

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

**SCREENING PROTILÁTEK U TĚHOTNÝCH ŽEN
S OHLEDEM NA JEJICH KREVNÍ SKUPINU**

Bakalářská práce

Autor práce: Věra Vacková
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Karel Blažek

Datum odevzdání práce: 13. 8. 2012

Abstrakt

Tématem této práce je screening protilátek u těhotných žen s ohledem na jejich krevní skupinu. Screening protilátek u těhotných žen slouží k určení potenciaálně rizikových těhotenství z hlediska hemolytického onemocnění novorozenců (HON).

HON je stav, kdy mateřské nepravidelné protilátky třídy IgG procházejí přes placentu a destruuji fetální erythrocyty. Protilátky mohly vzniknout následkem předchozí nekompatibilní transfuze nebo proniknutím fetálních erythrocytů do matčina krevního oběhu prostřednictvím fetomaternálního krvácení. To mohlo nastat v současném těhotenství, nebo v průběhu toho předchozího.

Nepravidelné erythrocytární protilátky jsou detekovány pomocí nepřímého antiglobulinového testu (NAT). Citlivost testu můžeme zvýšit použitím média o nízké iontové síle (LISS-NAT).

Protilátka, která nejčastěji způsobuje HON, je anti-D. Od té doby, co se zavedla rutinní prenatální profylaxe imunoglobulinem anti-D, výrazně klesl výskyt HON způsobený touto protilátkou. Po porodu se slabé formy HON léčí pomocí fototerapie ultrafialovým (UV) světlem. U závažné formy musí novorozenec podstoupit výměnnou transfuzi.

Imunoprofylaxe imunoglobulinem anti-D je výrazně levnější, než výměnná transfuze. Screening protilátek je levné, ale efektivní vyšetření.

Abstract

The topic of this work is screening the pregnant women's antibodies according to their blood group. The screening of the pregnant women's antibodies is to state the potentially high-risk group of pregnancy from the point of hemolytic disease of newborn (HDN).

HDN is a state when maternal irregular antibodies of group IgG go via placenta and destroy fetal red cell. The antibodies may have been formed as a consequence to a previous non-compatible transfusion or due to the penetration of the fetal red cell into the mother's blood circulation via fetomaternal hemorrhage (FMH). This may have developed during the current pregnancy or the previous one.

Irregular red cell antibodies are detected by the indirect antiglobulin test (IAT). The sensitivity of the test can be increased by the medium of low ionic strength solution (LISS-NAT).

The antibody causing the HDN the most is anti-D. Since introducing the routine-based antenatal prophylaxis by the anti-D immunoglobulin, appearance of HDN caused by this antibody has decreased noticeably. After the delivery, the weak appearance of HDN is treated with ultraviolet (UV) light phototherapy. In case of severe appearance, the newborn undergoes a exchange transfusion.

Immunoprophylaxis by the anti-D immunoglobulin is much cheaper than transfusion. Screening antibodies is cheap, but effective investigation.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne: 13. 8. 2012

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému vedoucímu bakalářské práce MUDr. Karlovi Blažkovi za odborné vedení práce a zprostředkování možnosti provést laboratorní část práce v laboratoři Synlab czech, s.r.o. v Českých Budějovicích. Poděkování patří i paní Aleně Fálové za pomoc při práci v laboratoři.

Obsah

Úvod	8
1 Současný stav	9
1.1 Screening protilátek	9
1.1.1 Vstupní vetření	9
1.1.2 Vyšetření plodu	11
1.2 Hemolytické onemocnění novorozenců (HON).....	12
1.2.1 Intrauterinní transfuze (IUT).....	12
1.2.2 Fototerapie a výměnná transfuze	13
1.2.3 HON způsobené anti-D.....	13
1.2.4 Imunoprofylaxe	14
1.2.5 HON způsobené anti-A nebo anti-B protilátkami.....	14
1.3 Objev krevních skupin	15
1.4 Skupinový systém AB0 (H)	18
1.4.1 Antigeny systému AB0 (H).....	18
1.4.2 Protilátky systému AB0 (H).....	20
1.5 Skupinový systém MNS.....	23
1.5.1 Antigeny systému MNS	23
1.5.2 Protilátky systému MNS	24
1.6 Skupinový systém P	25
1.6.1 Antigeny systému P.....	25
1.6.2 Protilátky systému P.....	25
1.7 Skupinový systém Rhesus.....	26
1.7.1 Antigeny Rhesus systému	26
1.7.2 Protilátky systému Rhesus	27
1.8 Skupinový systém Lutheran.....	29
1.8.1 Antigeny systému Lutheran.....	29
1.8.2 Protilátky systému Lutheran	29

1.9	Skupinový systém Kell	31
1.9.1	Antigeny systému Kell.....	31
1.9.2	Protilátky systému Kell.....	32
1.10	Skupinový systém Lewis.....	33
1.10.1	Antigeny systému Lewis.....	33
1.10.2	Protilátky systému Lewis.....	33
1.11	Skupinový systém Duffy.....	34
1.11.1	Antigeny systému Duffy.....	34
1.11.2	Protilátky systému Duffy.....	35
1.12	Skupinový systém Kidd.....	36
1.12.1	Antigeny systému Kidd.....	36
1.12.2	Protilátky systému Kidd.....	37
1.13	Laboratorní metody používané k určování krevně skupinových protilátek .	38
1.13.1	Redukce vodního pláště a iontového oblaku kolem erytrocytů	39
1.13.2	Zesílení vazby mezi antigenem a protilátkou.....	40
1.13.3	Antiglobulinový test: vzájemné propojení protilátkových molekul.....	40
2	Cíle	43
3	Metodika.....	44
3.1	Vyšetření krevních skupin.....	44
3.2	Vyšetření Rh systému	47
3.3	Screening protilátek	48
4	Výsledky	50
5	Diskuze.....	58
6	Závěr	61
7	Klíčová slova	62
8	Seznam použitých zdrojů.....	63
9	Přílohy	66

Úvod

Bakalářská práce se věnuje laboratornímu vyšetření krevních skupin a současně screeningu protilátek u těhotných žen. Je to velmi zajímavé a rozsáhlé téma. K rozvoji těchto vyšetření docházelo v souvislosti s objevy nových krevních systémů a rozvojem laboratorních metod.

V teoretické části bakalářské práce se zabývám současnými poznatky ohledně krevně skupinových systémů a laboratorním metodám používaných k určování krevně skupinových protilátek. Dále se věnuji screeningovým vyšetřením u těhotných žen.

Určení krevní skupiny i screening protilátek jsou součástí imunohepatologického vyšetření. Určování krevních skupin je důležitou součástí transfuzní praxe. Vyšetření krevní skupiny v ABO systému se provádí na principu serologické detekce antigenů (aglutinogenů) přítomných na erytrocytech a protilátek (aglutininů) nacházejících se v plazmě. Aglutinogeny jsou detekovány pomocí monoklonálních diagnostických sér a aglutininy jsou rozpoznávány diagnostickými erytrocyty.

Nepravidelné protilátky se vyšetřují ze séra pomocí diagnostických erytrocytů se známou skladbou antigenů klinicky významných krevně skupinových systémů. Nepravidelné protilátky se vyšetřují pomocí různých testů a různými metodami. Nejčastěji se používají nepřímý antiglobulinový test s diagnostickými erytrocyty v roztoku o nízké iontové síle (LISS-NAT) formou sloupcové gelové aglutinace.

Screening nepravidelných protilátek se u těhotných žen vyšetřuje za účelem určení potencionálně rizikových těhotných z hlediska hemolytického onemocnění novorozenců (HON). Silně rizikovou skupinou jsou Rh negativní ženy a ženy s významnými protilátkami proti antigenům erytrocytů. Toto vyšetření má pomoci při diagnóze HON a dalším postupu.

1 Současný stav

1.1 Screening protilátek

Účelem screeningu protilátek je určení potenciálně rizikových těhotenství z hlediska hemolytického onemocnění novorozenců. Značně rizikovou skupinou jsou Rh negativní ženy a ženy s významnými protilátkami proti erytrocytárním antigenům. Toto vyšetření má pomoci při diagnóze a dalším postupu u hemolytického onemocnění novorozenců.

Hemolytické onemocnění novorozenců mohou způsobit kterékoliv antierytrocytové alogenní protilátky, které jsou v IgG třídě. Nejčastější příčinou těžkého hemolytického onemocnění novorozenců protilátky anti-D (85%), anti-c (3,5%), anti-K (10%) a anti-E. Mezi klinicky významné protilátky z hlediska hemolytického onemocnění novorozenců patří: anti-A, -B, -C, -e, -Ce, -cE, -Fy^a, -Jk^a.

Protilátky detekované u těhotných žen jsou často následkem předchozí transfuze, nejčastěji anti-c, -K, -Fy^a.

1.1.1 Vstupní vetření

Vstupní imuno hematologické vyšetření se provádí ve 12. týdnu těhotenství. Vyšetření by mělo obsahovat určení krevní skupiny v AB0 systému. Dále pak stanovení antigenu D a vyšetření nepravidelných protilátek ⁽¹⁾.

U stanovení krevní skupiny v AB0 systému se vyšetřují aglutinogeny (antigeny) a aglutininy (protilátky). K vyšetření se požaduje minimálně vyšetření pomocí monoklonálních diagnostických sér anti-A a anti-B a diagnostických erytrocytů A₁ a B.

K vyšetření D antigenu se používají dvě monoklonální diagnostická séra antiD IgM třídy s různými klony. Diagnostická séra by neměla detekovat variantu D^{VI}. K určení D antigenu se nepoužívá antiglobulinový test. Nedoporučuje se používání diagnostického séra anti-CDE ⁽²⁾.

Screening nepravidelných protilátek umožňuje detekovat klinicky významné protilátky, které by mohly ohrozit plod nebo novorozence. Vyšetření má význam nejen

u D negativních žen, ale i u žen D pozitivních, protože se u hemolytického onemocnění novorozenců mohou klinicky uplatňovat i jiné specifické protilátky než anti-D. D pozitivní těhotné ženy i D negativní mohou vytvářet jiné protilátky než anti-D stejně pravděpodobně.

Screeningová vyšetření by měla obsahovat nepřímý antiglobulinový test s použitím erytrocytů v roztoku o nízké iontové síle při 37°C (LISS-NAT anti-IgG +antiC3d). V úvahu přicházejí i další metody se srovnatelnou citlivostí. Vhodnými testy jsou zkumavkové testy, sloupcová aglutinace a testy využívající pevnou fázi.

U diagnostických erytrocytů se doporučuje použití tří panelů s minimálním zastoupením těchto antigenů: C, C^W, c, D, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, M, N, Le^a. Doporučuje se, aby měly jedny screeningové diagnostické erytrocyty genotyp DCe/DCe a jedny DcE/DcE.

V případě pozitivního screeningového vyšetření se provádí identifikace nepravidelných protilátek a vyhodnocení jejich klinické významnosti vzhledem k hemolytickému onemocnění novorozenců a transfuzi. K identifikaci nepravidelných protilátek se používá LISS-NAT. V případě obtížného určení specifity nepravidelných protilátek se používají enzymové testy, včetně enzymového LISS-NAT.

Při identifikaci nepravidelných protilátek by měl být použit panel minimálně osmi diagnostických erytrocytů krevní skupiny 0. Diagnostické erytrocyty by měly exprimovat tyto antigeny: K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, M, S, s. U těhotných žen, které už byly v minulosti imunizovány nebo jsou po anti-D profylaxi, jsou požadavky na panel diagnostických erytrocytů odlišné.

Pokud byly během screeningového vyšetření zachyceny nepravidelné protilátky, stanovuje se jejich titr. Ten slouží k monitorování průběhu hemolytického onemocnění novorozenců a k rozhodování, kdy začít hemolytické onemocnění monitorovat jinou metodou, než imunohematologickou ⁽¹⁾. Jestliže se v předchozím těhotenství vyskytlo těžké hemolytické onemocnění novorozenců, není už titrování klinicky významných protilátek užitečné ⁽³⁾.

1.1.2 Vyšetření plodu

S odběrem krevního vzorku plodu (kordocentéza) bylo spojené vysoké riziko fetomaternálního krvácení a tím pádem další aloimunizace matky. Navíc v 1-3% případů docházelo k potratu.

Serologické vyšetření krevní skupiny v AB0 systému u plodu nepřináší žádnou užitečnou informaci. V některých případech se používá k průkazu neshodné krevní skupiny u plodu a těhotné ženy.

U systémů Rh, Kell, Kidd a Duffy lze uplatnit stanovení genotypu. Nejvýznamnější je typování RHD genu ⁽¹⁾.

1.2 Hemolytické onemocnění novorozenců (HON)

Už v roce 1939 Levin a Stetson prokázali, že se v krevním oběhu těhotné ženy mohou vyskytovat imunní protilátky třídy IgG. Pokud jsou tyto protilátky namířeny proti erytrocytárním antigenům plodu, mohou se přes placentu dostat do krevního oběhu plodu a způsobit destrukci fetálních erytrocytů⁽⁴⁾. Fetální erytrocyty jsou hemolyzovány a dochází k fetální anémii – fetální erytrocyty jsou hemolyzovány rychleji, než mohou být vytvářeny. Anémie mohou být různě závažné. Těžké anémie mohou vést k selhání srdce plodu, zadržování tekutin a otoku (hydrops), dokonce až k intrauterinní smrti. V průběhu těhotenství může být provedena intrauterinní transfuze. Zákrok ale nese riziko ztráty plodu⁽⁵⁾.

Z poškozených fetálních erytrocytů se uvolní velké množství hemoglobinu. Ten se přemění na charakteristicky žlutý bilirubin. Před narozením dítěte je bilirubin absorbován hlavně v krevním oběhu matky, kde je následně konjugován jejími játry a může dojít k jeho vylučování. Aby mohl být bilirubin vyloučen, musí být nejdříve konjugován. Po narození nejsou novorozenecká játra schopna konjugovat nahromaděný nekonjugovaný bilirubin, a ten způsobuje žluté zbarvení kůže dítěte, tzv. novorozeneckou žloutenku⁽⁴⁾.

Nízké hladiny bilirubinu nejsou škodlivé. Vyšší hladiny bilirubinu mohou vést k poškození bazálních ganglií v mozku. Toto poškození může způsobit trvalé poškození, např. dětskou mozkovou obrnu. Poporodní žloutenka může být léčena fototerapií nebo výměnnou transfuzí⁽⁵⁾.

1.2.1 Intrauterinní transfuze (IUT)

Léčba HON před narozením je zaměřená hlavně na obnovení hladiny hemoglobinu, protože bilirubin je v tomto stádiu vylučován přes matku⁽⁴⁾. U těžce anemických plodů na počátku 2. trimestru je léčba technicky velmi náročná. Navíc je spojována s vysokou perinatální ztrátou plodu⁽⁶⁾.

Ve vážných případech je možné intrauterinní transfuzi podávat od 16. týdne těhotenství. Ke stanovení krevní skupiny a hladiny imunoglobulinu je odebrána krev pomocí punkce pupečnickové šňůry. Ze vzorku je také proveden přímý antiglobulinový

test. Během intrauterinní transfuze se podává co nejvíce erytrocytů v co nejmenším objemu. Dárcovské erytrocyty musí být negativní pro skupinové antigeny, proti nimž jsou namířené mateřské protilátky. Jelikož ještě není plně vyvinut imunitní systém plodu, musí být erytrocyty pro intrauterinní transfuzi vždy ozářeny.

1.2.2 Fototerapie a výměnná transfuze

Novorozenec není schopen odbourat a odstranit bilirubin, neboť ještě nemá plně funkční játra. Bilirubin se u novorozence odbourává pomocí účinků ultrafialového (UV) světla. Ultrafialové světlo přemění bilirubin na neškodné složky, které jsou následně vyloučené ledvinami.

Pokud je účinek ozáření pod UV lampou nedostatečný, musí se provést výměnná transfuze. Během výměnné transfuze je velký podíl novorozenecké krve nahrazen dárcovskou krví. Výměnnou transfuzí se odstraní bilirubin, ale i protilátky, které způsobily destrukci erytrocytů. Dárcovské erytrocyty nesmí obsahovat antigeny, proti kterým jsou namířené mateřské protilátky. Samozřejmě musí být erytrocyty i plasma ABO kompatibilní u matky i u dítěte. Pomocí výměnné transfuze se léčí fetální anémie a odstraní se bilirubin. Tím se předchází následnému poškození mozku dítěte.

Pro křížový pokus u výměnné transfuze se používá nepřímý antiglobulinový test. Ten by se měl provést s matčíným sérem, protože všechny protilátky v krvi dítěte mohou být navázány na erytrocyty a nelze je v séru dítěte detekovat ⁽⁴⁾.

1.2.3 HON způsobené anti-D

Mateřská aloimunizace a následné HON jsou nejčastěji způsobeny Rhesus systémem. Mateřská Rh aloimunizace je výsledkem vystavení Rh negativní matky erytrocytům Rh pozitivního plodu ⁽⁵⁾.

Zhruba 16% žen kavkazské populace je D negativních a 84% mužů D pozitivních. Proto je časté, že D negativní ženy mají D pozitivní plod. Přestože je D antigen silně imunogenní, nenastává ve všech případech, kdy je plod D pozitivní a matka D negativní, imunní odpověď. Asi ve čtvrtině těhotenství pronikne do matčina krevního oběhu dostatek fetálních erytrocytů, které způsobí dostatečnou imunizaci.

V případě, že jsou krevní skupiny matky a dítěte inkompatibilní v ABO systému, tak jsou erytrocyty plodu proniklé do matčiny krve okamžitě destruovány anti-A nebo anti-B protilátkami. A to dříve, než způsobí Rh D imunizaci ⁽⁴⁾.

1.2.4 Imunopfyaxe

Za většinu případů HON, v případě Rhesus imunizace, jsou zodpovědné Rh D protilátky. K Rh D imunizaci dochází, pokud nastane fetomaternální krvácení mezi Rh pozitivním plodem a Rh negativní matkou. Podání anti-D imunoglobulinu potlačuje imunitní odpověď Rh negativní matky vystavené Rh pozitivním fetálním erytrocytům ⁽⁷⁾. Imunoglobulin anti-D způsobí rychlé odstranění Rh D pozitivních fetálních buněk. Navíc může být potlačena produkce Rh D protilátek ⁽⁸⁾.

Rutinní poporodní podávání imunoglobulinu anti-D je úspěšně zavedeno ve vyspělých zemích od roku 1969 a výrazně snížilo riziko vzniku HON. Doporučuje se podávat imunoglobulin anti-D i ženám, u kterých hrozí, že u nich mohlo dojít k fetomaternálnímu krvácení v důsledku potratu, ukončení těhotenství, invazivního prenatalního diagnostického vyšetření a císařského řezu ⁽⁹⁾. K dalšímu poklesu imunizací mezi matkou a plodem došlo, když se imunoglobulin anti-D začal podávat prenatalně, aby se zabránilo imunizaci z nezjištěného fetomaternálního krvácení během posledního trimestru ⁽¹⁰⁾.

1.2.5 HON způsobené anti-A nebo anti-B protilátkami

Přirozené aloprotilátky anti-A a anti-B patří do třídy IgM a nejsou schopné procházet přes placentu k fetálním erytrocytům. Ale z různých důvodů je matka může vyrobit i ve třídě IgG. V tom případě mohou přecházet přes placentu a způsobit HON. Průběh HON způsobeného anti-A a anti-B protilátkami je mírnější, než průběh onemocnění zapříčeno anti-D protilátkami. Na HON způsobené anti-A a anti-B protilátkami se většinou přijde až po porodu, kdy se u dítěte objeví novorozenecká žloutenka ⁽⁴⁾.

1.3 Objev krevních skupin

Jednou z nejzajímavějších kapitol v dějinách lékařství je vývoj krevní transfuze. Už ve starověkém Egyptě používali princové krvavé lázně k posílení a osvěžení těla, ve středověku pili někteří bohatí patriciové krev zraněných gladiátorů. Ze zápisů římských spisovatelů je možné usoudit, že staří Římané, Egypťané, Židé a Asyřané již znali krevní transfuzi. Někteří autoři lékařské literatury z konce 16. století a počátku 17. století připouští možnost krevní transfuze a popisují teoretické návrhy na její uskutečnění.

Teprve objev krevního oběhu Wiliamem Harveyem (1578-1657) v roce 1616 přináší pro další rozvoj hematologie první vědecký základ. První pokusy o transfuzi krve se objevily až v druhé polovině 17. století a byly prováděny na zvířatech. Historicky ověřenou první úspěšnou transfuzi krve z jednoho zvířete druhému provedl anatom Richard Lower (1631-1691). Stříbrnou trubičkou spojil tepnu psa s žilou vykrváčeného psa. Poté uskutečnil ještě několik podobných úspěšných pokusů. Tyto pokusy ukázaly, že s vhodnou aparaturou je možné převádět krev z jednoho zvířete do druhého, přičemž k záchraně vykrváčeného zvířete stačí mnohem méně krve, než kolik jí ztratilo a odebráním malého množství krve nezpůsobí druhému zvířeti žádnou újmu. Konaly se i pokusy o krevní transfuzi mezi různými druhy zvířat (např. mezi psem a beránkem), ale nebyly vždy úspěšné.

První převod krve na člověka uskutečnil ve Francii profesor matematiky a filozofie Jean Babtiste Denis (1628-1704) roku 1667. U šestnáctiletého chlapce, který byl zesláblý častým „pouštěním žilou“ a trpěl horečkami, použil k transfuzi krev beránka. Po několika náhodně úspěšných převodech krve však došlo k dalším smrtelným. Denis byl soudně stíhán a na 120 let bylo celosvětově přerušeno zkoumání krevních transfuzí.

Zájem o krevní transfuze opět vzrostl až začátkem 19. století zásluhou anglického porodníka a fyziologa Jamese Blundelly (1791-1878), který provedl úspěšnou transfuzi u vykrváčené rodičky. K transfuzím používal pouze lidskou krev. Jeho úspěch vzbudil u lékařů po celém světě značný zájem o krevní transfuze.

Důvod, proč jsou některé transfuze úspěšné a některé ne, objasnil až objev

krvních skupin. Tento objev učinili v letech 1900-1910 Landsteiner, Janský a Moss nezávisle na sobě.

Karl Landsteiner (1868-1943) při svých pokusech pozoroval jistou aglutinační zákonitost mezi lidskými séry a krvinkami. Na podkladě těchto pokusů v roce 1901 rozdělil lidské krve do tří skupin.

Pražský profesor a psychiatr Jan Janský (1873-1921) se snažil najít podstatu některých duševních chorob v lidské krvi. Všiml si aglutinačního vztahu mezi séry a krvinkami u hospitalizovaných pacientů na psychiatrické klinice KU v Praze. Později stejný jev pozoroval i u naprosto zdravých lidí a došel k závěru, že s onemocněním vůbec nesouvisí. Stanovil jednotlivé aglutinační zákonitosti mezi lidskými krvinkami a séry a rozdělil lidstvo do čtyř skupin podle jejich vlastností. Jednotlivé skupiny označil římskými číslicemi I, II, III a IV. Svůj objev zveřejnil ve Sborníku lékařském v roce 1907.

Američan William Lorenzo Moss (1876-1957) v roce 1910 označil své krevní skupiny také římskými číslicemi, ale v obráceném sledu než Janský. Komise americké lékařské společnosti proto roku 1921 stanovila jednotné označení krevních skupin, a to podle Janského. Tímto byla potvrzena priorita jeho objevu. Na prvním mezinárodním sjezdu krevní transfuze došlo ke změně označení krevních skupin na A, B a 0, které se dodnes používá po celém světě⁽¹¹⁾.

Po objevu krevně skupinového systému AB0 byly nalezeny další antigenní vlastnosti červených krvinek, které nebyly pro transfuzi až tak významné. Karl Landsteiner dohromady s Philipem Levinem (1900-1987) odhalili roku 1927 systém MN. Důležitější byl v roce 1941 objev Rh systému, který učinili Landsteiner s Alexandrem Solomonem Wienerem (1907-1976). Rh systém byl pojmenován podle opice *Macacus rhesus*, neboť pokusy vedoucí k tomuto objevu byly prováděny na jejích krvinkách. Tento objev pomohl vysvětlit některé záhadné reakce po transfuzi a rovněž i příčinu hemolytického onemocnění novorozenců. Po roce 1946 byly objevovány další systémy, jako Duffy, Kell, Kidd, Lutheran a další⁽¹²⁾.

Na základě objevu krevních skupin razantně klesl počet těžkých a smrtelných reakcí při transfuzích. Naopak stoupl počet transfuzí jako léčebného zákroku a došlo

k jejich rozšíření na další lékařská pracoviště. Vedle dosavadního uplatnění v chirurgii a porodnictví si našly své místo i ve vnitřním a dětském lékařství. Objev krevních skupin byl největším a nejvýznamnějším objevem v historii krevní transfuze a podílel se tak na jejím rozšíření jako důležitého terapeutického prostředku ⁽¹¹⁾.

1.4 Skupinový systém AB0 (H)

První objevený krevně skupinový systém byl systém AB0, neboli ABH. Tento systém má i nadále prvořadý význam v transfuzním lékařství. Nejdůležitějšími antigeny tohoto systému jsou antigeny A a B. Gen kódující krevní skupiny má tři alely: A, B a 0. Kodominantní alely A a B kódují příslušný produkt, kdežto alela 0 je tichá a nevyúsťuje v expresi antigenu. Všichni máme dvě alely AB0 systému, jednu jsme zdědili od otce a druhou od matky. Tyto alely mohou vytvořit šest různých kombinací genotypů: A/A, A/0, B/B, B/0 A/B a 0/0. Vzhledem k tomu, že alela 0 je tichá, vyúsťuje těchto šest kombinací pouze do čtyř fenotypů/krevních skupin: A, B, AB a 0⁽⁴⁾.

Přibližná četnost krevních skupin u středoevropského obyvatelstva je následující: A – 45%, B – 15%, AB – 8% a 0 – 32%. Ve světové populaci se frekvence krevních skupin mění s ohledem na rasu, národnost či geografickou oblast. Výskyt skupiny A je docela vysoký u původního obyvatelstva jižní Austrálie (až 77%). Skupina B se s vysokou frekvencí (kolem 40%) objevuje v Asii a skupina 0 se u původního obyvatelstva Ameriky a částí Afriky nachází s četností nad 60%⁽¹³⁾.

1.4.1 Antigeny systému AB0 (H)

Prakticky u každého jedince je přítomná prekurzorová substance, ze které vzniká H antigen. Alely A a B prostřednictvím enzymů přeměňují H substanci na A nebo B antigeny. Alela 0 je tichá a H substanci nemodifikuje. Z toho důvodu je na erythrocytech krevní skupiny 0 přítomna pouze H substance⁽⁴⁾.

Gen H je nezávislý na genu AB0 a antigeny AB0 systému jsou formovány „nepřímým“ procesem. Konečné krevně skupinové antigeny postupně produkují enzymy, ale u většiny ostatních krevně skupinových systému (např. Rhesus) jsou krevně skupinové antigeny kódovány přímo příslušnými geny. Gen H kóduje transferázu, jež připojuje fukózu ke galaktóze základní substance a tímto způsobem je utvářen H antigen⁽⁴⁾.

Antigeny A a B jsou koncové sacharidy glykoproteinů (65-75%) a glykolipidů (25-35%) erythrocytární membrány. Přítomnost sacharidu N-acetylgalaktozaminu (GalNac) určuje skupinu A, D-galaktózy (Gal) skupinu B a L-fukózy (Fuc)

skupinu 0^(13, 14).

1.4.1.1 Podskupiny

Antigeny A a B se nevyskytují na všech erythrocytech ve stejné antigenní síle a kvalitě. Je známo několik kvalitativně a kvantitativně odlišných druhů antigenu A i B, které označujeme jako podskupiny⁽¹⁵⁾.

Nejvýznamnějšími podskupinami krevní skupiny A jsou A₁ a A₂. Ostatními, méně známými a méně častými podskupinami jsou A₃, A_m, A_x, A_{end}, A_{int} a A_{el}. Zhruba 80% lidí s krevní skupinou A má fenotyp A₁ a téměř 20% má fenotyp A₂. Shodné procentuální zastoupení se vyskytuje rovněž u podskupin A₁B a A₂B. Velmi silný enzym A₁ mění prakticky všechny prekurzorové H řetězce na antigeny A₁. Enzym A₂ je slabší a z toho důvodu nemění všechny prekurzory v A₂ antigeny. V důsledku toho jen a erythrocytech krevní skupiny A₁ více antigenů A₁, než A₂ antigenů na erythrocytech skupiny A₂⁽⁴⁾.

Podskupiny můžeme najít i u B antigenu, i když mnohem vzácněji, než u antigenu A. To však může být způsobeno menší četností B antigenu v populaci. Podskupiny B antigenu jsou rozdělené na B₃, B_x, B_m a B_{el}⁽¹⁴⁾.

1.4.1.2 Abnormality

Krevní skupina je od narození neměnná. Můžeme však pozorovat dočasné změny po transfuzi velkého množství krve jiné skupiny, nebo trvalé změny po transplantaci kostní dřeně od dárce jiné krevní skupiny. Ke změně krevní skupiny může dojít i za různých patologických stavů (např. bakteriální infekce)⁽¹³⁾.

Získaný B antigen

U lidí s krevní skupinou A mohou některé bakteriální infekce způsobit přítomnost antigenu, který připomíná antigen B. Poněvadž tito lidé nemají genetický znak pro B antigen, nazývá se tento B antigen získaný. Poté, co bakterie způsobující původ získaného B antigenu vymizí ze střeva, zmizí i získaný B antigen.

H deficitní fenotyp

Ve velice vzácných případech chybí u lidí H alela. Ti nemohou produkovat H

substanci a v důsledku toho nedojde k expresi AB0 antigenů, přestože jsou přítomny A nebo B alely. První případ byl objeven ve městě Bombay v Indii, a proto je H deficitní fenotyp často nazýván Bombay fenotyp či krevní skupina Bombay. Bombay erythrocyty se podobají erythrocytům krevní skupiny 0, až na to, že neobsahují žádný antigen H. Tito jedinci produkují protilátky anti-H, anti-A i anti-B, a proto může být k transfuzi použita pouze krev s Bombay fenotypem, neboť aloprotilátka anti-H prakticky vždy způsobí akutní hemolytickou potransfuzní reakci ⁽⁴⁾.

V Evropě se Bombay fenotyp vyskytuje zhruba u 1 z 1 000 000. V Indii je jeho výskyt mnohem větší, zde můžeme tuto abnormalitu najít u 1 z 10 000 a na Tchaj-wanu dokonce u 1 z 8000 ⁽¹⁶⁾. Největší frekvence Bombay fenotypu je na ostrově Réunion v Indickém oceánu ⁽¹⁷⁾.

Fenotyp Cis AB

Obvykle jsou u krevní skupiny AB A a B alely umístěné na odlišném chromozomu příslušného chromozomového páru. Alely jsou umístěné naproti sobě a pouze jedna z nich je předána dítěti. Tato pozice se nazývá trans. U Cis AB fenotypu jsou alely A a B umístěné v cis pozici, a to vedle sebe na stejném chromozomu a obě alely se dědí současně ⁽⁴⁾.

1.4.2 Protilátky systému AB0 (H)

Protilátky (aglutininy) jsou látky bílkovinné povahy obsažené v krevní plazmě, které jsou schopné shlukovat krvinky odpovídajících antigenů (aglutinogenů). Síla shlukovací schopnosti protilátek je dána jejich titrem.

1.4.2.1 Pravidelné (přirozené) protilátky

Pravidelné protilátky jsou vrozené, což jsou protilátky, s kterými se člověk narodí, nebo které se bez vnějších vlivů vytvoří do jednoho roku po narození a jsou po celý život obsažené v krevním séru. Pravidelnými protilátkami jsou protilátky AB0 systému, které jsou obsažené v séru všech jedinců příslušné krevní skupiny. Takovými protilátkami jsou u člověka anti-A (alfa) a anti-B (beta). Při nekompatibilní transfúzi jsou zodpovědné za hemolýzu transfundovaných erythrocytů. Přirozené protilátky

obvykle patří do třídy IgM a optimálně reagují při teplotách nižších než 37°C.

1.4.2.2 Nepravidelné (získané) protilátky

Získané protilátky vznikají na základě antigenního podmětu, kterým může být krevní transfuze, těhotenství nebo transplantace orgánu. Protilátky vznikající imunizací se řadí do třídy IgG. Mezi nepravidelné protilátky patří i protilátky všech ostatních krevních skupinových systémů^(4, 11).

1.4.2.3 Kompletní a inkompletní protilátky

Podle serologických vlastností dále dělíme protilátky na kompletní a inkompletní.

Kompletní protilátky jsou schopné aglutinovat erythrocyty suspendované v solném prostředí přímo. Jejich velikost (900 kDa) umožňuje překonat vzdálenost mezi erythrocyty. Obvykle patří k IgM protilátkám a nemohou procházet placentou.

Inkompletní protilátky jsou mnohem menší (150 kDa) a nedokáží vyvolat přímou aglutinaci. K její zajištění potřebují *in vivo* podporu. Inkompletní protilátky patří k IgG protilátkám a mohou procházet placentou.

1.4.2.4 Klinický význam protilátek

Rozpoznávání erythrocytárních protilátek je důležité vzhledem k tomu, že mohou vyvolat hemolýzu erythrocytů nesoucích příslušné antigeny. Důsledkem toho jsou tyto tři nežádoucí komplikace.

(Pozdní) hemolytická transfuzní reakce

Pokud je příjemci podána transfuze nekompatibilní krve, tak protilátky namířené proti dárcovským antigenům způsobí těžkou hemolytickou potransfuzní reakci.

Hemolytické onemocnění novorozenců (HON)

V tomto případě si žena vytvoří IgG protilátky proti erythrocytům plodu, které projdou placentou a následně destrukují jeho erythrocyty.

Autoimunitní hemolytická anémie (AIHA)

Zde nastává autoimunitní reakce, kterou způsobí protilátky namířené proti antigenům vlastních erytrocytů ⁽⁴⁾.

Tabulka 1: ABO systém

ABO skupina	Antigeny na erytrocytech	Protilátky v séru	Genotyp
0	Žádné	anti-A, anti-B	0/0
A	A	Žádné	A/A nebo A/0
B	B	anti-A	B/B nebo B/0
AB	AB	anti-B	A/B

Zdroj: Daniels (2002)⁽¹⁴⁾

1.5 Skupinový systém MNS

Skupinový systém MNS vlastně zahrnuje dva oddělené systémy: systém MN a systém Ss⁽⁴⁾. Lansteiner a Levina v roce 1927 objevili pomocí králíčích sér skupiny M a N⁽¹⁵⁾. Až dvacet let poté byla popsána protilátka anti-S a anti-s dokonce za další čtyři roky. Gen kódující alely M a N je těsně poután s genem kódujícím S a s alely. Oba geny leží na 4. chromozomu tak blízko sebe, že mezi alelami nedochází ke crossing overu⁽⁴⁾.

1.5.1 Antigeny systému MNS

Systém MNS zahrnuje 43 antigenů: MNS1 – MNS43⁽¹⁴⁾. Nejznámějšími antigeny jsou M, N, S, a s. Antigeny jsou umístěné na sialoglykoproteinech glykoforinu A a B. Antigeny MN jsou umístěné na glykoforinu A. Antigeny Ss se nacházejí na glykoforinu B⁽¹³⁾.

Glykoforiny obsahují značné množství kyseliny sialové, jež přispívá k tvorbě negativního povrchového náboje na membráně erytrocytů.

Glykoforiny A a B mohou sloužit jako receptory pro cytokiny, bakterie a viry. Jedinci, kterým chybí glykoforin A nebo B, mají erytrocyty odolné vůči invazi parazita *Plasmodium falciparum*, který u lidí způsobuje malárii⁽¹⁸⁾.

Antigeny M, N, S, a s mohou být určeny už v časném stádiu fetálního vývoje a při narození jsou antigeny zcela vyvinuty⁽⁴⁾.

Tabulka 2: Frekvence nejdůležitějších MNS antigenů

Antigeny	Frekvence u kavkazské populace (%)	Frekvence u černošské populace (%)
M	78	73,8
N	72	75
S	52	31
s	90	93

Zdroj: Engelfriet (2003)⁽⁴⁾

1.5.2 Protilátky systému MNS

Anti-M, anti-N

Anti-M protilátky náleží k IgM a IgG protilátkám. Anti-N mají většinou charakter IgM protilátek, ale v některých případech se mohou vyskytovat IgG anti-N protilátky. Protilátky anti-M a anti-n neváží komplement a nejsou považovány za příčinu hemolytické transfúzní reakce, i když ve vzácných případech došlo v důsledku anti-M k pozdní transfúzní reakci^(4, 19). Jestliže protilátky patří do třídy IgG, mohou způsobit hemolytické onemocnění novorozenců.

Enzymy (např. papain, bromelin a trypsin) mohou odstranit část glykoforinu A, na kterém jsou umístěny antigeny M a N. V důsledku toho nejsou na erythrocytech detekovatelné. Z toho důvodu nelze protilátky anti-M a anti-N rozpoznávat pomocí krvinek ošetřených enzymem. Mohou být diagnostikovány pomocí solného a nepřímého antiglobulinového testu.

Anti-S, anti-s

Protilátky anti-S a anti-s jsou převážně získané a jsou v tom případě IgG třídy. Mohou však být i přirozeně se vyskytující, a tedy IgM třídy. Obě protilátky mohou způsobit jak hemolytickou transfúzní reakci, tak hemolytické onemocnění novorozenců.

Antigen s se v populaci vyskytuje ve značné frekvenci, a z toho důvodu se protilátka anti-s nachází vzácně. Protilátky anti-S i anti-s jsou detekovatelné pomocí nepřímého antiglobulinového testu.

Anti-U

Protilátka anti-U je téměř vždy IgG protilátka a může způsobit těžkou potransfúzní reakci a hemolytické onemocnění novorozenců. Nejlépe se určuje pomocí nepřímého antiglobulinového testu⁽⁴⁾.

1.6 Skupinový systém P

Tento skupinový systém objevili Landsteiner a Levine při práci s krevními skupinami M a N v roce 1927.

1.6.1 Antigeny systému P

Rozeznáváme antigeny P_1 , P, P_k a p. V běžné praxi se vyšetřuje pouze antigen P_1 , který se nachází asi u 80% lidí. Antigeny P systému jsou docela slabé a jen zřídka vyvolají imunizaci ⁽¹⁵⁾.

1.6.2 Protilátky systému P

Protilátky anti- P_1 jsou chladové IgM protilátky, které se určují solným testem. Aglutinační reakce může být posílena enzymy. Nezpůsobují hemolytické onemocnění novorozenců ⁽⁴⁾.

1.7 Skupinový systém Rhesus

Skupinový systém Rhesus objevili v roce 1940 Landsteiner a Wiener při práci s erythrocyty opice *Macaca Rhesus* ⁽⁴⁾. Ze všech krevních systémů, zahrnuje Rhesus systém nejvíce antigenů. V současné době známe přes 50 antigenů tohoto systému ⁽¹⁴⁾. Nejdůležitějšími antigeny jsou D, C, c, E, e a C^W. Jednotlivé antigeny se navíc mohou vyskytovat ve variantních a zeslabených formách ⁽¹³⁾.

Rhesus systém zahrnuje dva úzce propojené geny: RHD a RHCE. Oba geny jsou umístěné na 1. chromozomu. Oba geny jsou úzce propojené a obvykle se dědí společně ⁽⁴⁾.

Proteiny Rhesus systému jsou tvořeny polypeptidovým řetězcem z 417 aminokyselin, který dvanáctkrát prostupuje erythrocytární membránu. Na vnější straně membrány utváří šest smyček, na kterých jsou lokalizovány vlastní Rhesus antigeny.

1.7.1 Antigeny Rhesus systému

Rhesus antigeny jsou exprimovány pouze na buňkách erytroidní linie. Na fetálních erythrocytech jsou prokazovány již od šestého týdne těhotenství. Nejspíše jsou zapojené do membránového transportu amoniaku.

Antigen D

Antigen D je hlavním a nejdůležitějším antigenem tohoto systému. Je to soubor řady epitopů povrchové části RhD proteinu. D epitop je tvořen jedinečně prostorově seskupenými 3-5 aminokyselinami. Nyní rozeznáváme více než 30 různých D epitopů.

Velmi silná imunogenicitá D antigenu spočívá v tom, že u D negativních jedinců chybí celý RhD protein a mají jenom RhCcEe proteiny. Ty se od RhD proteinu liší 31-35 aminokyselinami. Z tohoto důvodu imunitní systém D negativních jedinců dobře rozpoznává D pozitivní erythrocyty.

Zhruba 85% kavkazské populace má fenotyp D+ (Rh pozitivní) a 15% má fenotyp D- (Rh negativní).

Slabé D antigeny

RHD geny s bodovými mutacemi způsobí substituci aminokyselin v intramembranózní a intracelulární části RhD proteinu. Počet jeho kopií na membráně erytrocytu se sníží kvůli poruše jeho zabudování do Rh komplexu. Extramembranózní část RhD proteinu zůstává nezměněna.

Variantní D antigeny

Změny RHD genu způsobí rozdílné uspořádání extramembranózní části RhD proteinu. To zapříčiní ztrátu některých D epitopů. RHD gen může být změněn dvěma způsoby. Buďto můžou bodové mutace způsobit změnu aminokyselin v polypeptidovém řetězci, nebo rekombinací mezi RHD a RHCE geny dojde ke vzniku hybridního genu, který kóduje hybridní protein.

Antigeny C/c a E/e

Antigeny C, c, E a e jsou výrazně méně imunogenní než antigen D. Imunogenita Rhesus antigenů se snižuje v následujícím pořadí: $D > c > E > C > e$ ⁽⁴⁾.

Základním rozdílem mezi antigeny C a c je substituce aminokyselin serin (antigen C) a prolin (antigen c) na 103. pozici lokalizované na druhé extramembranózní smyčce RhCcEe proteinu. Rozdíl mezi antigeny E a e spočívá v substituci aminokyselin prolin (antigen E) a alanin (antigen e) na 226. pozici lokalizované na čtvrté extramembranózní smyčce RhCcEe proteinu.

S mimořádně vyšší frekvencí se v České republice vyskytuje antigen C^W. U kavkazské populace se vyskytuje s frekvencí 2%, ale v České republice až s 4-6% četností ⁽¹³⁾.

1.7.2 Protilátky systému Rhesus

Protilátky proti Rhesus antigenům jsou téměř výhradně vytvářeny imunizací následkem těhotenství nebo krevní transfuze. Obvykle patří k IgG protilátkám. Mohou být příčinou hemolytického onemocnění novorozenců nebo opožděné hemolytické potransfuzní reakce. Optimálně aktivní jsou při 37°C a nevážou komplement. Nejlépe se určují antiglobulinovým testem nebo krvinkami ošetřenými enzymem (např. papainem

nebo bromelinem).

Většina Rhesus protilátek má specifitu anti-D, neboť D antigen je nejvíce imunogenní. Anti-C protilátka se téměř nikdy nevyskytuje bez přítomnosti anti-D nebo anti-e protilátek. Anti-E protilátka se nachází u Rhesus pozitivních i Rhesus negativních osob. Někdy se anti-E protilátky mohou vyskytovat i bez předchozí imunizace. Anti-c protilátky jsou namířené proti c antigenu, který je po antigenu D nejsilnějším imunogenem z Rhesus antigenů. Protilátky anti-e se zřídka kdy nacházejí jako protilátky, protože 98% kavkazské populace má e antigen. Poměrně často se vyskytují autoprottilátky s anti-e specifitou ⁽¹⁴⁾.

Nejzávažnější formu hemolytické nemoci novorozenců způsobuje anti-D. Po zavedení anti-D profylaxe a pečlivého sledování rizikových těhotenství se počet tohoto onemocnění z důvodu nekompatibility RhD snížil ⁽¹⁸⁾. Druhou nejvýznamnější protilátkou Rhesus systému je anti-c, která je také schopná způsobit závažné hemolytické onemocnění novorozenců ⁽²⁰⁾. Aloproutilátky anti-C, anti-E a anti-e jsou obvykle spojeny s mírným hemolytickým onemocněním novorozenců ^(21,22)

1.8 Skupinový systém Lutheran

Skupinový systém Lutheran objevil Callender v roce 1945. Patří sem 18 antigenů. Většina z nich se v populaci vyskytuje ve velmi vysoké frekvenci. Zkráceně se systém Lutheran nazývá Lu.

1.8.1 Antigeny systému Lutheran

Nejvýznamnějšími antigeny tohoto systému jsou Lu^a a Lu^b . Gen Lutheran je umístěn na 19. chromozomu. Výskyt antigenu Lu^a je velmi nízký, naproti tomu výskyt antigenu Lu^b je mnohem vyšší. Jen 0,2% populace je Lu^b negativních, teda s genotypem Lu^aLu^a . Antigeny Lu^a a Lu^b nejsou při narození zatím úplně vyvinuty⁽⁴⁾.

Tabulka 3: Frekvence Lu^a a Lu^b fenotypů

Genotyp	Fenotyp	Frekvence u kavkazské populace (%)	Frekvence u černošské populace (%)
Lu^aLu^a	Lu^{a+b-}	0,2	0,2
Lu^aLu^b	Lu^{a+b+}	7,4	5,2
Lu^bLu^b	Lu^{a-b+}	92,4	94,6
LuLu	Lu^{a-b-}	prakticky 0	prakticky 0

Zdroj: Engelfriet (2003)⁽⁴⁾

1.8.2 Protilátky systému Lutheran

Protilátky anti- Lu^a a anti- Lu^b se vyskytují ve formě přirozených IgM protilátek a rovněž i ve formě získaných imunních IgG protilátek. Protilátky mohou být detekovány pomocí solného a nepřímého antiglobulinového testu⁽⁴⁾.

Anti- Lu^a

Anti- Lu^a imunní protilátky jsou velmi vzácné, antigen Lu^a je velmi slabý. Při 22°C protilátky reagují silněji než při 37°C. Nejsou známy případy, kdy by anti- Lu^a protilátky způsobily hemolytické onemocnění novorozenců nebo hemolytickou

potransfuzní reakci.

Anti Lu^b

Protilátky anti-Lu^b reagují při 37°C stejně jako při 22°C. Je těžké sehnat pro lidi s protilátkou anti-Lu^b kompatibilní krev k transfuzi, protože zhruba 99,8% populace má Lu^b pozitivní erytrocyty. Mohou způsobit jak hemolytickou potransfuzní reakci, tak hemolytické onemocnění novorozenců⁽²³⁾.

1.9 Skupinový systém Kell

Skupinový systém Kell objevil Coombs v roce 1946 a pojmenoval ho podle pacientky (paní Kelleherové) u které protilátky anti-Kell způsobily hemolytické onemocnění jejího novorozeného dítěte ⁽¹⁸⁾ Podstatu systému Kell tvoří tři geny na 7. chromozomu ⁽⁴⁾.

1.9.1 Antigeny systému Kell

Systém Kell má 27 antigenů: KEL1 – KEL27. Do klinicky významných patří K (KEL1), k (KEL2), Kp^a (KEL3), Kp^b (KEL4), Js^a (KEL6) a Js^b (KEL7). Těchto 6 antigenů se liší v jedné aminokyselině extramembranózní části Kell glykoproteinu⁽¹³⁾. Kell glykoprotein je membránový protein s ektodoménou, která se skládá ze dvou oblastí. Z proximální endopeptidázové domény se zinkem a více variabilní distální domény ⁽²⁴⁾.

Kromě AB0 a Rhesus antigenů D, c a E je K antigen nejvíce imunogenním skupinovým antigenem. Antigeny K a k jsou přítomné už u desetitýdenních plodů a jsou prokazatelné ve velmi časném stádiu těhotenství ⁽⁴⁾.

S 99,9% četností se v populaci vyskytuje Kp^b antigen. Získání kompatibilního materiálu na krevní transfuzi u anti-Kp^b pacientů může být extrémně náročné. Při léčbě hemolytického onemocnění novorozenců je často jediným možným způsobem použití mateřské krve ⁽²⁵⁾.

Js^b je antigen s mnohem větší frekvencí výskytu, než antigen Js^a.

Velmi vzácně se vyskytují jedinci, kteří nemají na erytrocytech detekovatelné žádné antigeny Kell systému, s genotypem K₀. Vytvářejí protilátky proti Kell antigenům a jejich sérum následně reaguje s erytrocyty prakticky veškerých dárců. Proto musí při transfuzi dostat krev pouze od dárce se stejným genotypem ⁽⁴⁾.

V poslední době bylo zjištěno, že Kell antigeny nejsou omezené pouze na buňky erytroidního původu, ale že jsou vyjádřeny i na myeloidních tkáních ⁽²⁶⁾. V malém množství jsou Kell antigeny vyjádřeny i na lymfatických orgánech, srdečním a kosterním svalstvu a na buňkách nervového systému ⁽¹⁶⁾.

Tabulka 4: Frekvence nejdůležitějších Kell antigenů

Antigen	Frekvence u kavkazské populace (%)	Frekvence u černošské populace (%)
K	9	2
k	99,8	100
Kp ^a	2,3	0
Kp ^b	100	100
Js ^a	0,01	20
Js ^b	100	99

Zdroj: Engelfriet (2003) ⁽⁴⁾

1.9.2 Protilátky systému Kell

Protilátky proti Kell antigenům patří obvykle do třídy IgG, tvoří se po transfuzi nebo těhotenství a mohou zapříčinit hemolytickou potransfuzní reakci či hemolytické onemocnění novorozence.

Protilátky proti antigenům s vysokou frekvencí výskytu (anti-k, anti-Kp^b a anti-Js^b) stěžují vzhledem k malému počtu dárců výběr vhodného kompatibilního materiálu k transfuzi.

Protilátky Kell systému se nejlépe prokazují pomocí nepřímého antiglobulinového testu.

1.10 Skupinový systém Lewis

Skupinový systém Lewis je patrně jediným krevně skupinovým systémem, jehož antigeny se nevytvářejí na erytrocytární membráně. Zkráceně se Lewis systém nazývá Le. Existuje těsný vztah Lewis systému s AB0 (H) a P systémy⁽⁴⁾.

1.10.1 Antigeny systému Lewis

Antigeny Lewis systému jsou sacharidy vázané na solubilní glykolipidy přítomné ve slinách a v plasmě. Druhotně jsou naadsorbovány na erytrocytární membránu z plasmy. Systém Lewis má dva základní antigeny: Le^a (LE1) a Le^b (LE2). Ty jsou produkty nepřímého Le genu FUT3 na 19. chromozomu⁽¹³⁾.

1.10.2 Protilátky systému Lewis

Lewis protilátky jsou přirozené IgM protilátky. Anti-Le^a je relativně častá protilátka, která může způsobit těžkou hemolytickou potransfuzní reakci. Protilátka anti-Le^b je méně nebezpečná a hemolytickou reakci způsobuje ve vzácných případech. Protilátky Lewis systému nejlépe reagují v solném prostředí při 22°C. Hemolytické onemocnění novorozenců nezpůsobují, protože všichni novorozenci mají fenotyp Le^{a-b} a antigeny se tvoří až po narození⁽²³⁾.

1.11 Skupinový systém Duffy

Skupinový systém Duffy byl objeven v roce 1950 Cutbushem a byl pojmenován po prvním pacientovi. Zkrácený název je Fy. Duffy glykoprotein sedmkrát prostupuje erytrocytární membránu a má extracelulární N-terminální doménu a cytoplazmatickou C-terminální doménu ⁽¹⁸⁾.

1.11.1 Antigeny systému Duffy

Do systému Duffy je zahrnuto šest antigenů: Fy^a, Fy^b, Fy3, Fy4, Fy5 a Fy6. Nejdůležitějšími z nich jsou Fy^a a Fy^b. Gen pro systém Duffy je umístěn na 1. chromozomu, kde je umístěn i gen pro Rhesus systém.

Frekvence výskytu Duffy antigenů se v populaci poměrně dost liší. U čínské populace se antigen Fy^a vyskytuje v 99,7%, ale u černošské populace je to jen 10%.

Antigeny Fy^a a Fy^b jsou při narození již plně vyvinuty a mohou být identifikovány už u šestitýdenních plodů.

Malariční paraziti *Plasmodium vivax* a *Plasmodium knowlesi* pronikají do erytrocytů přes Fy^a a Fy^b antigeny. Jedinci s genotypem Fy^{a-b-} jsou vůči těmto parazitům rezistentní ⁽⁴⁾.

Tabulka 5: Frekvence Fy^a a Fy^b genotypů a fenotypů

Genotyp	Fenotyp	Frekvence u kavkazské populace (%)	Frekvence u černošské populace (%)
Fy ^a Fy ^a	Fy ^{a+b-}	17	9
Fy ^a Fy ^b	Fy ^{a+b+}	49	1
Fy ^b Fy ^b	Fy ^{a-b+}	34	22
FyFy	Fy ^{a-b-}	prakticky 0	68

Zdroj: Engelfriet 2003⁽⁴⁾

1.11.2 Protilátky systému Duffy

Duffy protilátky jsou obvykle IgG. Mohou způsobit jak hemolytickou potransfuzní reakci, tak hemolytické onemocnění novorozenců. Detekují se pomocí nepřímého antiglobulinového testu. Většina nelze prokázat diagnostickými erythrocyty ošetřenými enzymem, protože působením enzymu dojde k odstranění důležitých Duffy antigenů z krvinek⁽⁴⁾.

1.12 Skupinový systém Kidd

Skupinový systém Kidd objevil v roce 1951 Allen a byl pojmenován po první pacientce, u které byl nalezen. Kidd glykoprotein desetkrát prostupuje erytrocytární membránu a vykonává funkci transportéru močoviny ⁽¹³⁾. Zkráceně se Kidd systém nazývá Jk ⁽⁴⁾.

1.12.1 Antigeny systému Kidd

Gen systému Kidd je umístěn na 18. chromozomu a má tři alely: Jk^a, Jk^b a Jk. Alela Jk je tichá a nekóduje žádný antigen ⁽⁴⁾. Antigeny Jk^a a Jk^b se od sebe liší v jedné aminokyselině v extramembranózní části Kidd glykoproteinu ⁽¹³⁾.

Kromě antigenů Jk^a a Jk^b se vyskytuje ještě antigen Jk3. Ten je přítomný u všech jedinců, kteří mají Jk^a nebo Jk^b antigen.

Kidd antigeny se vyskytují již v časném stádiu vývoje plodu a při narození jsou dobře vyvinuty. Kidd antigeny jsou méně imunogenní, než antigeny AB0, Rhesus a Kell systému ⁽⁴⁾.

Tabulka 6: Frekvence Jk^a a Jk^b genotypů a fenotypů

Genotyp	Fenotyp	Frekvence u kavkazské populace (%)	Frekvence u černošské populace (%)
Jk ^a Jk ^a	Jk ^{a+b-}	26,3	51,1
Jk ^a Jk ^b	Jk ^{a+b+}	50,3	4,8
Jk ^b Jk ^b	Jk ^{a-b+}	23,4	8,1
JkJk	Jk ^{a-b-}	prakticky 0	prakticky 0

Zdroj: Engelfriet (2003) ⁽⁴⁾

1.12.2 Protilátky systému Kidd

Protilátky systému Kidd obvykle patří do třídy IgG, ale mohou se vyskytovat i v IgM třídě. V podstatě vždy váží komplement ⁽⁴⁾. Jsou nejčastější příčinou pozdní hemolytické potransfuzní reakce. Velmi vzácně mohou být příčinou těžké hemolytické reakce či závažné formy hemolytického onemocnění novorozenců ⁽¹³⁾.

Koncentrace Kidd protilátek se může náhle snížit až pod úroveň jejich detekce a nemusí být rutinním screeningem zjištěny. Nejlépe se protilátky Kidd detekují pomocí nepřímého antiglobulinového testu: PEG-NAT, LISS-NAT a enzym-NAT.

Osoby s protilátkami anti-Jk3 mohou dostat krevní transfuzi pouze od dárců s fenotypem Jk^{a-b-} ⁽⁴⁾.

1.13 Laboratorní metody používané k určování krevně skupinových protilátek

Nejvhodnější metoda k určování protilátek proti erytrocytům je založena na aglutinaci. Pokud byly erytrocyty senzibilizovány protilátkami, pak dochází k jejich aglutinaci, která je pozorovatelná pouhým okem. U protilátek třídy IgM dochází k aglutinaci přímo. K detekci protilátek třídy IgG je potřeba použít nepřímou metodu, neboť protilátky třídy IgG krvinky sice senzibilizují, ale neaglutinují. Aby došlo k aglutinaci, tak je potřeba přidat další substanci (např. antiglobulinové sérum).

To, jestli dojde mezi erytrocyty k přímé nebo nepřímé aglutinaci, spočívá ve vzdálenosti, kterou mezi sebou mají. Bílkoviny v erytrocytární membráně mají negativní elektrický náboj. Ve vodných roztocích se kolem krvinek vytvoří obal s pozitivně nabitými ionty a dochází k rozdílu potenciálu mezi kationty v médiu a záporně nabitými erytrocyty. Tento potenciál je nazýván zeta potenciálem. Erytrocyty mají stejný náboj a navzájem se odpuzují. Udržují si mezi sebou vzdálenost zhruba 16 nm.

Kompletní (IgM) protilátky, o velikosti 30 nm, jsou schopny vzdálenost mezi erytrocyty přemostit, díky tomu, že jsou jejich Fab části daleko od sebe. Přímou aglutinaci způsobují pouze tyto protilátky, a proto se nazývají kompletní, neboli aglutininy. Aglutininy erytrocyty aglutinují v každé situaci, i v solném roztoku.

Inkompletní (IgG) protilátky jsou menší. Erytrocyty sice senzibilizují, ale nejsou schopny vzdálenost mezi nimi přemostit. Rozpětí mezi Fab částmi je menší než 16 nm a ty se nedokáží připojit ke dvěma erytrocytům. K určení těchto protilátek *in vivo* musíme použít podpůrné prostředky. K tomu, aby došlo k aglutinaci erytrocytů senzibilizovaných inkompletními protilátkami, lze použít dvou způsobů. Můžeme omezit vodní plášť s iontovým oblakem kolem erytrocytů a tím zmenšit vzdálenost mezi erytrocyty. Nebo můžeme spojit protilátky na senzibilizovaných erytrocytech protilátkami proti lidskému IgG a IgG protilátky mezi sebou vytvoří můstek.

Existují ale i výjimky. IgG protilátky proti antigenům A a B mohou v solném roztoku vést k aglutinaci. To je dáno tím, že antigeny AB0 systému jsou umístěné na glykoproteinech vyčnívajících z erytrocytární membrány. Vzdálenost mezi A nebo B antigeny je tak kratší, než vzdálenost mezi membránami těchto erytrocytů. Dalším

důvodem je, že počet antigenů je na membráně značně vysoký a jakmile je navázán vysoký počet IgG molekul, může nastat aglutinace.

1.13.1 Redukce vodního pláště a iontového oblaku kolem erytrocytů

Vnitřní část vodního pláště má pozitivní náboj. Vnější negativní oblak je difuzní. Potenciál, který se zde nachází, nazýváme zeta potenciálem. Pokud zeta potenciál klesne, erytrocyty se k sobě mohou přiblížit a inkompletní protilátky jsou schopné aglutinace. Toho lze dosáhnout použitím následujících roztoků:

Albumin

Albumin je bipolární polymer a po jeho přidání do suspenze erytrocytů se změří jejich povrchový náboj. Albuminové molekuly nahradí pozitivní molekuly vody a k erytrocytární membráně se bude fixovat méně pozitivních částic. Dojde k poklesu zeta potenciálu a zmenší se vzdálenost mezi erytrocyty. Obvykle se používá 22% roztok albuminu v kombinaci s antiglobulinovým testem.

Polybren

Pozitivně nabitě molekuly polybrenu reagují s negativním nábojem na povrchu erytrocytů a podporují aglutinaci tím, že vytváří můstky mezi erytrocyty. Pokud je polybren přidán ve vysoké dávce, tak erytrocyty agregují spontánně. Nejde však o antigen-protilátkovou reakci. Inkompletní protilátky mohou v přítomnosti polybrenu reagovat s antigenní determinantou dvou různých erytrocytů. Přidáním roztoku citrátu sodného zabráníme nespecifické agregaci způsobené polybrenem. Aglutinace erytrocytů se udrží pouze v případě, že jsou erytrocyty navzájem propojené inkompletními protilátkami. Polybren se často používá s antiglobulinovým sérem.

Proteolytické enzymy

Proteolytické enzymy odstraňují některé glykoproteiny erytrocytární membrány. Ty obsahují cukerné řetězce s negativně nabitými skupinami kyseliny neuraminové, které způsobují záporný náboj na povrchu erytrocytů. Krvinky ošetřené enzymem mají nižší záporný náboj a zmenší se vzdálenost mezi nimi a IgG protilátky poté mohou tuto vzdálenost přemostit. K těmto účelům se používají enzymy papain, bromelin či ficin.

Nevýhodou je, že enzymy odstraní i proteiny s krevně skupinovými antigeny

např. Duffy a MNS systému. Z toho důvodu se protilátky proti těmto antigenům nedají určit pomocí krvinek ošetřených enzymem. Pomocí krvinek ošetřených enzymem se určují Rhesus, Kidd a Lewis protilátky.

1.13.2 Zesílení vazby mezi antigenem a protilátkou

Zesílením vazby mezi antigenem a protilátkou pomůžeme k lepší aglutinaci. Dosáhneme toho přidáním polyetylglykolu (PEG) nebo použitím suspenze erytrocytární suspenze s nízkou iontovou silou.

Polyetylglykol (PEG)

Polyetylglykol je ve vodě rozpustný polymer, který extrahuje vodu z jejího okolního prostředí, čímž zesiluje vazbu mezi antigenem a protilátkou a ještě zvyšuje koncentraci protilátek v séru. PEG se používá v kombinaci s antiglobulinovým testem k identifikaci významných erytrocytárních protilátek.

Snížení iontové síly v médiu

K tomu, aby se protilátky lépe vázaly k antigenu se erytrocytární suspenze připravují v solném roztoku s nízkou iontovou koncentrací (LISS – Low Ionic Strength Solution). LISS metoda se používá v kombinaci s antiglobulinovým testem, zejména ve sloupcových technikách.

1.13.3 Antiglobulinový test: vzájemné propojení protilátkových molekul

Jestliže jsou erytrocyty senzibilizovány IgG protilátkami, tak mohou být aglutinovány pomocí protilátek, které jsou namířené proti navázaným imunoglobulinům. Protilátky na jednotlivých erytrocytech se propojí pomocí antiglobulinových molekul v antiglobulinovém séru a dojde k aglutinaci.

Tento princip objevil v roce 1908 Moreschi. Znovu byl „objeven“ Coombsem v roce 1945. Z toho důvodu je dalším názvem pro antiglobulinový test Coombsův test.

Antiglobulinový test se provádí i pomocí protilátek proti faktorům komplementu. Antiglobulinový test je nejvýznamnější metodou k určování inkompletních protilátek. V imunoematologii se využívají dva typy antiglobulinových testů: přímý a nepřímý.

Přímý antiglobulinový test (PAT)

Přímý antiglobulinový test se používá k detekci senzibilizovaných erytrocytů *in vivo*. PAT je používán ke studiu autoimunitních hemolytických anémií, hemolytického onemocnění novorozenců a k určení příčiny hemolytické potransfuzní reakce.

V případě PAT testu se k patientským erytrocytům přidává pouze antiglobulinové sérum. Není potřeba přidávat další potenciátor (albumin, PEG) nebo LISS, protože erytrocyty už jsou senzibilizovány protilátkami.

Nepřímý antiglobulinový test (NAT)

Nepřímý antiglobulinový test se používá k detekci protilátek v séru, které jsou navázané na diagnostické erytrocyty *in vivo*. Používá se k průkazu erythrocytárních protilátek při screeningu protilátek, v křížovém pokusu a při identifikaci protilátek.

NAT probíhá ve třech fázích. V první fázi se inkubují diagnostické erytrocyty s patientským sérem. Pokud jsou v séru přítomny protilátky, tak se navážou na erytrocyty. Optimální inkubační teplotou IgG protilátek je 37°C.

Ve druhé fázi se erytrocyty promyjí, aby se odstranily nenavázané imunoglobuliny. Tím zabráníme falešně negativní reakci, kdy by nenavázané imunoglobuliny reagovali s antiglobulinovými molekulami a tím neutralizovali antiglobulinové sérum.

Ve třetí fázi se přidá antiglobulinové sérum, které obsahuje protilátky proti lidskému IgG. Tyto protilátky se naváží na IgG molekuly na erythrocytech. Vytvoří přemostění mezi erythrocyty a následnou aglutinaci.

Citlivost testu může být zvýšena přidáním anti-komplementových protilátek do antiglobulinového séra. Antiglobulinové sérum obsahující jak anti-komplementovou složku, tak anti-IgG se nazývá polyspecifické antiglobulinové sérum. To se používá především u antiglobulinového testu v solném roztoku, albuminu a LISS. V PEG a polybrenové metodě se používá pouze monospecifické antiglobulinové sérum (neobsahuje anti-komplementovou složku, pouze IgG), jelikož anti-komplementová složka v těchto metodách vykazuje falešně pozitivní výsledky. Navíc je PEG technika tak citlivá, že IgG protilátky mohou být v PEG-NAT určeny bez anti-komplementové složky.

1.13.3.1 Aglutinační testy podle techniky provedení

Nejprve se aglutinační testy prováděly na sklíčkách, později se začaly používat zkumavky. V posledních letech došlo k rozvoji sloupcových testů, především sloupcového (gelového) aglutinačního testu, který je založen na nepřímém aglutinačním testu.

V této metodě je aglutinace senzibilizovaných erytrocytů suspendovaných v LISS dosažena v gelovém sloupci pomocí antiglobulinového séra. Diagnostické erytrocyty a pacientské sérum inkubují v inkubační části na povrchu gelu. Poté se sloupec centrifuguje. Během centrifugace erytrocyty putují gelem. Pokud jsou erytrocyty senzibilizovány, tak aglutinují s antiglobulinovým sérem, které je přítomné v gelu. Po centrifugaci zůstanou aglutináty v gelu, který má funkci síta. Nesenzibilizované erytrocyty nereagují s antiglobulinovým sérem v gelu a prostupují až na dno sloupce.

Sloupcová metoda má oproti té zkumavkové několik výhod. Tato metoda je rychlá, senzibilizované erytrocyty se nemusí promývat. Výsledky jsou dobře interpretovány a mohou být znovu posouzeny i později.

Od konce devadesátých let se používá další typ sloupcového testu. Ten spočívá v přímé vazbě senzibilizovaných erytrocytů na gelovou matrix uvnitř sloupce. Tento systém je založen na technologii pevné fáze a je označován jako sloupcová (gelová) afinitní metoda. Imunoreaktivní fáze obsahuje protein G, anti-IgM protilátku a anti-C3d komplementovou složku. Protein G je bílkovina izolovaná z buněčné stěny Streptokoka a s vysokou afinitou váže Fc části všech čtyř podtříd lidského IgG.

Při centrifugaci zůstanou senzibilizované erytrocyty ve vrchní části sloupce. Nesenzibilizované a nedostatečně senzibilizované erytrocyty migrují ke dnu sloupce. U silně pozitivní reakce budou všechny erytrocyty adherovat k povrchu sloupce. V případě negativní reakce putují všechny erytrocyty ke dnu gelového sloupce. Čím je reakce slabší, tím více krvinek se po centrifugaci soustředí na dně sloupce ⁽⁴⁾.

2 Cíle

- I. Shrnout současné informace o screeningu protilátek u těhotných žen a vyšetření krevních skupin.
- II. Osvojit si laboratorní metody a postupy používané k vyšetření krevních skupin a k průkazu nepravidelných protilátek.
- III. Porovnání prevence a léčby hemolytického onemocnění novorozenců z ekonomického hlediska.

3 Metodika

V laboratoři Synlab czech, s.r.o. v Českých Budějovicích jsem v rámci této bakalářské práce provedla vyšetření krevních skupin, Rh systému a screening protilátek u 100 krevních vzorků od těhotných žen, které jsou do laboratoře svázeny od smluvních gynekologů. Tato vyšetření se provádí za účelem určení potencionálně rizikových těhotenství z hlediska hemolytického onemocnění novorozenců.

Preanalytická část

Pro přesný výsledek imunohematologických testů je důležitý správný odběr a transport vzorku. Podle Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č.STL2010_06 ze dne 1. 3. 2010 (Imunohematologická vyšetření v těhotenství a po porodu) musí být zkumavka před odběrem krevního vzorku označena jménem a příjmením, případně číslem pojištění. Před samotným odběrem vzorku musí být ještě ověřena totožnost jedince dotazem. Spolu se vzorkem je do laboratoře dodána řádně vyplněná žádanka, která by měla obsahovat: jméno, příjmení a číslo pojištění, zdravotní pojišťovnu, datum požadavku, diagnózu, týden těhotenství, případně informaci o profylaktickém podání imunoglobulinu anti-D (Ig anti-D).

Analytická část

3.1 Vyšetření krevních skupin

Vyšetření, která jsem v této práci použila, se provádí ze srážlivé či nesrážlivé žilní krve.

Reagencie a pomůcky použité v této práci:

- krev
- sérum
- fyziologický roztok
- Pelikloon anti-A (IgM) monoclonal (Sanquin)
- Pelikloon anti-B (IgM) monoclonal (Sanquin)
- Pelikloon anti-A,B (IgM) monoclonal (Sanquin)

- Anti-A₁ (lectin) saline method (Sanquin)
- Anti-H (lectin) method (Sanquin)
- Diagnostikum anti-A₁B monoklonální (EXBIO)
- DiaCell AB0 - A₁ (BIO-RAD)
- DiaCell AB0 - A₂ (BIO-RAD)
- DiaCell AB0 - B (BIO-RAD)
- DiaCell AB0 - 0 (BIO-RAD)
- zkumavky
- stojan na zkumavky
- Pasteurovy pipety
- laboratorní centrifuga Tehnica centric 322A

Postup vyšetření:

Nejdříve se musí krevní vzorek centrifugovat 10 minut při 3000 otáčkách za minutu, aby se oddělily krevní buňky a sérum. Z oddělených krevních buněk se připraví pomocí fyziologického roztoku 2-3% krevní náplav. Do zkumavky je s použitím Pasteurovy pipety odebrán vzorek oddělených krevních buněk při centrifugaci a zkumavka se doplní fyziologickým roztokem. Tato zkumavka se centrifuguje 5 minut při 2500 otáčkách. Její obsah se po centrifugaci slije. Na dně zkumavky zůstane usazený sediment erytrocytů. Znovu se zkumavka doplní fyziologickým roztokem a je připravený náplav, který by měl mít přibližně lososovou barvu.

Krevní skupiny se určují dvěma způsoby, pomocí diagnostických sér a typových krvinek. Pro tyto dva způsoby se vžilo označení přední a zadní řada, podle uspořádání stojanů se zkumavkami. Všechny zkumavky se předem řádně označí, aby nedošlo k záměně za jinou zkumavku a následné špatné interpretaci výsledku.

Do příslušných zkumavek se nakapou 2-3 kapky diagnostických sér Pelikloon anti-A (IgM) monoclonal, Pelikloon anti-B (IgM) monoclonal a Pelikloon anti-A,B (IgM) monoclonal. K diagnostickým sérum se přidají do zkumavky 3-4 kapky krevního náplavu a stočí se v centrifuze 1 minutu při 1500 otáčkách za minutu. Poté co se zkumavky stočí, lehce se s nimi zatřepeme a makroskopicky se odečítá výsledek.

Erytrocyty zůstanou volně rozptýlené (-), nebo při aglutinaci utvoří jeden souvislý shluk, eventuálně více velkých shluků (+).

Diagnostická séra			Krevní skupina
anti-A	anti-B	anti-AB	
+	-	+	A
-	+	+	B
+	+	+	AB
-	-	-	0

(+) aglutinace; (-) žádná aglutinace

Do dalších zkumavek se nakapou 2-3 kapky typových krvinek DiaCell AB0 – A₁, A₂, B a 0. Pomocí Pasteurovy pipety se přidají 3-4 kapky patientského séra a vše se stočí v centrifuze 1 minutu při 1500 otáčkách. Výsledek se opět odečítá makroskopicky po jemném potřepání zkumavkou.

Typové krvinky				Krevní skupina
A ₁	A ₂	B	0	
-	-	+	-	A
+	+	-	-	B
-	-	-	-	AB
+	+	+	-	0

(+) aglutinace; (-) žádná aglutinace

V případě skupin A a AB se ještě určují podskupiny. U skupiny A se k určování podskupiny používají diagnostická séra Anti-A₁ (lectin) saline method a Anti-H (lectin) saline method. U skupiny AB se k určení podskupiny používá diagnostické sérum Anti A₁B monoklonální. K diagnostickým sérum se přidají 3-4 kapky krevního náplavu a zkumavky se stočí 1 minutu při 1500 otáčkách. Toto další určení již není podle doporučení STL nutné.

Diagnostická séra		Podskupina
anti-A ₁	anti-H	
+	-	A ₁
-	+	A ₂

(+) aglutinace; (-) žádná aglutinace

Pokud dojde k aglutinaci ve zkumavce s diagnostickým sérem anti-A₁B, jedná se o podskupinu A₁B. Pokud k aglutinaci nedojde, jde o podskupinu A₂B.

3.2 Vyšetření Rh systému

Reagencie a pomůcky použité v této práci:

- krevní náplav
- Pelikloon anti-D mix (IgG/IgM) monoclonal (Sanquin)
- NOVACLONE™ Anti-D IgM+IgG (Immucor)
- Pelikloon polyspecific anti-human serum (Sanquin)
- zkumavky
- stojan na zkumavky
- Pasteurovy pipety
- laboratorní centrifuga Tehtnica centric 322A
- inkubátor vyhřátý na 37°C

Postup vyšetření:

Při určování Rh systému se do zkumavek kapou 2-3 kapky diagnostického séra Pelikloon anti-D mix (IgG/IgM) monoclonal a NOVACLONE™ Anti-D IgM+IgG. K séru se přidají 3-4 kapky krevního náplavu a vše se stočí 1 minutu při 1500 otáčkách. Výsledek se odečítá makroskopicky po potřepání zkumavkou. Pokud dojde k aglutinaci, jedinec je Rh pozitivní (Rh⁺). V případě, že nedojde k aglutinaci, jde o jedince Rh negativního (Rh⁻). U Rh negativních výsledků se provádí ověřovací dovyšetření.

Všechny Rh negativní výsledky se nechají inkubovat zhruba 15 minut při 37°C a poté se do zkumavek přidají 2-3 kapky Pelikloon polyspecific anti-human serum. Zkumavky se opět stočí 1 minutu při 1500 otáčkách a znovu se odečítá výsledek.

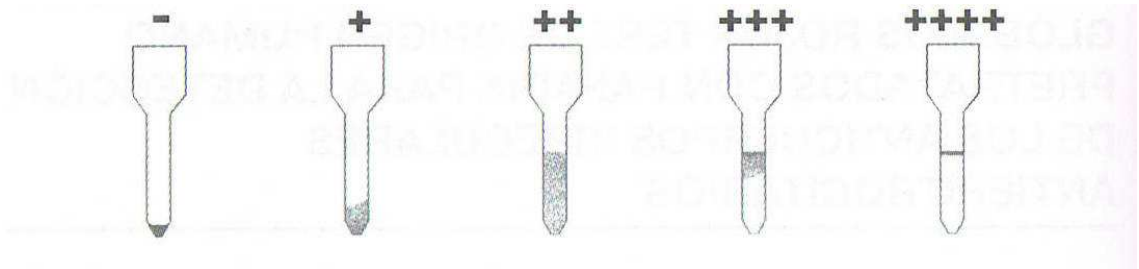
3.3 Screening protilátek

Reagencie a pomůcky použité v této práci:

- sérum
- ScanCell I, II, III (BIO-RAD)
- ScanCell IP, IIP, IIIP (BIO-RAD)
- gelové karty ScanGel Coombs+Neutral
- stojan na gelové karty
- automatická pipeta
- náhradní špičky
- centrifuga BIO-RAD ScanGel
- inkubátor BIO-RAD ScanGel

Screening protilátek se vyšetřuje nepřímým antiglobulinovým (Coombsovým) testem se třemi typy diagnostických erytrocytů a dvoustupňovým enzymatickým testem na gelovém systému ScanGel. Vyšetřovaný krevní vzorek zcentrifugujeme 5 minut při 3500 otáčkách za minutu. Půlená karta ScanGel se označí jménem nebo příslušným číslem pacienta a odstraní se hliníkový krycí proužek. Do prvních tří mikrozkušavek se napipetujeme 50 μ l suspenze diagnostických erytrocytů ScanCell I, II a III. Do zbývajících tří mikrozkušavek se napipetuje 50 μ l suspenze papainizovaných diagnostických erytrocytů ScanCell IP, IIP a IIIP. Do všech mikrozkušavek se přidá 25 μ l vyšetřovaného séra a karta se nechá inkubovat 15 minut při 37°C v inkubátoru ScanGel. Po inkubaci se karta centrifugujeme 10 minut v centrifuze ScanGel a makroskopicky se odečítá výsledná reakce (Obrázek 1).

Obrázek 1: Hodnocení výsledků sloupcové (gelové) aglutinace



Zdroj: Příbalový leták karty ScanGel Coombs+Neutral⁽²⁷⁾

4 Výsledky

V laboratoři Synlab czech, s.r.o. v Českých Budějovicích jsem vyšetřila 100 krevních vzorků od těhotných žen. U každého vzorku jsem vyšetřila krevní skupinu v AB0 systému, Rh faktor a provedla jsem screeningové vyšetření nepravidelných antierytrocytárních protilátek.

Tabulka 7: Výsledky laboratorní práce

	Jméno	Rok narození	Diagnóza	Krevní skupina	Rh faktor	Screening protilátek
1	V.M.	1984	Z 349	B	+	-
2	J.M.	1985	Z 349	A ₁	-	-
3	T.J.	1974	Z 340	B	+	-
4	Š.J.	1973	Z 359	A ₁	+	-
5	Č.M.	1973	Z 359	B	+	-
6	K.M.	1987	Z 349	A ₁	+	-
7	M.Š.	1977	Z 340	B	+	-
8	M.H.	1979	Z 349	A ₁	+	-
9	S.A.	1986	Z 359	0	+	-
10	H.K.	1982	Z 340	0	-	-
11	H.K.	1985	Z 359	0	-	-
12	K.R.	1980	Z 359	0	+	-
13	D.V.	1979	Z 340	A ₁	+	-
14	P.Š.	1991	Z 349	A ₁	+	-
15	H.B.	1971	Z 349	A ₁	+	-
16	S.Z.	1984	Z 349	0	+	-

17	M.V.	1987	Z 359	B	+	-
18	CH.L.	1987	Z 349	0	+	-
19	K.A.	1985	Z 349	A ₁	+	-
20	N.M.	1994	Z 348	B	+	-
21	V.A.	1985	Z 358	A ₁	-	-
22	V.H.	1975	Z 340	A ₁ B	-	+
23	H.E.	1982	Z 351	B	-	-
24	Ž.J.	1977	Z 350	A ₁	+	-
25	T.E.	1993	Z 358	A ₁	+	-
26	K.K.	1983	Z 348	0	-	-
27	B.J.	1981	Z 348	A ₁	+	-
28	K.V.	1984	Z 359	A ₁	+	-
29	N.M.	1973	Z 348	0	-	-
30	F.L.	1986	Z 340	0	-	-
31	Ř.M.	1992	Z 340	B	-	-
32	D.V.	1982	Z 340	A ₁	+	-
33	S.J.	1976	Z 340	0	+	-
34	K.A.	1990	Z 340	0	+	-
35	B.M.	1981	Z 348	A ₁	+	-
36	S.Ž.	1985	Z 340	A ₂	-	-
37	P.V.	1979	Z 359	0	+	-
38	K.T.	1982	Z 359	0	+	-
39	P.G.	1986	Z 359	A ₁	+	-

40	J.V.	1983	Z 349	0	+	-
41	T.Š.	1988	Z 349	A ₁ B	+	-
42	H.J.	1983	Z 358	0	+	-
43	T.P.	1986	Z 359	0	+	-
44	J.M.	1976	Z 359	B	+	-
45	K.P.	1981	Z 348	0	+	-
46	B.P.	1983	Z 348	0	+	-
47	V.V.	1978	Z 349	0	+	-
48	H.M.	1980	Z 349	A ₁	+	-
49	S.M.	1982	Z 340	A ₁	+	-
50	H.H.	1981	Z 349	0	+	-
51	F.L.	1978	Z 350	A ₁	+	-
52	S.V.	1990	Z 348	A ₁	+	-
53	R.S.	1969	Z 349	A ₁	+	-
54	K.Z.	1982	Z 349	0	-	-
55	Z.J.	1984	Z 340	0	+	-
56	M.Š.	1986	Z 358	A ₁	+	-
57	M.R.	1980	Z 340	0	+	-
58	M.D.	1985	Z 358	B	-	-
59	N.A.	1979	Z 358	B	+	-
60	J.L.	1983	Z 348	0	+	-
61	K.D.	1986	Z 348	A ₁	+	-
62	T.M.	1994	Z 340	B	+	-

63	K.J.	1982	Z 340	B	+	-
64	L.J.	1978	Z 348	B	+	-
65	L.Z.	1984	Z 340	B	+	-
66	K.M.	1981	Z 340	A ₁	+	-
67	J.K.	1992	Z 340	A ₂	+	-
68	Č.L.	1986	Z 358	0	+	-
69	Š.I.	1989	Z 340	A ₁	+	-
70	S.J.	1987	Z 349	A ₁	+	-
71	Č.B.	1980	Z 340	0	-	-
72	M.M.	1972	Z 359	B	+	-
73	P.K.	1983	Z 349	A ₁	-	-
74	V.M.	1989	Z 348	A ₁	+	-
75	K.P.	1986	Z 348	B	+	-
76	K.K.	1977	Z 359	0	-	+
77	D.R.	1984	Z 349	0	+	-
78	S.E.	1977	Z 348	0	+	-
79	J.K.	1987	Z 349	B	+	-
80	Š.M.	1992	Z 340	A ₁	+	-
81	CH.R.	1988	Z 340	0	-	-
82	M.H.	1983	Z 340	0	+	-
83	D.M.	1981	Z 349	A ₁	-	-
84	S.J.	1980	Z 358	A ₁	+	-
85	CH.K.	1986	Z 348	0	+	-

86	T.P.	1992	Z 340	A ₁	+	-
87	B.J.	1980	Z 349	A ₁	+	-
88	Č.A.	1976	Z 359	A ₁	+	-
89	L.K.	1979	Z 349	0	+	-
90	K.E.	1983	Z 348	0	+	-
91	B.B.	1982	Z 349	0	+	-
92	M.L.	1989	Z 340	0	-	-
93	K.Z.	1983	Z 359	B	+	+
94	Č.B.	1982	Z 348	B	+	-
95	Š.S.	1974	Z 349	A ₂	-	-
96	Y.M.	1986	Z 340	0	-	-
97	V.N.	1977	Z 358	A ₁	-	-
98	J.M.	1981	Z 349	B	+	-
99	K.K.	1981	Z 349	B	+	-
100	N.I.	1988	Z 340	A ₂	+	-

Zdroj: Vlastní výsledky

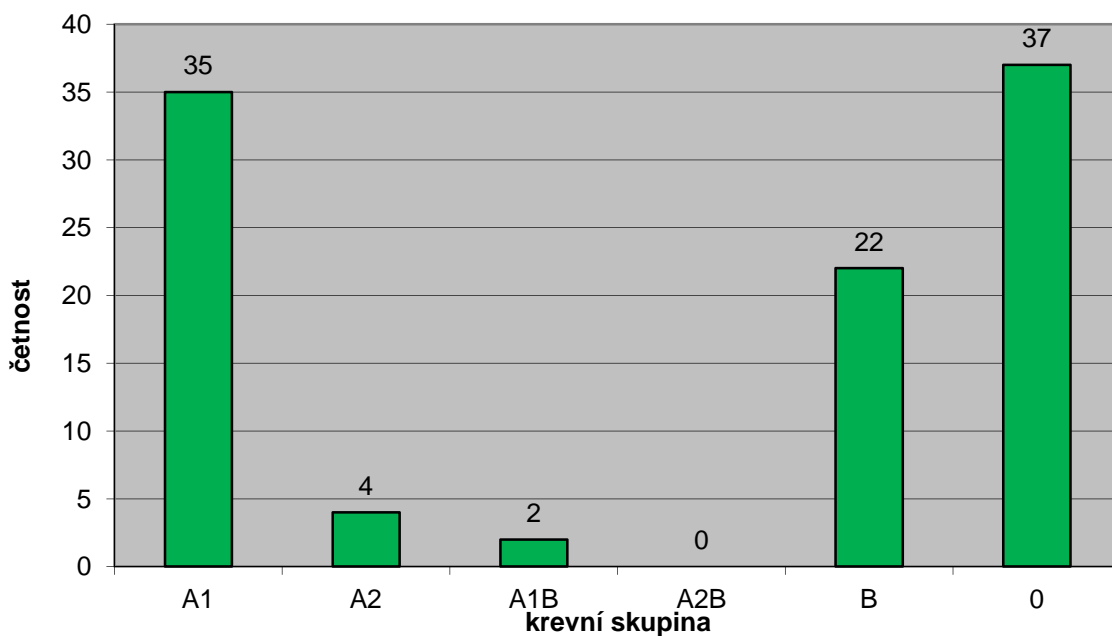
Tabulka 8: Legenda diagnóz

Z 340	Dohled nad normálním prvním těhotenstvím
Z 348	Dohled nad jiným normálním těhotenstvím
Z 349	Dohled nad normálním těhotenstvím
Z350	Dohled nad těhotenstvím s anamnézou neplodnosti
Z 351	Dohled nad těhotenstvím s anamnézou abortivního výsledku
Z 358	Dohled nad jiným vysoce rizikovým těhotenstvím
Z 359	Dohled nad jiným vysoce rizikovým (ohroženým) těhotenstvím, NS

Zdroj:<http://www.ordinace.cz/kody-diagnoz/>⁽²⁸⁾

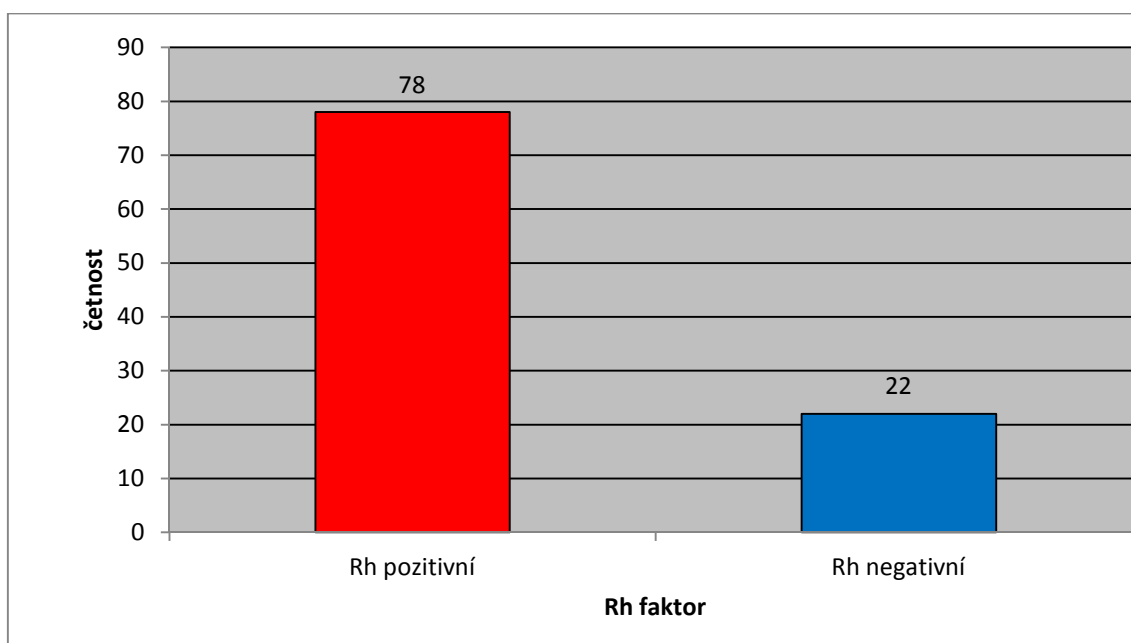
Nejčastější krevní skupinou byla skupina 0 (37). Krevní skupina A₂B nebyla ze 100 vzorků identifikována ani jedna. (Graf 1)

Graf 1: Četnost krevních skupin



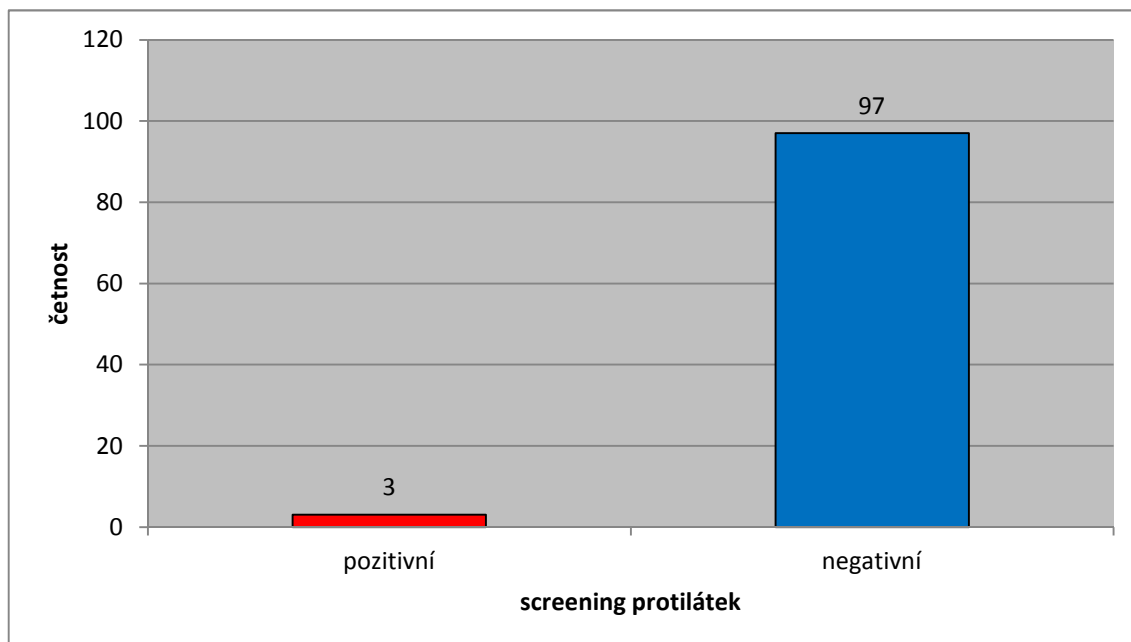
22 vzorků bylo Rh negativních a 78 vzorků bylo Rh pozitivních. (Graf 2)

Graf 2: Počet Rh pozitivních a negativních vzorků



Při screeningu protilátek byly pouze 3 vzorky pozitivní, zbytek byl negativní. (Graf 3) Pozitivní screening byl zachycen u krevních skupin 0 Rh⁻, A₁B Rh⁻ a B Rh⁺.

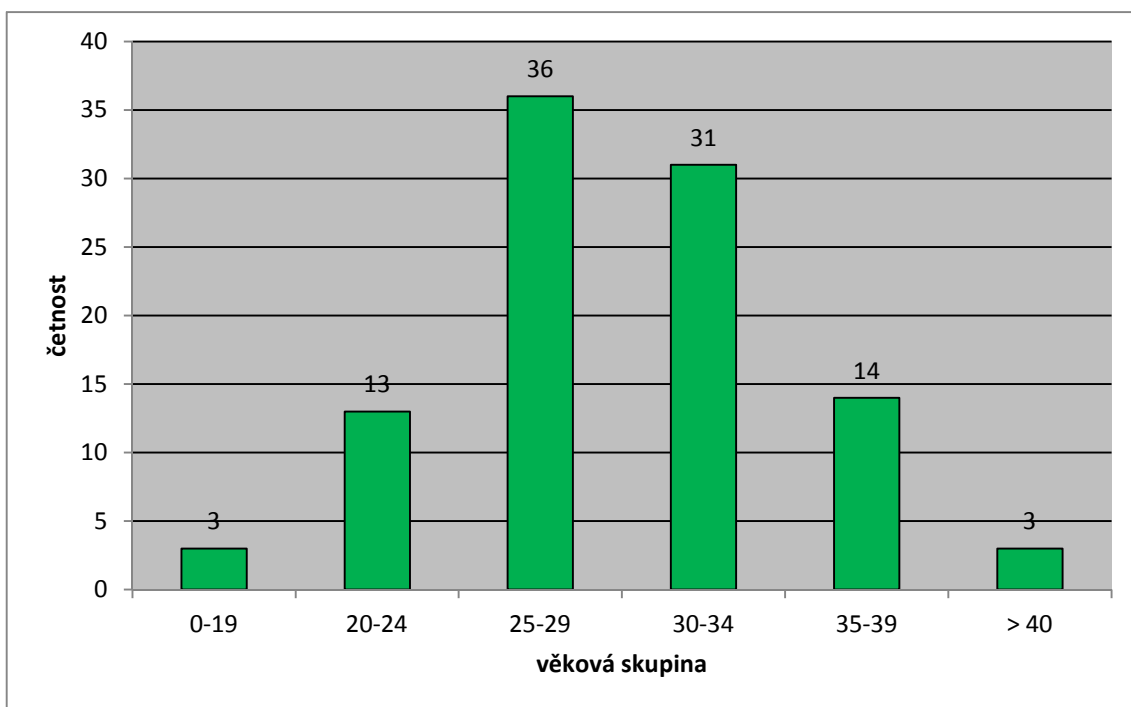
Graf 3: Počet pozitivních a negativních screeningů protilátek



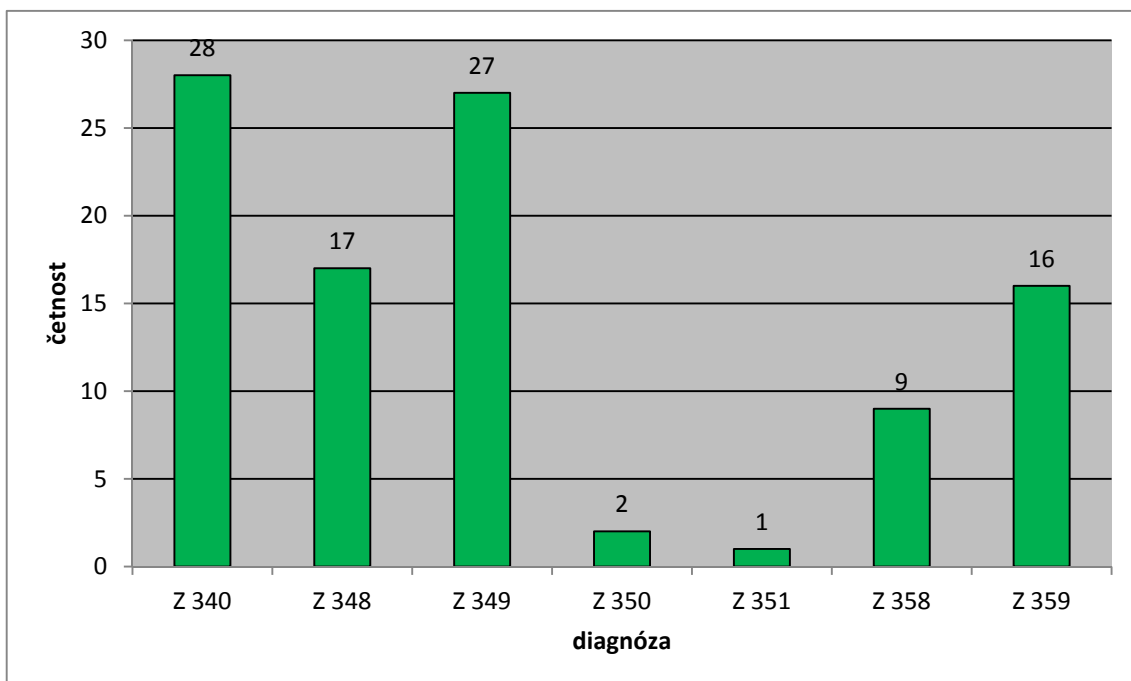
Největší počet vzorků byl z věkové skupiny 25 - 29 let (36). Druhou nejčastěji zastoupenou věkovou skupinou byla skupina 30 – 34 let (31). (Graf 4)

Vzorky přišly do laboratoře nejčastěji s diagnózou Z 340 – dohled nad normálním prvním těhotenstvím (28). Druhou nejčastější diagnózou byla diagnóza Z 349 – dohled nad normálním těhotenstvím (27). (Graf 5)

Graf 4: Četnost vzorků podle věkových skupin



Graf 5: Četnost diagnóz



5 Diskuze

Krevní skupina a nepravidelné antierytrocytární protilátky se vyšetřují u všech těhotných žen ve 12. týdnu těhotenství. Tato vyšetření se provádějí za účelem určení potencionálně rizikových žen z hlediska hemolytického onemocnění novorozenců.

V případě pozitivního screeningu se nepravidelné protilátky identifikují a vyhodnotí se jejich významnost z hlediska možnosti zapříčinit hemolytické onemocnění novorozenců. Jestliže se prokáže přítomnost významných protilátek, stanoví se jejich titr. Ten slouží k bližšímu monitorování průběhu onemocnění. Protilátky, které nejčastěji vyvolávají těžké hemolytické onemocnění novorozenců jsou: anti-D (85%), anti-c, anti-K a anti-E.

Po zavedení profylaxe imunoglobulinem anti-D se výrazně snížil počet hemolytických onemocnění navozených anti-D protilátkami. Imunoglobulin anti-D podaný Rh D negativní matce po porodu Rh D pozitivního dítěte destruuje D pozitivní fetální erytrocyty, které se mohly během porodu dostat do krevního oběhu matky. Tím se zabrání tomu, aby si matka vytvořila anti-D protilátky. Imunoglobulin anti-D se D negativním ženám podává ve 28. týdnu těhotenství v rámci předporodní profylaxe a po porodu D pozitivního plodu. V prvním trimestru jim může být indikována po umělém ukončení těhotenství, samovolném potratu či operaci mimoděložního těhotenství. Ve druhém a třetím trimestru by se profylaxe imunoglobulinu anti-D měla indikovat po amniocentéze, kordocentéze, intrauterinním úmrtí plodu, břišním poranění nebo porodnickém krvácení. Během těchto událostí může dojít k průniku fetálních erytrocytů do krevního oběhu matky a k imunizaci jejích erytrocytů.

Při předporodní profylaxi v 28. týdnu těhotenství je ženě podáno 250 µg (1250 IU) imunoglobulinu anti-D. Používají se např. anti-D imunoglobuliny Pratobulin SDF nebo Rhesanativ. 250 µg (1250 IU) imunoglobulinu Partobulinu SDF stojí 1100 – 1200 Kč. 350 IU imunoglobulinu Rhesanativ stojí 800 – 900 Kč. Pokud je třeba podání imunoglobulinu v prvním trimestru, doporučuje se 50 µg. Při profylaxi po porodu se používá 100 µg imunoglobulinu anti-D.

Pokud se narodí dítě s tzv. novorozeneckou žloutenkou, která je způsobená tím,

že nevyvinutá novorozenecká játra nejsou schopná odstranit bilirubin, musí podstoupit fototerapii. Vyšší hladiny totiž mohou způsobit postižení mozku. Při fototerapii je novorozenec vystaven účinkům ultrafialového světla. Principem fototerapie je světelná degradace bilirubinu na netoxické produkty, které jsou z organismu vyloučeny nezávisle na funkci jater.

V případech vážného hemolytického onemocnění novorozence je potřeba provést výměnnou transfuzi, kdy se určitý objem novorozenecké krve vymění za dárcovskou krev.

Tabulka 9: Finanční náklady na materiál k výměnné transfuzi

Pomůcky	Cena (Kč)
Spojovací hadička 1,8 x 450 UNIV NO DOP	11,60
Spojovací hadička 1,8 x 800 LL NO DOP	12,50
Transfuzní souprava TSU 221	12
Stříkačka vel. 2, 5, 10, 20 ml	12,50
Trojcestný kohout	2 x 6,00
Katetry	79 + 71,50
Odpadní nádoba	286
Sterilní pomůcky – rukavice, rouška, atd.	21,50
Vyšetření krevní skupiny	250
Plazma	2 x 1700
Krev (600 ml)	3500

Zdroj: Nemocnice České Budějovice, a.s. - Neonatologické oddělení

Celková cena výměnné transfuze se pohybuje kolem 8000 Kč. V tabulce nejsou zahrnuty náklady spojené s prací lékaře a zdravotnického personálu.

Za rok se v nemocnici v Českých Budějovicích narodí kolem 2500 dětí. Z toho přibližně 1/3 potřebuje fototerapii a u 1 – 2 dětí je provedena výměnná transfuze. Před zavedením profylaxe se provádělo několik set výměnných transfuzí ročně.

Záchyt pozitivních screeningových testů v mé práci tvoří 3%. To odpovídá

pozitivnímu záchytu i v ostatních laboratořích (3-5%). Screening protilátek je levné vyšetření (127 Kč), ale má velký dopad i při tak nízkém procentu pozitivních nálezů. Pomocí tohoto vyšetření se předchází potřebě použití výměnné transfuze, ale hlavně se předchází poškození dítěte způsobeného následky hemolytického onemocnění novorozenců.

6 Závěr

Téma screeningu protilátek u těhotných žen a s ním souvisejících vyšetření je velmi rozsáhlé a zajímavé. Touto problematikou se po celém světě zabývá mnoho lidí a dochází ke stálému objevování nových a užitečných poznatků.

Cílem této práce bylo shrnout současné poznatky ohledně vyšetřování krevních skupin a screeningu protilátek. Téma je tak rozsáhlé, že jsou zde shrnuty a ujednoceny základní poznatky.

Součástí práce bylo i porovnání prevence (profylaktické podání imunoglobulinu anti-D) a léčby (výměnná transfúze) hemolytické onemocnění novorozenců z ekonomické stránky. Profylaktické podání imunoglobulinu anti-D je podstatně levnější, než výměnná transfúze.

Díky zavedení rutinní prenatalní profylaxe imunoglobulinem anti-D a objevům stále nových poznatků v této problematice, se počet případů, kdy je třeba využít výměnné transfúze u novorozenců, v porovnání s minulými lety výrazně snížil. Zásahu na tom má i screeningové monitorování nepravidelných protilátek během těhotenství.

Screening protilátek je levné, ale efektivní vyšetření. Pomocí tohoto vyšetření se odhalí potenciálně riziková těhotenství z hlediska HON. U těchto těhotenství jsou pak provedena preventivní opatření, aby nedošlo k rozvoji HON. Tím se zabrání potřebě použití výměnné transfúze, ale především se zabrání poškození dítěte.

7 Klíčová slova

- hemolytické onemocnění novorozenců
- imunoglobulin anti-D
- imunoprofylaxe
- nepřímý antiglobulinový test
- screening protilátek
- výměnná transfuze

8 Seznam použitých zdrojů

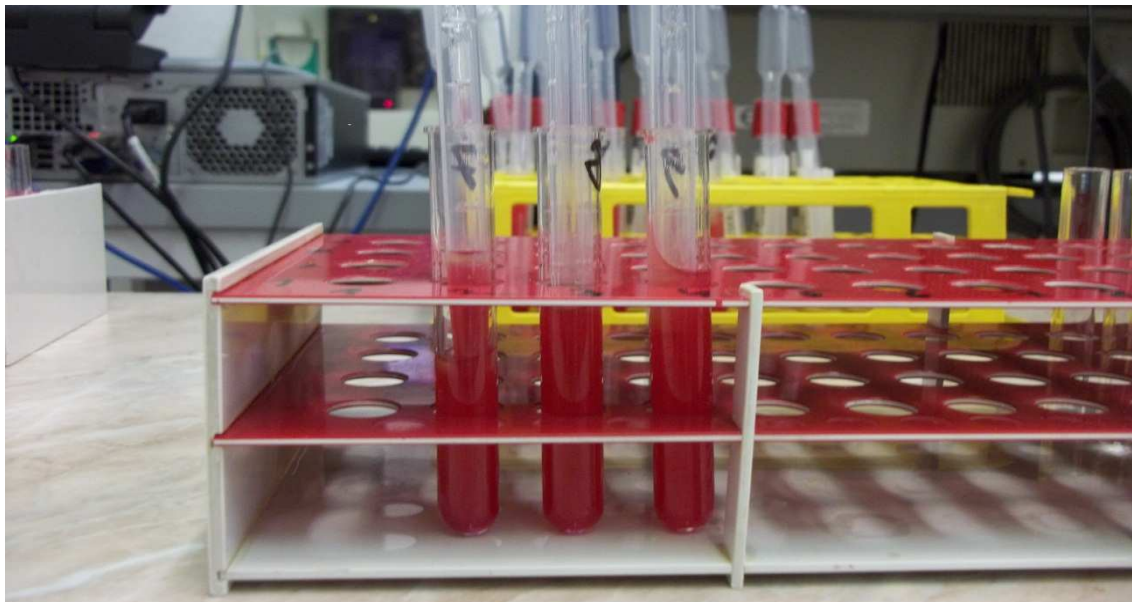
- 1 Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL 20010_06 ze dne 1. 3. 2010. *Imunohematologická vyšetření v těhotenství a po porodu*. Dostupné z: <<http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>>
- 2 Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL 2011_07 ze dne 1. 3. 2011. *Základní imunohematologická laboratorní vyšetření červené řady – obecné zásady a technické postupy*. Dostupné z <<http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty/php>>
- 3 JUDD, W.J. Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited. *Transfusion*. 2001; 41: 1445-52
- 4 ENGELFRIET, C.P. et al. *Imunohematologie*. Amsterdam: Sanquin Reagents, 2003. 158s.
- 5 EGBOR, M. et al. Red-cell and platelet alloimmunisation in pregnancy. *Best Practic & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2012; 26: 119-132
- 6 YINON, Y. et al. Early intrauterine transfusion in severe red blood cell alloimmunization. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2010; 36: 601-606
- 7 URBANIAK, S.J., GREISS, M.A. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev*. 2000; 14: 44-61
- 8 KUMPEL, B.M. On the immunologic basic of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis. *Transfusion*. 2006; 46: 1952-56
- 9 KOELEWIJN, J.M., DE HASS, M., VRIJKOTTE, T., VAN DER SCHOOT, C., BONSEL, G. Risk factors for RhD immunisation despite antenatal and postnatal anti-D prophylaxis. *BJOG*. 2009; 116: 1307-14

- 10 JONES, M.L. et al. A review of the clinical effectiveness of routine antenatal anti-D prophylaxis for rhesus-negative women who are pregnant. *BJOG*. 2004; 111: 892-902
- 11 MALASKA, Z. *Základy imunohematologie a krevní transfuze*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1957. 208s.
- 12 NEDVĚD, J. Počátky dějin transfuze ve světě a u nás. Mýty, fakta, osobnosti. *Transfuze a hematologie dnes, supplementum 3*. 2009; 3: 10-13
- 13 ČERMÁKOVÁ, Z., KOŘÍSTKA, M., MALUŠKOVÁ, A. *Imunohematologie*. 1. vydání. Ostrava: Ostravská univerzita, 2008, 70s.
- 14 DANIELS, G. *Human blood groups*. Second edition. Oxford: Blackwell Science, 2002, 560s.
- 15 HRUBIŠKO, M. et al. *Hematologie a krevní transfuze II: Krevní transfuze*. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1983, 276s.
- 16 REID, M.E., LOMAS-FRANCIS, C. *The Blood Group Antigen Facts Book*. Second edition. New York: Elsevier Academic Press, 2004, 584s.
- 17 GERARD, G., VITRAC, D., LE PENDU, J., MULLER, A., ORIOL, R. H-deficient blood groups (Bombay) of Reunion Island. *Am J Hum Genet*. 1982; 34: 937-47
- 18 DEAN, L. *Blood Groups and Red Cell Antigens*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2005
- 19 SANCHO, J.M. et al. Delayed haemolytic transfusion reaction due to anti-M antibody. *Br J Haematol*. 1998; 103: 268-269

- 20 HACKNEY, D.N., KNUDTSON, E.J., ROSSI, K.Q., KRUGH, D., O'SHAUGHNESSY, R.W. Management of pregnancies complicated by anti-c isoimmunization. *Obstet Gynecol.* 2004; 103: 24-30
- 21 JOY, S.D., ROSSI, K.Q., KRUGH, D., O'SHAUGHNESSY, R.W. Management of pregnancies complicated by anti-E alloimmunization. *Obstet Gynecol.* 2005; 105: 24-28
- 22 BOWMAN, J.M., POLLOCK, J.M., MANNING, F.A., HARMAN, C.R. Severe anti-C hemolytic disease of the newborn. *Am J Obstet Gynecol.* 1992; 166: 1239-43
- 23 JÍLKOVÁ, H. *Transfuzní lékařství*. 1. vydání. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2009, 98s.
- 24 BURTON, N.M, DANIELS, G. Structural modeling of red cell surface proteins. *Vox Sanguinis.* 2011; 100: 129-139
- 25 BLEILE, M.J., RIJHSINGHANI, A., DWYRE, D.M., RAIFE, T.J. Successful use of maternal blood in the management of severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Kp^b. *Transfusion and Apheresis Science.* 2010; 43: 281-283
- 26 WAGNER, T., BERER, A., LANZER, G., GEISLER, K. Kell is not restricted to the erythropoietic lineage but is also expressed on myeloid progenitor cells. *Br J Haematol.* 2000; 110: 409-411
- 27 Příbalový leták karty ScanGel Coombs+Neutral
- 28 Ordinace.cz [online]. 2012 [cit. 2012-06-15]. Dostupné z <<http://www.ordinace.cz/doky-diagnoz/>>

9 Přílohy

Příloha 1: Krevní náplav



Zdroj: vlastní fotografie

Příloha 2: Diagnostická séra k určení krevních skupin



Zdroj: vlastní fotografie

Příloha 3: Diagnostické erythrocyty k určení krevních skupin



Zdroj: vlastní fotografie

Příloha 4: Diagnostické erythrocyty pro screening protilátek



Zdroj: vlastní fotografie

Příloha 5: Diagnostické erythrocyty pro screening protilátek s papainem



Zdroj: vlastní fotografie

Příloha 6: Karta s mikrozkuvkami pro screening protilátek



Zdroj: vlastní fotografie

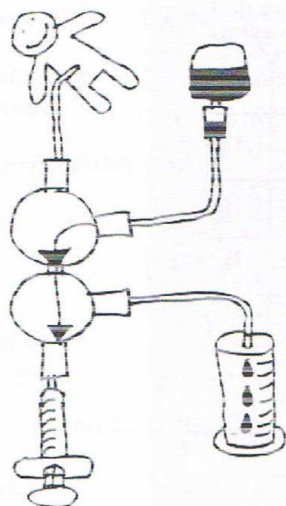
Příloha 7: Pomůcky k výměnné transfuzi



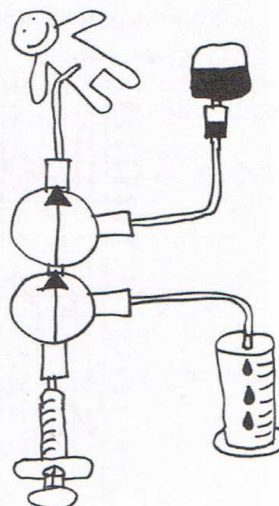
Zdroj: vlastní fotografie

Příloha 8: Schéma průběhu výměnné transfuze

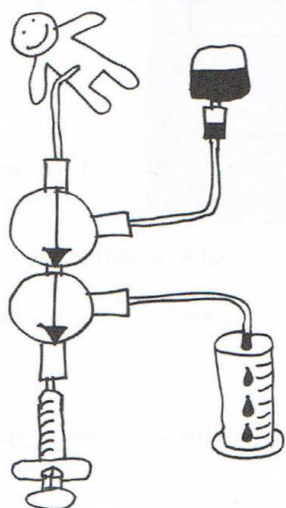
Obr. 1 – Nasátí krve z vaku



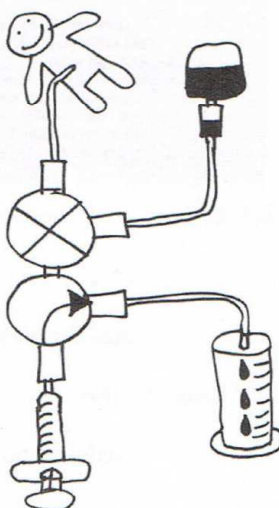
Obr. 2 – Transfúze krve do dítěte



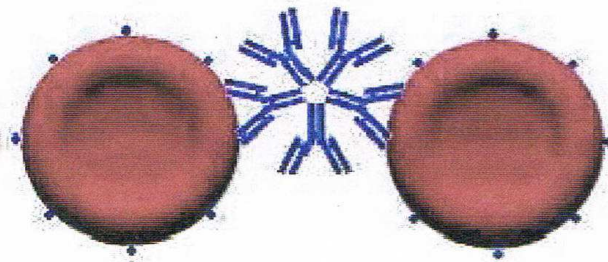
Obr. 3 – Odsátí krve z dítěte



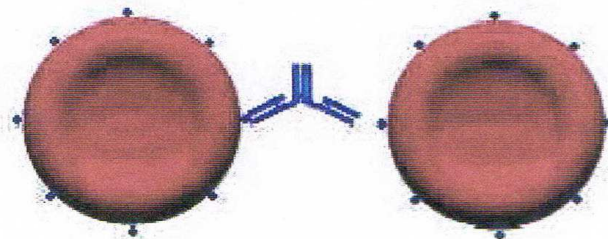
Obr. 4 – Odstříknutí krve do odpadní nádoby



Příloha 9: Kompletní a inkompletní protilátka



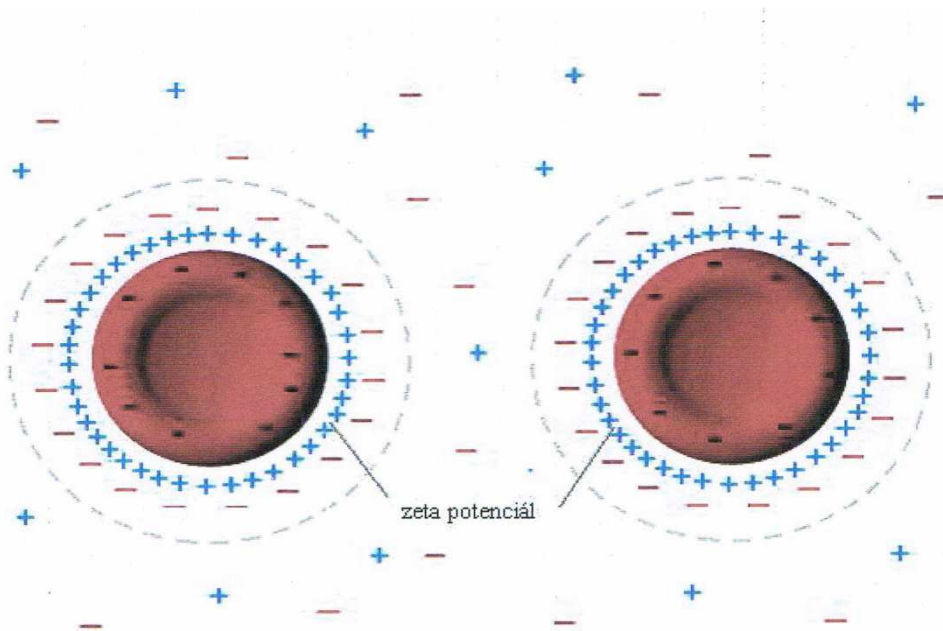
**Kompletní protilátka
(IgM)**



**Inkompletní protilátka
(IgG)**

Zdroj: Engelfriet (2003) ⁽⁴⁾

Příloha 10: Zeta potenciál na erytrocytech



Zdroj: Engelfriet (2003) ⁽⁴⁾