, a proto je u nich imunogenicita o jeden a více

řádů nižší. (Písačka 2009). Tím, že u jedinců D- chybí celý Rh/D protein a mají pouze RhCcEe proteiny, tak jejich imunitní systém dobře rozpoznává D+ erythrocyty a vytváří anti-D protilátky (Čermáková et al. 2008). U dárců krve je nutné zachytit, pokud je to možné, všechny formy Rh/D antigenu (Písačka 2009).

Ostatní erythrocytové antigeny jsou většinou buď antigeny s vysokou frekvencí výskytu anebo antigeny o nízké frekvenci výskytu. Protilátky proti nim se vyskytují jen velmi zřídka a jejich diagnostika je možná pouze v laboratořích s vysokou specializací (Čermáková et al. 2008).

1.2.2.4 Rh protilátky

Protilátky anti-Rh jsou velmi zřídka přirozené anti-D, -E a C^W. Jejich původ je nejasný. Typické protilátky pro Rh systém jsou imunní protilátky po opakovaných graviditách nebo transfuzích (Sakalová et al. 1995). Imunní protilátky, které jsou IgG neaktivující komplement, patří mezi nejčastěji se vyskytující erythrocytární protilátky (Čermáková et al. 2008) a pronikají placentou a jsou příčinou hemolytického onemocnění novorozenců a potransfuzních hemolytických reakcí. Nejčastější protilátky jsou anti-D, -C, -CD, -c, -DE a -E.

Při transfuzích erythrocytů a celé krve se musí respektovat přítomnost anebo nepřítomnost antigenu D v krvinkách. Lidé Rh negativní při transfuzi nesmí dostat krvinky s antigenem D, musí dostat jen Rh negativní krev. Zatímco lidé Rh pozitivní mohou dostat krev jak Rh pozitivní, tak Rh negativní.

I Rh- těhotné ženy se mohou dostat v určitých případech do kontaktu s Rh+ krvinkami plodu, pokud jejich plod získal genetickou výbavu od otce a to Rh+. Tyto krvinky mohou vniknout do matčina krevního oběhu během doby těhotenství, nejvíce však na jeho konci a při porodu. Matka vytváří protilátky proti krvinkám svého plodu a tyto protilátky poškozují krvinky plodu. Tomuto jevu se říká hemolytické onemocnění novorozence (Sakalová et al. 1995).

Pokud dochází k tvorbě protilátek Rh- negativní matky vůči pozitivnímu plodu, je nutné preventivní podání anti-D gamaglobulinu v potřebné dávce při každé potenciálně senzibilizující události (Lubušký et al. 2009).

1.2.2.5 Dědičnost

Rh systém má základ ve třech blízko sebe ležících lokusech genů na krátkém raménku chromozomu 1. Na lokusu 1 je alela C a c, na lokusu 2 se vyskytuje alela D a d a na 3 lokusu se nachází E a e alela, které se vzájemně mohou zastupovat. Kombinace alel je děditelná stejně jako Rh-komplex (Kubisz et al. 2006). Geny prodělaly v rámci svého dlouhodobého vývoje překřížení – crossing over, což je výměna nukleotidových sekvencí. Vlivem toho vzniká možných 8 typů genových kombinací Rh-komplexu (tabulka 3; Pecka, 2005; upraveno): cde, Cde, cdE, CdE, cDe, CDe, cDE, CDE (Pecka 2005).

Tabulka 3. Výskyt CDE nomenklatury u střeoevropské populace

CDE nomenklatura	CDe	cde	cDE	cDe	Cde	cdE	CDE	CdE
Četnost [%]	40,5	39,2	14,2	2,7	0,9	0,6	0,2	0,01

1.2.2.5 Výskyt

Antigeny Rh systému se objevují již v plodové vodě ve velmi časných stádiích embryonálního života. Jejich výskyt se u různých obyvatel na zeměkouli výrazně odlišuje. Běloši jsou v 85% Rh pozitivní a v 15% negativní. Černoši jsou až v 90 - 95% pozitivní (Sakalová et al. 1995). Mongoloidní rasa z 90% pozitivní a 10% je negativních (Pecka 2005).

1.3 Ostatní krevní skupinové systémy

Většina antigenů je zařazena do jednoho z těchto 30 krevních skupinových systémů (Baiocchi and Nardoza 2009). Každý systém obsahuje různý počet antigenů a je jednoznačně geneticky určený. Mezi lidské krevní skupinové systémy patří vedle systémů AB0, Rh dále i systémy Kell, Lewis, Duffy, Kidd, MNSs, P, Lutheran, Diego, Yt, Xg, Scianna, Dombrock, Colton, Landsteiner-Wiener, Chido/Rodgers, Hh, Kx, Gerbich, Cromer, Knops, Indian, Ok, Raph, John Milton Hagen, I, Globoside, Gill, RHAG (Čermáková et al. 2008).

Genetické vztahy Kell systému jsou komplikované stejně jako v systému Rh, kdy genový komplex systému Kell leží na chromozomu 7 s minimálně třemi lokusy. Na lokusu 1 jsou alely K a k, na lokusu 2 můžeme najít Kp^a a Kp^b a na třetím lokusu se nacházejí Js^a a Js^b . Tvoří se protilátky anti-K, které jsou častější než anti-k (Pecka 2005).

Lewis systém není pravým krevním skupinovým systémem (Pecka 2005). Jeho antigeny jsou rozpustné sacharidy přítomné ve slinách a plazmě (Čermáková et al. 2008), které se navazují na povrch erytrocytu až sekundárně. Geneticky má tento systém vztah k AB0 systému. Tento systém je podmíněn geny na 19. chromozomu, kde jsou alely Le a le a současně působí i alely AB0 systému H a h (Pecka 2005).

Krevní skupinový systém Duffy má 6 antigenů, z nichž jsou nejvýznamnější alelické antigeny Fy^a a Fy^b lišící se v jedné aminokyselině. Tento systém má zastoupení u původní africké populace. Duffy protilátky obvykle IgG_1 jsou klinicky významné a mohou být příčinou hemolytické potransfuzní reakce nebo i hemolytického onemocnění novorozenců. Častěji se vyskytuje protilátka anti- Fy^a (Čermáková et al. 2008).

Kidd systém je podmíněn geny na 18. chromozomu, který má 3 antigeny Jk^a , Jk^b a Jk, které se liší v jedné aminokyselině. Kidd protilátky anti- Jk^a a anti- Jk^b jsou nejčastější příčinou pozdních hemolytických potransfuzních reakcí, vzácně vyvolávají

těžké akutní potransfuzní reakce nebo těžké formy hemolytického onemocnění novorozenců (Čermáková et al. 2008).

V roce 1927 našli Karl Landsteiner a Philip Levine v lidských erytrocytech nové aglutinogeny, které označili jako M a N. Alely S a s v roce 1947 objevili Walsh a Montgomery (Pecka 2005). Tento systém má 43 antigenů, kdy nejvýznamnější jsou párové antigeny M a N, které se liší ve dvou aminokyselinách. Nejčastěji se vyskytuje protilátka anti-M, která je reaktivní při 37 °C a může být příčinou hemolytické potransfuzní reakce nebo hemolytického onemocnění novorozenců, zatímco anti-N se objevuje velmi zřídka (Čermáková et al. 2008).

1.4 Význam krevních skupinových vlastností v lékařství

Díky poznatkům o krevněskupinových antigenech, o jejich antigenní povaze a o jejich pravidelné dědičnosti se také rozšířilo jejich použití v teoretické a praktické medicíně. Nezastupitelný význam mají krevní skupinové vlastnosti pro transfuzi krve, pro vznik hemolytické choroby novorozenců, dále pro imunogenetiku a také pro získané hemolytické anémie a jiná onemocnění (Hrubíško et al. 1983). Další důležitou oblastí je soudní lékařství, kdy je nutné zjistit totožnost neznámých osob a při určování otcovství (Jílková 2009).

1.4.1 Krevní transfuze

Znalost krevních skupin má největší význam pro převod krve. Krevní transfuze mohou být úspěšné jen tehdy, když aglutininy příjemce neshlukují krvinky dárce. Tomu se zabrání tím, že se při transfuzi použije krev stejné skupiny, jakou má příjemce (Hrubíško et al. 1983). Především se musí respektovat slučitelnost v AB0 systému a Rh systému. Krev dárce musí po transfuzi plnit svou funkci a nesmí působit nemocnému žádnou újmu. Při nedodržení zásady slučitelnosti se protilátky navazují z plazmy pacienta na erytrocyty dárce a dochází k hemolýze dárcovských erytrocytů.

Z rozpadlých erytrocytů se uvolňuje hemoglobin, který může poškodit ledvinné glomeruly a dochází k šoku, ve kterém může pacient zemřít.

Bez předtransfuzního vyšetření se nesmí podat transfuzní přípravek, který obsahuje velké množství erytrocytů. Výjimečně lze podat erytrocyty univerzálního dárce krevní skupiny 0, pokud možno Rh negativní. Touto výjimečnou situací může být neodkladná transfuze, kdy se test slučitelnosti vyšetřuje dodatečně (Jílková 2009).

Předtransfuzní vyšetření obsahuje tyto činnosti:

- Příjem vzorku krve příjemce transfuze s přiloženou žádankou. (Jedná se o vzorek srážlivé či nesrážlivé krve, kdy musí být zkumavka označena štítkem, kterým se identifikuje příjemce. Na štítku je zaznamenáno jméno, příjmení, číslo pojištěnce a datum odběru. Kontroluje se vzhled a stáří vzorku. Žádanka jednoznačně identifikuje příjemce, dále obsahuje údaje o diagnóze, o předchozích transfuzích a reakcích na transfuze, o přítomnosti nepravidelných protilátek, o těhotenství či transplantacích.)
- Provádí se kontrola záznamů v předchozí dokumentaci s ohledem na krevní skupinu a přítomnost dříve prokázaných protilátek.
- Stanoví se ABO a RhD skupiny příjemce.
- Stanovují se klinicky významné nepravidelné protilátky proti erytrocytům a identifikují se při pozitivním nálezu.
- Provádí se výběr vhodného transfuzního přípravku podle krevní skupiny.
- Na závěr se uskuteční vlastní laboratorní průkaz slučitelnosti krve dárce s krví příjemce (Jílková 2009) neboli „velký křížový pokus a malý křížový pokus“. Velký křížový pokus se povinně vyšetřuje u každé konzervy. Navíc se provádí screening protilátek u příjemce. Jestliže křížová zkouška vyjde pozitivní, obsahuje sérum příjemce protilátku proti erytrocytům konzervy a krevní konzerva se nesmí použít

k transfuzi. Vyšetření nazývaní se malý křížový pokus se provádí smícháním séra dárce s krvinkami příjemce. Od tohoto vyšetření se upustilo, neboť se povinně vyšetřuje screening protilátek (Pecka 2005).

Krevní transfuze indikuje a podává pouze lékař. Před podáním provádí lékař kontrolu totožnosti pacienta, značení na štítku transfuzního přípravku, záznamů o provedeném vyšetření a jejich výsledků, doby použitelnosti přípravku a neporušenosti obalu a vzhledu obsahu transfuzního přípravku (Jílková 2009).

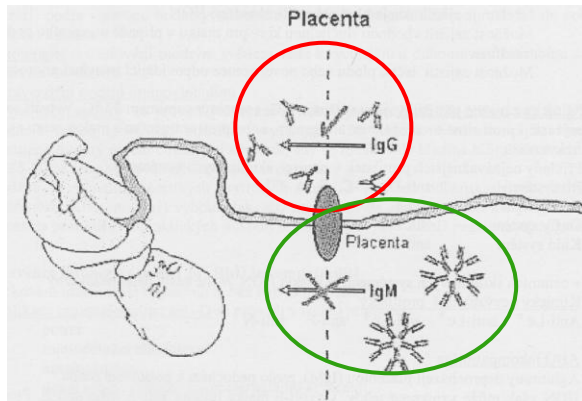
Odběr, přeprava a vyšetření vzorků zahrnuje také možné riziko věcných chyb („lidský faktor“), které mohou vést až k hemolytické transfuzní reakci (Rachel and Plapp 1990). U lůžka pacienta lékař proto povinně provádí kontrolu krevní skupiny, kterou nazýváme „bed side test“, kdy se jedná o orientační vyšetření ABO skupiny pacienta a podávaných erytrocytů sklíčkovým testem. Jsou použita diagnostická séra anti-A a anti-B. Tímto testem je poslední možnost, jak odhalit záměnu krevního vzorku pacienta, se kterým se prováděl test slučitelnosti.

Po zavedení transfuze je příjemce nejméně 10 minut pod přímým dohledem lékaře a lékař v této době provede biologický test, který spočívá v rychlém převedení 30 ml krve pacientovi a pak se převod přeruší a sleduje se reakce pacienta. Pokud nenastane žádná reakce, pokračuje se v transfuzi (Jílková 2009).

1.4.2 Hemolytické onemocnění novorozenců HON

Aloimunizace a tvoření protilátek probíhá při transfuzi nebo injekci krve odlišné krevní skupiny, ale i v době těhotenství. V situaci, kdy mají matka a plod odlišné krevní skupiny se krvinky plodu nedostávají do krevního oběhu matky a krvinky matky se nedostanou do krevního oběhu plodu. Při určitých chorobných stavech placenty, můžou pronikat krvinky plodu přes placentu do krevního oběhu matky.

V první fázi se tvoří protilátky třídy IgM, které pro plod nejsou příliš bezpečné. Poté se začínají tvořit protilátky třídy IgG, jejichž molekulová hmotnost je malá a díky tomu mohou pronikat přes placentu (obr. 7; Jílková, 2009) a vážou se na specifický antigen erytrocytů. Vlivem této vazby dochází k rozpadu erytrocytů plodu a vzniká u něj hemolytická anémie. Nejvíce protilátek proniká v průběhu porodu, novorozenci trpí žloutenkou a anémií (Sakalová et al. 1995).



Obr. 7 Tvorba protilátek IgG a IgM

Čím dříve vznikají imunní protilátky, tím dříve pronikají do těla plodu, čím větší je množství těchto protilátek, tím je rozsáhlejší a větší poškození plodu. HON se vyskytuje nejčastěji při druhém a dalším těhotenství (Hrubiško et al. 1983). Proto je nutná prevence HON, kdy se vyšetřuje ABO a Rh skupinová příslušnost matky, screening nepravidelných protilátek proti erytrocytům, určení specifity protilátky a sledování jejího titru. Tato vyšetření se provádí za účelem zajistit vhodnou slučitelnou krev pro matku v případě podání transfuze a možnost zajistit léčbu plodu nebo novorozence odpovídající transfuzí erytrocytů (Jílková 2009). Výměnou krve dojde k odstranění poškozených krvinek a také velkého množství bilirubinu a do organismu se dostane nová krev. Proto závisí na tom, aby se hemolytické onemocnění novorozence rozpoznalo co nejdříve (Hrubiško et al. 1983).

1.4.3 Imunogenetika

Dědičnost krevních skupin je velmi podrobně a přesně probádána. Poznatky o dědičnosti krevních skupin se využívají v soudním lékařství ve sporech o otcovství. Vychází se ze základního poznatku, že dítě nemůže mít ve svém skupinovém genotypu takový antigen, jaký nemá ani jeden z rodičů. Pro soudní lékařství je důležité, že se krevní skupiny v průběhu života nemění a na základě vyšetření krevní skupiny se tvoří

závěry o totožnosti osob. Tím, že se krevní skupiny nevyskytují ve stejném poměrném zastoupení u všech lidí, má význam pro antropologii a biologii (Sakalová et al. 1995).

1.4.4 Hemolytické anémie a jiná onemocnění

V medicíně mají velký význam protilátky anti-I a u většiny lidí se vyskytují jako přirozené nepravidelné protilátky (Sakalová et al. 1995). Tento antigen I není jednotný, protože se vyskytují lidé I negativní. Zjištění proběhlo díky chladovým nespecifickým protilátkám, neboť tyto protilátky mohou shlukovat při nižší teplotě všechny krvinky a mají diagnostický význam například u infekční mononukleózy nebo virového zápalu plic (Hrubiško et al. 1983).

V hematologii jsou protilátky anti-I důležité při některých získaných hemolytických anémiích. Když se rozšíří tepelná amplituda účinnosti protilátky anti-I až na 37 ° C, tak se začínají tvořit protilátky třídy IgG. Za těchto okolností působí na vlastní erytrocyty mající antigen I jako autoprottilátky a způsobují jejich zkrácené přežívání a hemolýzu.

Kromě chladových protilátek mohou zapříčinit hemolytickou anémii také tepelné autoimunní protilátky, jež reagují pouze při teplotě těla. Bývají namířené proti antigenům Rh systému a proti antigenům jiných krevních skupin. Známé jsou i bitermické protilátky, které se za chladu vážou na erytrocyty, avšak jejich hemolýzu způsobí stav, kdy se erytrocyty s navázanou protilátkou dostanou do tepelného prostředí (Sakalová et al. 1995).

Za posledních 20-30 let došlo k dramatickému poklesu chorob přenesených krevní transfuzí, ale nikdy nebude dosaženo nulové riziko, protože se mohou objevit nové dříve neznámé choroby. Krví se mohou přenášet viry, bakterie i krevní paraziti. Mezi nejznámější nemoci přenosné krví řadíme *Hepatitis B*, *Hepatitis C*, *AIDS - HIV*, *Syphilis*, *Cytomegalovirus*, *Creutzfeldt-Jakobova choroba*, *Brucelóza*, *Toxoplasmóza*, *Tuberkulóza* a další... (Jílková 2009).

1.5 Imunohematologické vyšetřovací metody

Vyšetřování krevních skupinových vlastností není obtížný ani složitý laboratorní výkon, ale při chybném vyšetření může vést k ohrožení života nemocného. Vyšetřením se musí věnovat náležitá pozornost a každý, kdo vyšetřuje krevní skupiny, si musí dobře osvojit vyšetřovací techniku a uvědomit si zdroje možných chyb. Při vyšetřování krevních skupin se doporučuje „kontrola čtyř očí“ (Hrubisko et al. 1983).

1.5.1 Laboratorní důkaz krevních skupin

Vyšetření erytrocytárních antigenů je založeno na principu sérologické detekce antigenů, kdy proběhne reakce neznámého antigenu se známou specifickou protilátkou, která se nazývá diagnostické sérum. Důkazem je aglutinace erytrocytů.

Tabulka 4. Stanovení krevní skupiny pomocí antigenů a protilátek

Skupina	Vyšetření antigenů pacienta		Vyšetření protilátek pacienta	
	Diagnostické sérum		Diagnostické erytrocyty	
AB0	anti-A	anti-B	A1	B
0	-	-	+	+
A	+	-	-	+
B	-	+	+	-
AB	+	+	-	-

Diagnostická séra obsahují specifické IgM nebo IgG protilátky. Monoklonální protilátky jsou produkovány jedním klonem B-buněk, reagují s jednou antigenní determinantou a jsou biochemicky identické. Kdežto polyklonální protilátky jsou produkovány více klony B-buněk, jsou biochemicky a imunologicky různorodé a reagují s různými epitopy daného antigenu. IgM protilátky přímo aglutinují testované erythrocyty, zatímco IgG protilátky se pouze vážou na testované erythrocyty.

Krevní skupinový systém AB0 se stanovuje pomocí AB0 antigenů a protilátek (tabulka 4; Čermáková et al., 2008). Antigeny jsou testovány IgM monoklonálními diagnostickými séry anti-A, anti-B, anti-AB. Protilátky se testují diagnostickými erythrocyty skupin 0, A₁, A₂, B. Výsledky testování musí odpovídat přítomnosti antigenů a protilátek u jednotlivých skupin (Čermáková et al. 2008).

K vyšetření vlastnosti RhD se využívá diagnostické sérum anti-RhD (Sakalová et al. 1995). Výsledky jsou hodnoceny jako RhD- nebo RhD+.

1.5.1.1 Sklíčková metoda

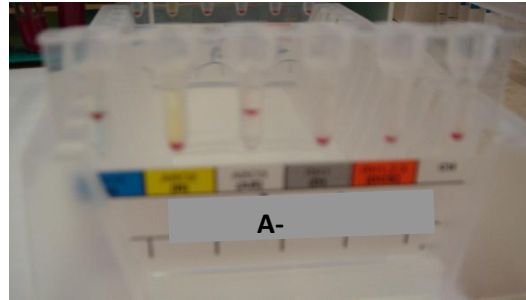
Určování antigenů systému AB0 erythrocytů se dnes vyšetřuje pomocí známých diagnostických sér anti-A, anti-B a anti-AB. Přítomnost pravidelných protilátek anti-A a anti-B se vyšetřuje pomocí známých typových krvinek A a B. Na označená sklíčka se nakape po jedné kapce diagnostického séra, na kterou se přidá jedna kapka erythrocytů vyšetřovaného pacienta, po promíchání se odečítají vzniklé aglutinace. Totéž se provede s typovými krvinkami, ovšem místo erythrocytů se dává kapka séra (Sakalová et al. 1995).

1.5.1.2 Zkumavková metoda

V současné době je cílem vyšetření protilátek erythrocytů použít metodu, která zjistí všechny protilátky, které jsou považovány za klinicky významné. Zkumavková metoda byla vyvinuta v průběhu let, aby bylo možné dosáhnout rychlejších výsledků testů a lepší citlivost (Casina 2006).

1.5.1.3 Mikrotitrační metoda

Vyšetření se provádějí v jednorázových mikrozkušavkách (obr. 8) obsahujících všechny potřebné reagentie a záchytné médium. Tyto mikrozkušavky jsou sdruženy do kazet po šesti. Snadné vyhodnocení výsledku vyšetření je založeno na tom, že jednotlivé erythrocyty při centrifugaci kazety projdou záchytným médiem (sloupec skleněných mikrokuliček o průměru 80 μm) zatímco aglutináty se zachytí buď na, nebo v tomto médiu. Systém je vhodný jak pro provádění jednotlivých vyšetření, zejména statimových a s vitální indikací, tak i pro vyšetřování v sériích.



Obr. 8 Gelová karta

1.5.1.4 Vyšetřování na automatových přístrojích

Hodnocení výsledků imunohematologických reakcí založených na posuzování míry aglutinace erythrocytů se vždy vyznačovala vyšší mírou přidané hodnoty zkušeností laboratorního pracovníka, a pokud byla imunohematologická vyšetření založená na zkumavkových a sklíčkových metodikách, byly možnosti jejich automatizace omezené. Od automatizace (obr. 9; Bohoněk, 2009) se očekává zvýšení bezpečnosti, omezení lidské chyby, standardizace hodnocení výsledků, úspora času, lidské práce a materiálu (Bohoněk, M. 2009).



Obr. 9 Poloautomat DiaMed SWING
Twin Sampler

2. Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl bakalářské práce

Tato bakalářská práce je zaměřena na vyšetřování krevních skupin třemi různými metodami. Použité metody jsou porovnávány z hlediska časové náročnosti, finančních nákladů, náročnosti práce, přesnosti a spolehlivosti.

2.2 Předpokládané hypotézy

H1: Ověření těchto metod a ujištění, že se jedná o spolehlivé metody a lze je provádět v každé laboratoři.

H2: Vyšetření krevních skupin pomocí zkumavkové metody je levnější ale pomalejší a pracnější než mikrotitrační metoda na gelových kartách.

H3: Mezi vyšetřovanými pacienty v mém souboru se vyskytuje více žen než mužů.

3. Materiál a použitá metodika

3.1 Materiál

V této práci jsem vyšetřovala 75 vzorků venózní krve od různých pacientů, které byly dodány do laboratoře Laboma s.r.o v Českých Budějovicích. Jména pacientů jsou z důvodu povinné mlčenlivosti utajena a nahrazena čísly.

Venózní krve stačí 5 ml a odebírá se sterilně do zkumavky bez protisrážlivého činidla. Tato zkumavka musí být předem čitelně popsána jménem, příjmením a datem narození pacienta. Krev se nechá srazit a čeká se na oddělení krevního koláče od séra, abychom toto oddělování urychlili, používá se centrifuga. Ze sražené krve se získávají krvinky i sérum, protože se musí vyšetřit antigeny i protilátky. A správnost vyšetření se potvrdí pouze tehdy, když se výsledky obou vyšetření úplně shodují (Hrubiško et al. 1983).

3.2 Použitá metodika

Pro účely této bakalářské práce je zvoleno laboratorní vyšetření krevních skupin třemi různými metodami.

3.2.1 Sklíčková metoda

První metodou je sklíčková metoda, která využívá mikroskopické podložní sklíčko. Nejprve se nechá krev stočit v centrifuze CENTRIC 322A na 10 minut po 3000 otáčkách za minutu. Sérum se odebírá pomocí Pasteurovy pipety do stejně označené zkumavky (Sakalová et al. 1995).

Pro vyšetření jedné krevní skupiny je potřeba 13 podložních sklíček. Tato podložní sklíčka je nutné popsat jménem nebo číslem pacienta. Na první tři sklíčka se po jedné kapce nakapou diagnostická séra anti-A, anti-B, anti-AB (obr. 10; viz přílohy),

tato séra jsou barevně odlišena podle obsahujících protilátek, díky těmto diagnostickým sérům se zjišťují krevní skupiny A, B, AB a 0.

Na další dvě sklíčka se přidá po jedné kapce Pelikloon anti-Dmix (IgG/IGM); Monoclonal clones MS26 a TH28 a po jedné kapce Novaclone anti-D (IgG/IgM); Human monoclonal clone D175 a D415, kterými se určí Rh faktor. K těmto diagnostickým sérům se Pasteurovou pipetou přidá na sklíčko po jedné kapce červených krvinek pacienta a rohem čistého sklíčka se smíchá každá kapka séra s kapkou erytrocytů.

Na čtyři sklíčka se nakape po jedné kapce typových krvinek A₁, A₂, B, 0 (obr. 11; viz přílohy) a k nim se přidá Pasteurovou pipetou po jedné kapce séra. Tyto kapky se nechají alespoň jednu minutu ustát a pozoruje se, zda dochází k aglutinacím a na konec je nutné odečíst krevní skupiny. Pokud nejsou erytrocyty aglutinovány, zůstávají rovnoměrně rozptýlené. Neurčité a negativní výsledky se kontrolují pod mikroskopem (Hrubiško et al. 1983).

Podskupiny se vyšetřují tehdy, pokud má pacient krevní skupinu A nebo AB. Pro určení podskupiny A₁ se používá diagnostické sérum anti-A₁ a podskupina A₂ se detekuje pomocí diagnostického séra anti-H. Na dvě předem popsaná podložní sklíčka se nakape po jedné kapce těchto sér, ke každé kapce se přidá kapka červených krvinek pacienta a rohem čistého sklíčka se promíchá kapka diagnostika s kapkou erytrocytů. Jestliže diagnostické sérum anti-A₁ shlukuje erytrocyty na sklíčku, jedná se o podskupinu A₁. Pokud dochází ke shlukování erytrocytů na sklíčku s anti-H, jedná se o podskupinu A₂ (Hrubiško et al. 1983).

Pro odlišení podskupiny A₁B a A₂B se používá diagnostické sérum anti-A₁B monoklonální. Shlukování erytrocytů určuje krevní podskupinu A₁B, pokud k aglutinaci nedochází, jedná se o krevní podskupinu A₂B (Sakalová et al. 1995).

3.2.2 Zkumavková metoda

Tato metoda je založena na stejném principu jako sklíčková, ale předchází jí několik odlišných postupů, jak docílit správného vyšetření. Při tomto vyšetření je zásadním požadavkem používání jen promytých červených krvinek (Hrubiško et al. 1983) neboli náplav lososového zbarvení (obr. 12; viz přílohy).

Plnou krev je nutné dát do centrifugy CENTRIC 322A a nechat ji točit 10 minut při 3000 otáčkách za minutu. Zkumavky se vyndají z centrifugy, odebere se sérum pomocí Pasteurovy pipety a nalije se do jiné stejně označené zkumavky. Z krvinek se připraví 2-3% náplav za použití fyziologického roztoku (0,9% roztok NaCl). Náplav se musí nechat centrifugovat při 2500 otáčkách po 5 minutách. Tento roztok se slije a na dně zkumavky zůstane sediment erytrocytů, ke kterému se přidá opět fyziologický roztok a tím končí příprava vhodné náplavu lososového zbarvení k určení skupinového systému AB0 a Rh faktoru (Sakalová et al. 1995).

Do tří předem označených zkumavek se přidává po dvou až třech kapkách diagnostického séra anti-A, anti-B, anti-AB k určení skupinového systému AB0. Do dalších dvou zkumavek se nakape po dvou až třech kapkách Pelikloon anti-Dmix (IgG/IGM); Monoclonal clones MS26 a TH28 a po dvou až třech kapkách Novaclone anti-D (IgG/IgM); Human monoclonal clone D175 a D415, kterými se určuje Rh faktor. Do těchto pěti zkumavek s nakapanými diagnostickými séry se přidává připravený krvinkový náplav po dvou až třech kapkách a vše se nechá minutu ustát.

Mezitím se do zbylých čtyř zkumavek nakapou po dvou až třech kapkách typové krvinky A₁, A₂, B, 0 a k nim se přidá Pasteurovou pipetou po dvou až třech kapkách séra. Zkumavky s diagnostickými séry i s typovými krvinkami se nechají stáčet 1 minutu při 1500 otáčkách. Po vyjmutí z centrifugy se zkumavky protřepou a výsledek se odečítá makroskopicky. Při pozitivní aglutinaci jsou erytrocyty ve velkých shlucích nebo tvoří jeden souvislý shluk. Při negativní aglutinaci jsou erytrocyty volně rozptýlené (Hrubiško et al. 1983).

Pokud se zjistí, že je pacient Rh negativní, provádí se dovyšetření. Všechny zkumavky s Rh negativními krevními skupinami se nechají inkubovat 15 minut při teplotě 37 ° C. Po vyjmutí zkumavek z inkubátoru se do zkumavek přidá Pelikloon polyspecific anti-human serum (IgG goat; C3d clone BRIC 8). Dále se zkumavky nechají stočit v centrifuze 1 minutu při 1500 otáčkách a po vyjmutí z centrifugy se odečítá aglutinace (Sakalová et al. 1995).

Podskupiny se vyšetřují tehdy, pokud má pacient krevní skupinu A nebo AB. Pro určení podskupiny A₁ se používá diagnostické sérum anti-A₁ a podskupina A₂ se detekuje pomocí diagnostického séra anti-H (Hrubiško et al. 1983). Do dvou předem popsaných zkumavek se nakapou dvě až tři kapky z obou diagnostických sér. Ke každému séru se přidají dvě až tři kapky krvinkového náplavu a zkumavky se nechají stočit 1 minutu při 1500 otáčkách v centrifuze. Po odstředění se odečítá výsledek vyšetření. Zkumavka se drží ve dvou prstech, poklepáním na dno zkumavky a sleduje se aglutinace. Jestliže sérum anti-A₁ shlukuje erytrocyty ve zkumavce, jedná se o podskupinu A₁. Pokud dochází ke shlukování erytrocytů ve zkumavce s anti-H, jedná se o podskupinu A₂ (Hrubiško et al. 1983).

Pro odlišení podskupiny A₁B a A₂B se používá diagnostické sérum anti-A₁B monoklonální. Toto diagnostikum obsahuje myší IgM protilátky. Shlukování erytrocytů určuje krevní podskupinu A₁B, pokud k aglutinaci nedochází, jedná se o krevní podskupinu A₂B (Sakalová et al. 1995).

3.2.3 Metoda na mikrotitračních destičkách

Pro toto vyšetření je potřeba mít předem připravené gelové karty, ve kterých je rozpipetován přesný objem diagnostických sér. V této sadě se nachází ScanGel Monoclonal AB0/Rh, ScanGel Neutral, roztok ScanLiss pro přípravu krvinkového náplavu, diagnostické erytrocyty na vyšetření protilátek A₁, B, 0.

Příprava 1% suspenze vyšetřovaných erytrocytů pro testování AB0/Rh v roztoku ScanLiss:

- dát do zkumavky 0,5 ml roztoku ScanLiss
- přidat 5 µl sedimentu erytrocytů propraných v 0,9% roztoku NaCl.

Před použitím se musí reagentie vytemperovat na laboratorní teplotu. 1 karta slouží k vyšetření 1 osoby:

1. Kartu je nutné označit jménem pacienta nebo číslem daného vzorku a odstranit hliníkový krycí proužek. Každá z pěti mikrozkušavek obsahuje gel s jedním následujícím monoklonálním diagnostikem anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D, anti-DCE. Zařazení diagnostika anti-DCE umožní pacientovi s fenotypem ccddee výběr vhodné ccddee kompatibilní krevní konzervy. Šestá mikrozkušavka je kontrolní.

2. Do všech mikrozkušavek se kápne 50 µl 1% suspenze erytrocytů v roztoku ScanLiss

3. Ihned se nechají gelové karty centrifugovat 10 minut v centrifuze ScanGel System.

4. A po stočení se odečítají reakce.

Reversní testování na kartě ScanGel Neutral se provádí nejčastěji se 3 nebo 2 typy diagnostických erytrocytů (A₁, B, 0/ A₁, B).

1. První karta slouží k vyšetření pro 2 osoby za použití 3 typů diagnostických erytrocytů. Karta se musí řádně označit jménem pacienta nebo číslem odpovídajícího vzorku a odstraní se hliníkový krycí proužek.

2. Pomocí mikropipety se napipetuje 50 µl diagnostických erytrocytů do mikrozkušavky a to následujícím způsobem: Do 1. mikrozkušavky se dají erytrocyty A₁, do 2. mikrozkušavky erytrocyty B a do 3. mikrozkušavky se přidají erytrocyty 0.

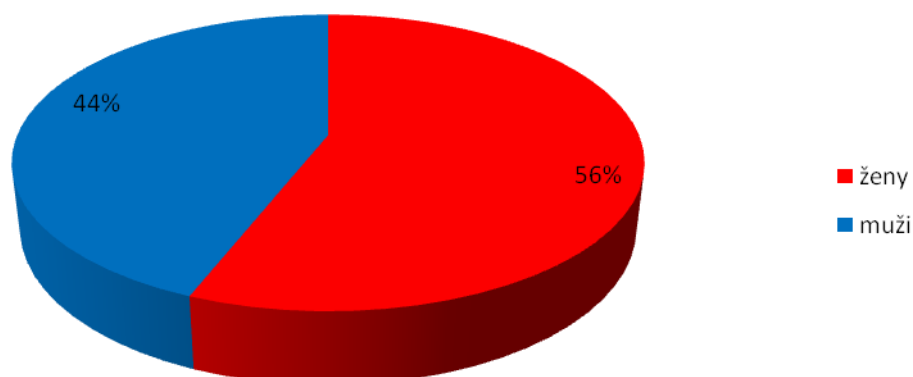
3. K diagnostickým erytrocytům se přidá 50 µl vyšetřovaného séra nebo plazmy.
4. Musí dojít k inkubaci a to 15 minut při laboratorní teplotě 20 ° C
5. Musí proběhnout odstředění 10 minut v centrifuze ScanGel Systém.
6. Na závěr se odečítají reakce a hodnotí se výsledky.

Hodnocení výsledků:

- Pokud se aglutinace vyskytují na povrchu gelu nebo jsou rozptýlené v gelu, jedná se o pozitivní výsledek a indikuje přítomnost odpovídajícího erytrocytárního antigenu nebo přítomnost odpovídající protilátky.
- Kompaktní sediment na dně zkumavky představuje negativní výsledek a to znamená, že odpovídající antigen nebyl zjištěn nebo protilátka nebyla prokázána v séru nebo plazmě.
- Pozitivní reakce nesmí být hodnocena a uzavřena jako pozitivní, pokud se zpozoruje pozitivita v kontrolní mikrozkušavce, která je označena „Ctl“. Pokud je výsledek ve zkumavce „Ctl“ pozitivní, pak se zopakuje vyšetření s propranými erytrocyty v 0,9% roztoku NaCl 37 ° C teplém (Rýznarová 2008).

4. Výsledky

4.1 Rozdělení vyšetřovaných pacientů podle pohlaví



Obr 13. Procentuální zastoupení krevních skupin mezi muži a ženami

4.2 Vyšetření krevních skupin u žen

Tabulka 5. Vyšetření krevních skupin u žen

č.	Diagnostická séra			Typové krvinky				anti -A ₁	anti -H	podskupina	anti -D	anti -Du	Rh faktor	Výsledná krevní skupina
	anti -B	anti -A	anti -AB	A ₁	A ₂	B	0							
1	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
2	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
3	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
4	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
5	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	-	-	-	A ₁ -
6	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
7	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
8	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
9	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+

č.	Diagnostická séra			Typové krvinky										Výsledná krevní skupina
	anti -B	anti -A	anti -AB	A ₁	A ₂	B	0	anti -A ₁	anti -H	podskupina	anti -D	anti -Du	Rh faktor	
10	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
11	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
12	-	-	-	+	+	+	-	*	*		-	-	-	0-
13	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
14	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
15	+	+	+	-	-	-	-	+	-	1	-	-	-	A ₁ B-
16	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
17	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
18	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
19	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
20	+	-	+	+	+	-	-	*	*		-	-	-	B-
21	+	-	+	+	+	-	-	*	*		-	-	-	B-
22	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
23	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
24	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	-	-	-	A ₁ -
25	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	-	-	-	A ₁ -
26	-	+	+	-	-	+	-	-	+	2	+	*	+	A ₂ +
27	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
28	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
29	+	+	+	-	-	-	-	-	+	2	+	*	+	A ₂ B+
30	-	-	-	+	+	+	-	*	*		-	-	-	0-
31	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
32	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	-	-	-	A ₁ -
33	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
34	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
35	-	+	+	-	-	+	-	-	+	2	+	*	+	A ₂ +

č.	Diagnostická séra			Typové krvinky				anti -A ₁	anti -H	podskupina	anti -D	anti -Du	Rh faktor	Výsledná krevní skupina
	anti -B	anti -A	anti -AB	A ₁	A ₂	B	0							
36	+	-	+	+	+	-	-	*	*		-	-	-	B-
37	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
38	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
39	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
40	+	+	+	-	-	-	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ B+
41	+	-	+	+	+	-	-	*	*		-	-	-	B-
42	+	+	+	-	-	-	-	-	+	2	+	*	+	A ₂ B+

Vysvětlivky:

č. ... pořadí pacienta

Sérum pacienta + typové krvinky

+ ... dochází k aglutinaci

Krvinkový náplav + diagnostická séra

+ anti-A₁, anti-H

- ... nedochází k aglutinaci

+ anti-D, anti-Du

* ... nevyšetřuje se

4.3 Vyšetření krevních skupin u mužů

Tabulka 6. Vyšetření krevních skupin u mužů

č.	Diagnostická séra			Typové krvinky										Výsledná krevní skupina
	anti -B	anti -A	anti -AB	A ₁	A ₂	B	0	anti -A ₁	anti -H	podskupina	anti -D	anti -Du	Rh faktor	
1	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
2	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
3	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
4	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
5	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
6	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
7	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
8	+	+	+	-	-	-	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ B+
9	+	+	+	-	-	-	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ B+
10	+	-	+	+	+	-	-	*	*		-	-	-	B-
11	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
12	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
13	+	+	+	-	-	-	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ B+
14	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
15	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
16	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
17	-	+	+	-	-	+	-	-	+	2	+	*	+	A ₂ +
18	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
19	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
20	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
21	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
22	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
23	+	+	+	-	-	-	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ B+
24	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
25	+	+	+	-	-	-	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ B+

č.	Diagnostická séra			Typové krvinky				anti-A ₁	anti-H	podskupina	anti-D	anti-Du	Rh faktor	Výsledná krevní skupina
	anti-B	anti-A	anti-AB	A ₁	A ₂	B	0							
26	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	-	-	-	A ₁ -
27	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
28	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
29	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
30	-	-	-	+	+	+	-	*	*		+	*	+	0+
31	-	+	+	-	-	+	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ +
32	+	-	+	+	+	-	-	*	*		+	*	+	B+
33	+	+	+	-	-	-	-	+	-	1	+	*	+	A ₁ B+

Vysvětlivky:

č. ... pořadí pacienta

+ ... dochází k aglutinaci

- ... nedochází k aglutinaci

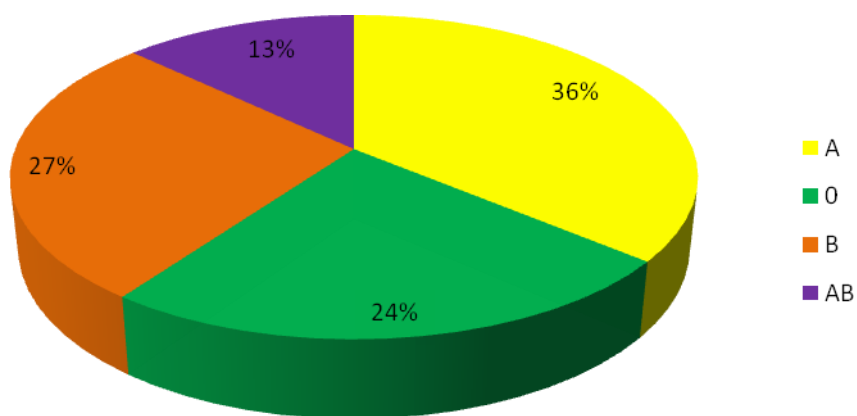
* ... nevyšetřuje se

Sérum pacienta + typové krvinky

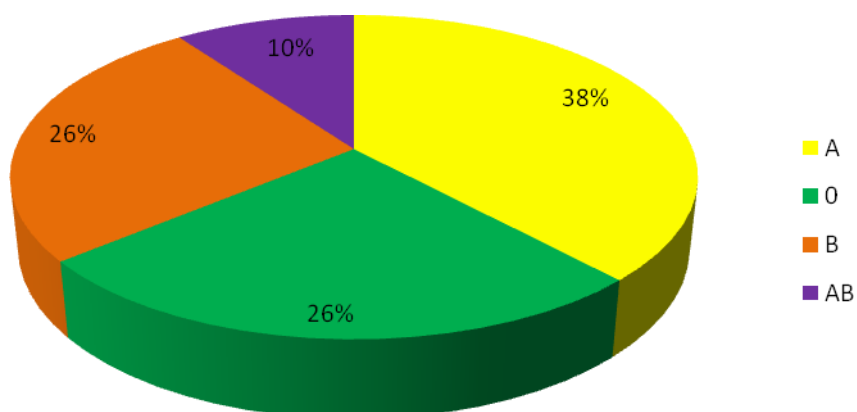
Krvinkový náplav + diagnostická séra

+ anti-A₁, anti-H

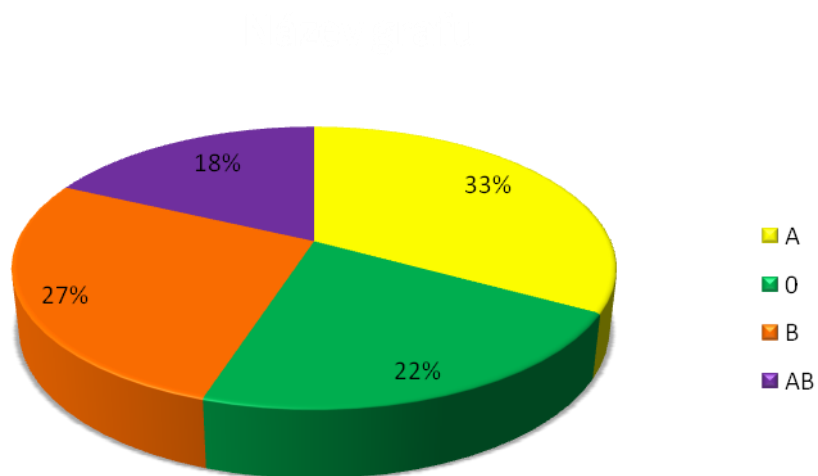
+ anti-D, anti-Du



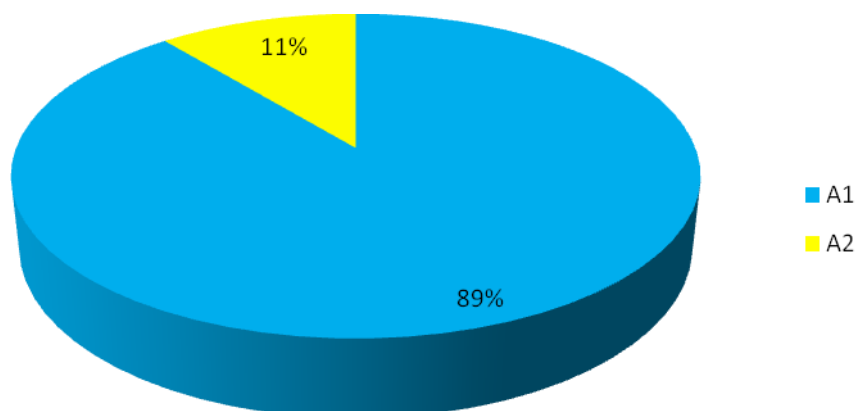
Obr. 14 Procentuální zastoupení krevně skupinového systému AB0 u vyšetřovaných pacientů



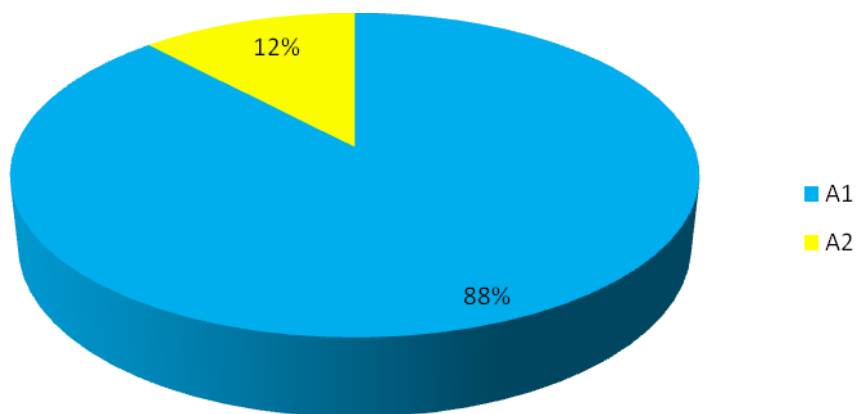
Obr. 15 Procentuální zastoupení krevně skupinového systému AB0 u žen při použití diagnostických sér



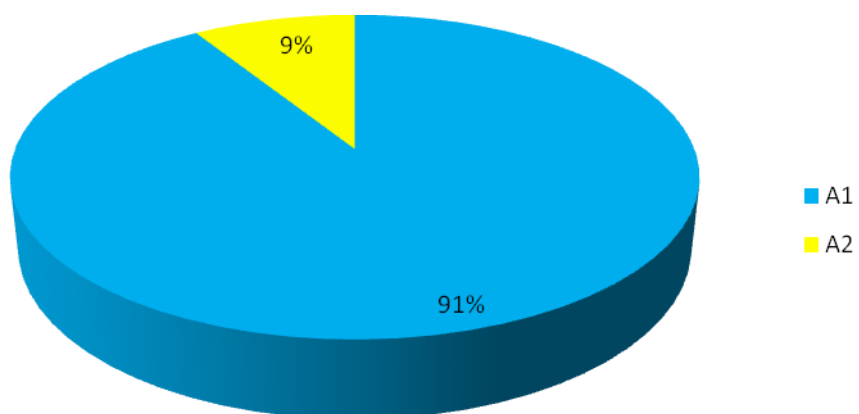
Obr. 16 Procentuální zastoupení krevně skupinového systému AB0 u mužů při použití diagnostických sér



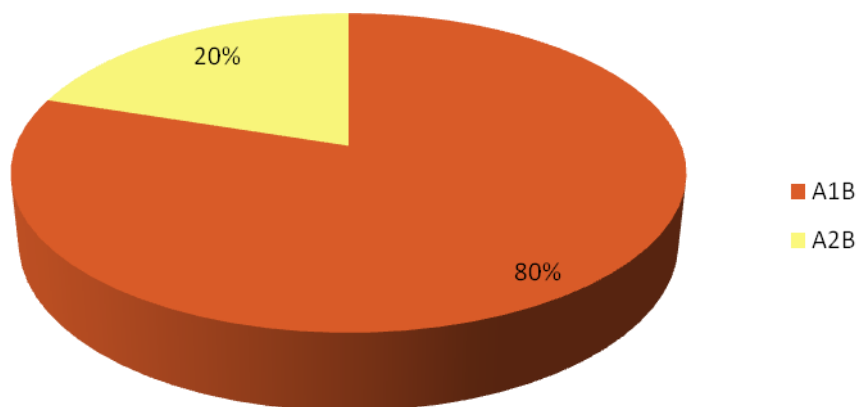
Obr. 17 Procentuální zastoupení krevních podskupin A₁ a A₂ u vyšetřovaných pacientů



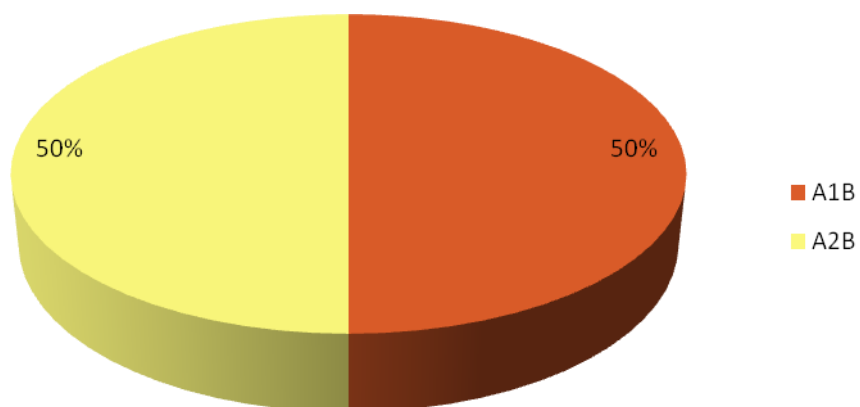
Obr. 18 Procentuální zastoupení krevních podskupin A₁ a A₂ u žen



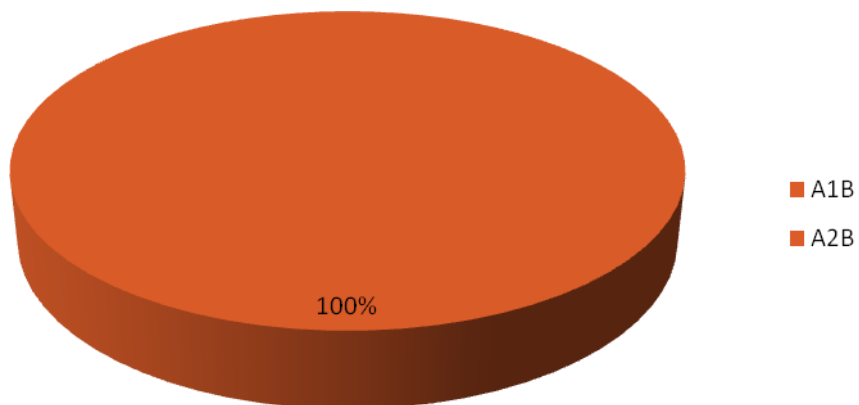
Obr. 19 Procentuální zastoupení krevních podskupin A₁ a A₂ u mužů



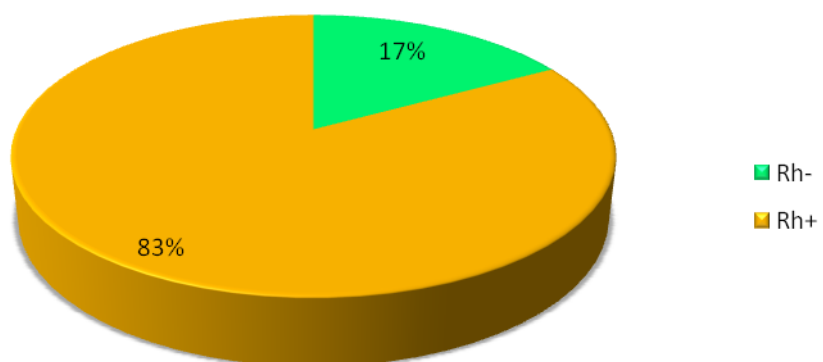
Obr. 20 Procentuální zastoupení krevních podskupin A₁B a A₂B u vyšetřovaných pacientů



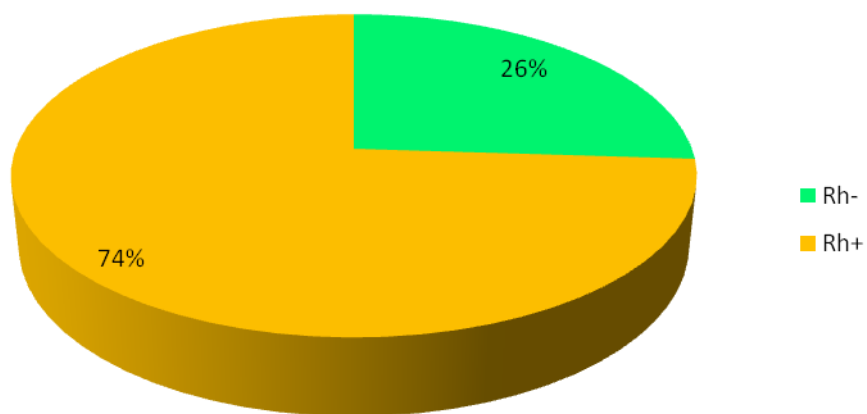
Obr. 21 Procentuální zastoupení krevních podskupin A₁B a A₂B u žen



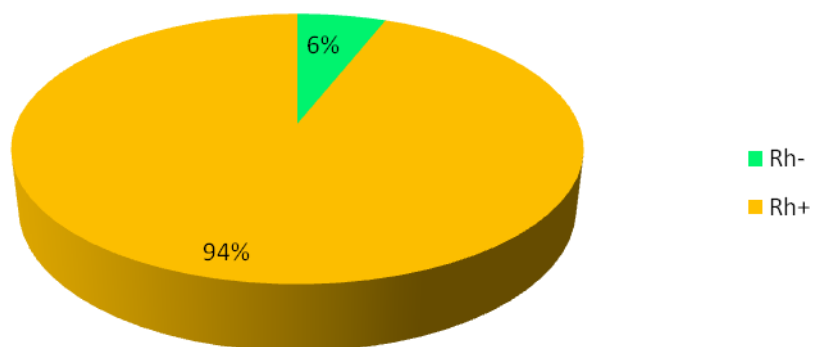
Obr. 22 Procentuální zastoupení krevních podskupin A₁B a A₂B u mužů



Obr. 23 Procentuální zastoupení krevních skupin v systému Rh u vyšetřovaných pacientů



Obr. 24 Procentuální zastoupení krevních skupin v systému Rh u žen

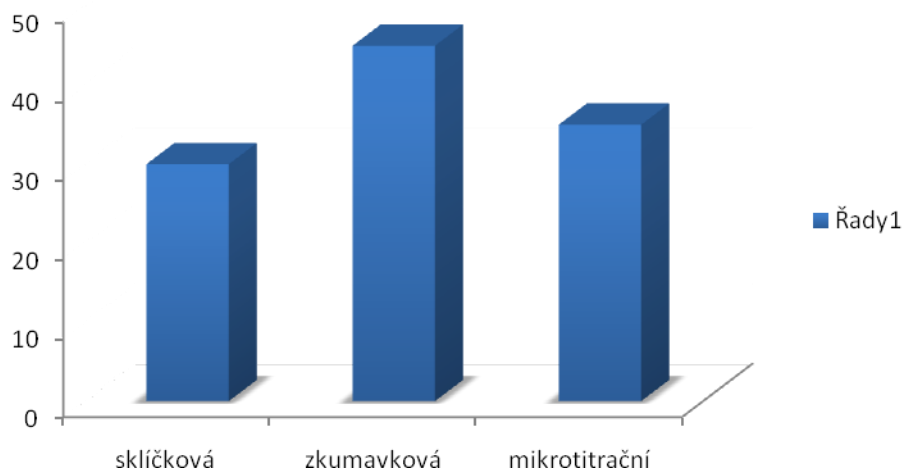


Obr. 25 Procentuální zastoupení krevních skupin v systému Rh u mužů

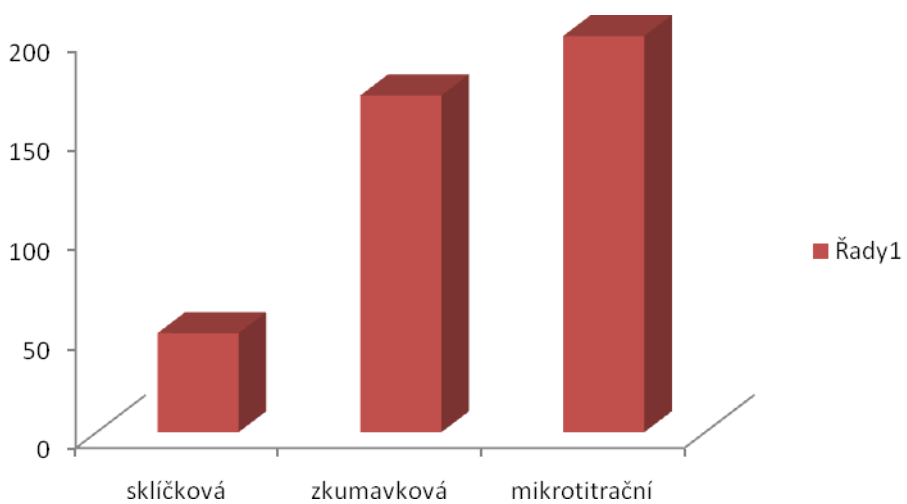
4.4 Porovnání metod u vyšetřovaných krevních skupin v systému AB0 a Rh

Tabulka 7. Porovnání metod stanovení krevních skupin v systému AB0 a Rh

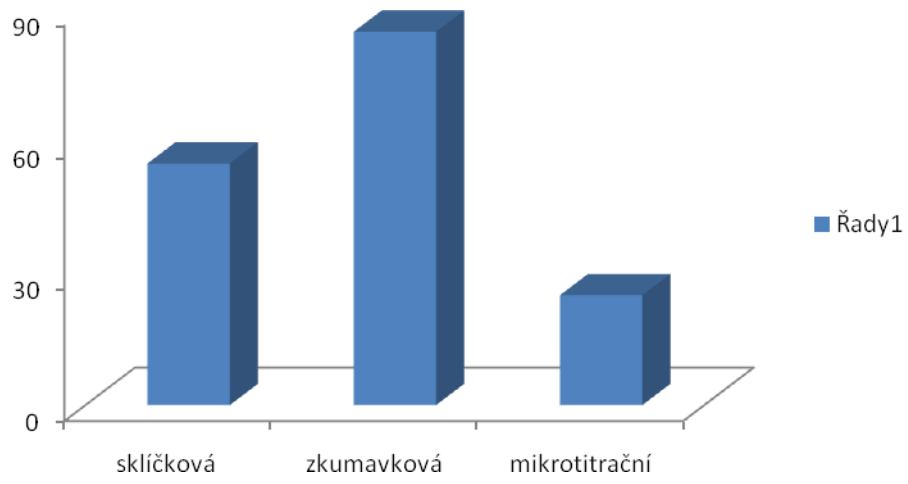
Vyšetření AB0 a Rh	Metody		
	sklíčková	zkumavková	mikrotitrační
časová náročnost	10 min centrifugace plné krve 5 - 10 min označení a řádné popsání sklíček 5 min nakapání reagensů 5 min nakapání krve a séra 10 min odečítání krevních skupin celkem 30 - 35 min/ 20 krevních skupin	10 min centrifugace plné krve 5 - 10 min označení zkumavek 5 min nakapání reagensů 5 min centrifugace krvinek a fyziologického roztoku 5 - 10 min nakapání náplavu a séra 1 min centrifugace 10 min odečítání krevních skupin celkem 36 - 46 min/20 krevních skupin	10 min centrifugace plné krve 5 min označení gelových karet 5 - 10 min příprava suspenzí 5 min rozpipetování suspenzí 10 min centrifugace 5 - 10 min odečítání krevních skupin celkem 35 - 45 min / 20 krevních skupin
finanční náklady (za 1 krevní skupinu)	50,- Kč	170,- Kč	200,- Kč
náročnost práce	střední	velká	malá
spolehlivost	100%	100%	100%



Obr. 26 Časová náročnost metod vyjádřená v [min]



Obr. 27 Finanční náklady metod. Vyjádřeno v [Kč] za 1 krevní skupinu.



Obr. 28 **Náročnost práce vyjádřená v [%]**

5. Diskuze

Cílem mé bakalářské práce bylo pomocí tří různých metod vyšetřit 75 vzorků krve od různých pacientů, které byly dodány do laboratoře Laboma s. r. o. v Českých Budějovicích. Účelem bylo vyšetřit krevní skupiny a porovnat tyto metody mezi sebou z hlediska časové náročnosti, finančních nákladů, náročnosti práce a spolehlivosti.

Ze zpracování výsledků při použití všech tří metod, které jsem prováděla v laboratoři Laboma s. r. o. vyplývá:

Skličková metoda je nejméně časově náročná, trvá 30 – 35 minut (Obr. 26; Tabulka 7), jelikož doba tohoto vyšetření závisí na počtu vyšetřovaných krevních skupin. V laboratoři se neprovádí jako běžná vyšetřovací metoda, ale spíše slouží jako orientační metoda. Ke špatnému odečtení krevních skupin může vést zasychání krve na sklíčku, také zde hrozí nebezpečí záměny reagentů na sklíčku. Avšak ke kontaminaci může dojít i při promíchávání všech reakcí pouze jedním rohem podložního sklíčka (Hrubíško 1983).

Vyšetření prováděné ve zkumavkách patří k metodám, které jsou nejčastěji prováděné v laboratořích. Tato metoda je časově náročnější než sklíčková (Tabulka 7, Obr. 26), neboť je nutné nechat krev stočit v centrifuze a to hned několikrát. Tato metoda je sice dražší (Tabulka 7, Obr. 27) a pracnější (Obr. 28), ale je spolehlivá a použitelná pro správné stanovení krevních skupin a lze ji vykonávat v každé hematologické laboratoři. Avšak i u této metody přes všechny klady může dojít k omylům; když se vytvoří příliš hustý náplav krvinek vyšetřovaného pacienta, slabě účinné diagnostické sérum, nešetrný způsob odečítání či zasychání krve (Sakalová et al. 1995).

Metoda vyšetřující se na gelových kartách je velmi snadná a rychlá (Tabulka 7, Obr. 26) na zpracování. Tato metoda trvá i s odečtením 36 – 46 minut. Příkládané pracovní postupy dopomáhají ke správnému použití a odečítání krevních skupin. Tato metoda omezí řadu chyb, kterých se může laborant při vyšetřování krevních skupin

dopustit (Rýznarová 2008). Tato metoda je drahá a ne každá laboratoř si ji může pořídit (Obr. 27; Tabulka 7).

U vyšetřovaných pacientů z mého souboru se vyskytuje více žen než mužů (Obr. 13), což také vyplývá z výzkumu, kdy jsem vyšetřila 56% žen a 44% mužů. Ženy jsou vyšetřovány ve většině případů v době těhotenství, aby se zjistilo, zda matka má nepravidelné protilátky (Poole and Daniels 2007).

V České republice (Hrubiško et al. 1983) má 44% lidí krevní skupinu A, skupina 0 se vyskytuje u 31% naší populace, zatímco skupinu B vlastní 17% lidí a pouze 8% obyvatel žije s krevní skupinou AB.

Při svém výzkumu jsem zjistila, že se nejčastěji vyskytují lidé s krevní skupinou A; a to v 36%; dále jsou to lidé se skupinou 0 v 24%, B v 27% a AB v 13% (Obr. 14). Nejčastější výskyt krevní skupiny u žen (Obr. 15) je A (38%), 0 (26%), B (26%) a AB (10%). Nejmenší výskyt krevní skupiny u mužů (Obr. 16) je AB (18%), větší počet mužů má krevní skupinu B (27%), 0 (22%) a nejčastěji se vyskytující krevní skupina je A (33%).

Dále je uvedeno (Sakalová et al. 1995), že asi 80% jedinců má krevní podskupinu A_1 a pouze 20% A_2 .

Během zkoumání jsem vyšetřila (Obr. 17) 89% pacientů s krevní podskupinou A_1 a 11% s podskupinou A_2 . Ženy (Obr. 18) mají podskupinu A_1 v 80% a podskupinu A_2 má 20% žen v mém vyšetřovaném souboru. Muži (Obr. 19) mají z 91% podskupinu A_1 a 9% A_2 .

90% jedinců má krevní skupinu A_1B a 10% skupinu A_2B (Hrubiško et al. 1983). Ve svém vyšetřovaném souboru jsem vyzkoumala, že 80% vyšetřených pacientů má krevní podskupinu A_1B a 20% s A_2B (Obr. 20). Ženy (Obr. 21) mají v 50% podskupinu A_1B i A_2B . U mužského pohlaví (Obr. 22) jsem vyšetřila 100% jedinců s podskupinou A_1B .

Dále se uvádí (Sakalová et al. 1995), že běloši jsou v 85% Rh pozitivní a v 15% negativní. Při mém zkoumání vyplynulo, že (Obr. 23) Rh pozitivních je 83% a Rh negativních je 17%. Ženy jsou Rh pozitivní v 74% a Rh negativní v 26% (Obr. 24) a muži jsou Rh pozitivní v 94% (Obr. 25) a negativní v 6%.

6. Závěr

Cílem této práce bylo vyšetřit krevní skupiny třemi různými metodami a porovnat tyto metody mezi sebou z hlediska časové náročnosti, finančních nákladů, náročnosti práce a spolehlivosti. Po srovnání všech výsledků v této práci je patrné, že všechny užívané metody jsou vhodné, spolehlivé a použitelné pro správné stanovení krevních skupin a lze je vykonávat v každé hematologické laboratoři. Tím jsem si ověřila, že se má první hypotéza, kterou jsem si stanovila, potvrdila.

I svou druhou hypotézu jsem potvrdila, neboť metoda zkumavková je levnější, ale pracnější a pomalejší než metoda mikrotitrační. Metodu mikrotitrační jsem prováděla, i když není využívána v laboratořích tak často jako metoda zkumavková kvůli finančnímu aspektu.

Ženy jsou vyšetřovány ve většině případů v době těhotenství, aby se zjistilo, zda matka nemá nepravidelné protilátky a tím má třetí hypotéza, že mezi vyšetřovanými pacienty je více žen než mužů, je opět pravdivá.

I když metoda sklíčková a zkumavková je známá několik desítek let, tak dnešní doba a rozvoj technologie nabízí i jiné možnosti, jak vyšetřit krevní skupiny a to je metoda vyšetřování krevních skupin na automatových přístrojích. Tuto metodu jsem neprováděla, jelikož je zavedena jen na ojedinělých pracovištích, kde se vyskytuje větší množství krevních vzorků k vyšetření krevních skupin.

Doufám, že tato bakalářská práce bude přínosem do oblasti zdravotnictví a pokud si ji kdokoliv bude číst, věřím, že ho osloví téma krevních skupin a problematika s nimi spojená. Informace o krevních skupinách jsou velice četné a věda zabývající se krevními skupinami je rozsáhlá a není jednoduché do ní jen tak proniknout.

7. Seznam použité literatury a pramenů

- [1] Casina, T.S. (2006): In search of the Holy Grail: Comparison of antibody screening methods. *Immunohematology* 22: 196-202
- [2] Baiocchi, E., Nardoza, L. M. (2009): Alloimmunization. *Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia: Revista da Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia* 31: 311-9
- [3] Bičík, V. *Základy hematologie a imuno hematologie*. 1. vydání, Olomouc: Rektorát Univerzity Palackého v Olomouci, 1992. 52 s. ISBN 80-7067-131-9.
- [4] Bohoněk, M. (2009): Přehled imuno hematologických automatů pro krevní banky. 2. Sřešovický transfuzní den – soubor přednášek a prezentací.
- [5] Cartron, J.P., Colin, Y. (2001): Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfusion Clinique et Biologique* 8: 163-199
- [6] Čermáková, Z., Kořístka, M., Malušková, A. *Imuno hematologie*. 1. vydání, Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2008. 70 s. ISBN 978-80-7368-600-0
- [7] Engelfriet, C.P. et al. *Imuno hematologie*. Amsterdam: Sanquin Reagents, 2003. 158 s. ISBN 90-5267-029-3
- [8] Gröger, H. (2001): Karl Landsteiner. *Wiener klinische Wochenschrift* 113: 770-775
- [9] Hrubíško, M. et al. *Hematologie a krevní transfuse II. Krevní transfuse*. 1. české vydání, Praha 1: Avicenum zdravotnické nakladatelství, 1983. 208 s. ISBN 08-056-83.

[10] Jílková, H. Transfuzní lékařství. 1. vydání, Pardubice: Univerzita Pardubice, 2009. 98 s. ISBN 978-80-7395-151-1.

[11] Kirkman, E. (2007): Blood groups. Anaesthesia and intensive care medicine 8: 200-202

[12] Kubisz, P. et al. Hematológia a transfuziológia. 1. vydání, Bratislava: Grada Slovakia, spol.s.r.o., 2006. 324 s. ISBN 50-8090-000-0.

[13] Ľubušký, M., Holusková, I., Procházka, M., Vomáčková, K. (2009): Incidence erytrocytární Aloimunizace u těhotných žen. Transfuze a Hematologie dnes 15: 53

[14] Malaska, Z. Imunohematologie a krevní transfuze. Praha 1: Státní zdravotnické nakladatelství v Praze 1, 1957. 208 s. ISBN 301-08-09.

[15] Pecka, M. Základy imunohematologie a transfuziologie. Hradec Králové: střední zdravotnická škola a Vyšší zdravotnická škola, 2005. 139 s. ISBN 80-9034 14-4-6.

[16] Písačka, M. (2009): Krevní skupiny-historické aspekty, současné poznatky a „česká stopa” v imunohematologii. Transfuze a Hematologie dnes 15: 20-25

[17] Poole, J. and Daniels, G. (2007): Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. Transfusion medicine reviews 21: 58 - 71

[18] Rachel, J.M., Plapp, F.V. (1990): Bedside blood grouping. Medical laboratory sciences 47: 330-336

[19] Rýznarová, E. (2008): Testování AB0 / D a reversní testování AB0. Příbalový leták k sadě ScanGel pro vyšetření aglutinogenů AB0 systému a Rh / vyšetření aglutininů v séru na gelovém system ScanGel

[20] Sakalová, A., Lipšic, T. et al. Hematológia a transfuziológia. Žilina: Vydavateľství Osveta, 1995. 528 s. ISBN 80-217-0444-6.

[21] Švejnoha, J. Jan Janský objevitel čtvrté krevní skupiny. 1. vydání, Praha: Český červený kříž, 2000. 120 s.

8. Klíčová slova

Krevní skupiny

Krevně skupinový systém AB0

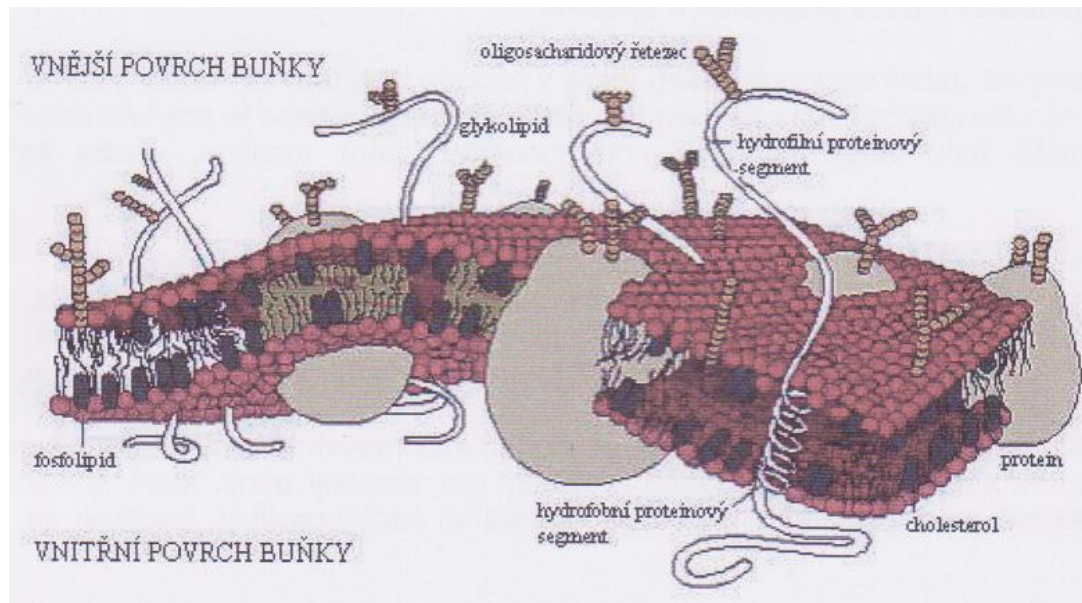
Krevně skupinový systém Rh

Skličková metoda

Zkumavková metoda

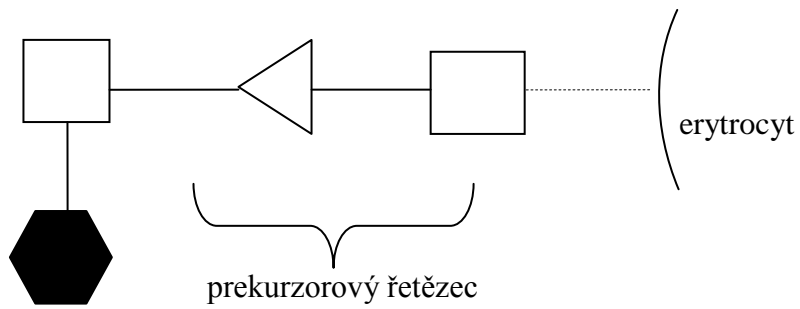
Metoda na mikrotitračních destičkách

9. Přílohy



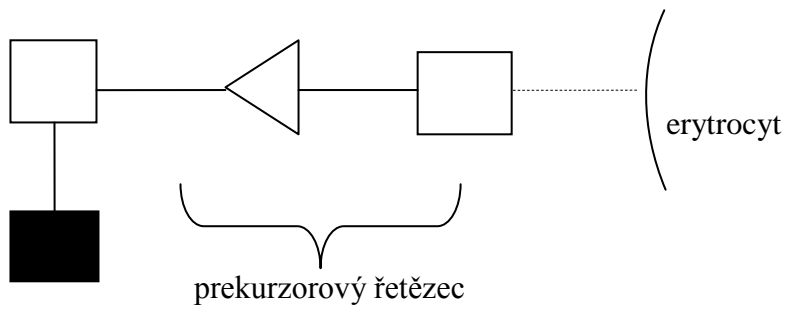
Obr. 4 Vnější a vnitřní povrch buňky (Engelfriet, 2003)

Skupina A



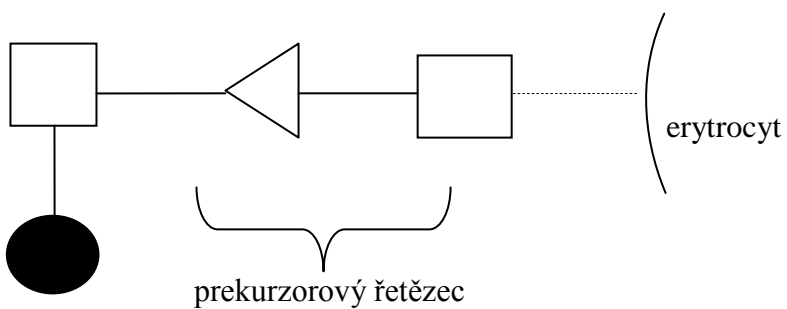
N-acetylgalaktozamin

Skupina B



D-galaktóza

Skupina 0



L-fukóza

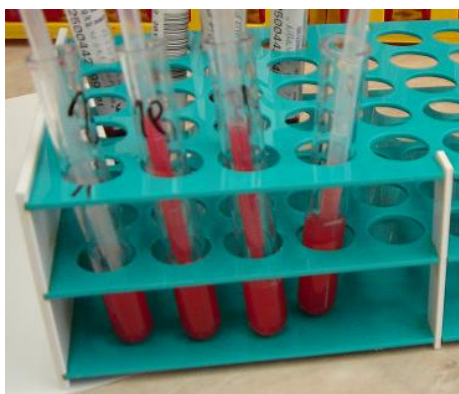
Obr. 5 Schematické znázornění oligosacharidových struktur antigenů, H, A, B (Sakalová et al. 1995)



Obr. 10 Diagnostická séra anti-B, anti-A, anti-AB, Pelikloon anti-Dmix, Pelikloon anti-D



Obr. 11 Typové krvinky A₁, A₂, B, 0



Obr. 12 2-3% náplav za použití fyziologického roztoku