



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních a informačních systémů

Bakalářská práce

Automatizace v imunohematologii

Vypracoval: Alena Dominová
Vedoucí práce: prim. MUDr. Petr Biedermann

České Budějovice 2014

Abstrakt

Automatizace v imunohematologii

V současné době se automatizace imunohematologických vyšetření stává součástí rutinních metod transfuzních laboratoří, nemalý význam má v předtransfuzním vyšetření pacientů a v imunohematologickém vyšetření dárců krve.

Automatizace v imunohematologii nastoupila jako poslední z laboratoří zdravotnických zařízení. Umožnilo ji teprve používání robustnějších technik. Těmito technikami jsou sloupcová aglutinace prováděná na gelu nebo na skleněných mikrokuličkách a technika pevné fáze. Nejnovější metodou je Erythrocytes Magnetizer technologie a není proto ještě příliš rozšířená.

Cílem mé bakalářské práce je praktické provedení imunohematologických metod, krevní skupina AB0 RhD, screening protilátek. Vyšetřených ve zkumavkách, na mikrotitračních deskách, sloupcovou aglutinací. Manuální provedení porovnat s analyzátory Qasar IV a Techno TwinStation. Kvantitativně vyjádřit úsporu reagensií, lidské pracovní síly, zhodnotit dalších efekty, kterými jsou zcitlivění metod, daleko větší bezpečnost, vyloučení možné chyby během procesu při automatizovaném vyšetření.

Teoretická část se zabývá jednotlivými vyšetřeními a možnými technikami jejich provedení. Automatizací dojde k minimalizaci možných nebezpečí. Automaty výrazně sníží procesní kroky, potřebu zásahů pracovníka a exponenciálně snižují chybový potenciál, standardizují postupy a reagentie pro zvýšení spolehlivosti, reprodukovatelnosti vstupů a výstupů testovaného procesu, generování spolehlivých výsledků, jejich objektivní interpretaci, lepší dokumentaci, sledovatelnost a dohledatelnost, úsporu pracovní síly. Přináší jistotu jak pacientům, tak zdravotníkům. Neodmyslitelnými náležitostmi jsou prostorové podmínky, servis přístrojů.

Metodická část mé bakalářské práce byla zpracována na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s., kde jsem zaměstnána. Soubor tvořilo 24 vzorků pacientů a 24 vzorků dárců krve a 2 vzorky sloužící pro vnitřní kontrolu kvality.

U všech těchto 50 vzorků byla vyšetřena manuálně krevní skupina AB0 RhD ve zkumavkách a na mikrotitračních deskách. Screening protilátek byl vyšetřen ve zkumavkách, na mikrotitračních deskách a sloupcovou aglutinací. Vzorky pacientů byly analyzovány na analyzátoru Techno TwinStation a vzorky dárců krve byly analyzovány na poloautomatu Qasar IV. Dále bylo v průběhu roku 2013 manuálně ve zkumavkách a na mikrotitračních deskách opakováno 10 vzorků slabě pozitivních screeningů protilátek pacientů původně vyšetřených na analyzátoru Techno TwinStation a 10 pozitivních screeningů protilátek vzorků dárců krve původně vyšetřených na poloautomatu Qasar IV.

Výsledky vyšetření jsou zaznamenány v příslušných tabulkách, případně pro větší názornost zaznamenány v grafech.

Bylo zjištěno, že provedení jak manuální tak automatické zaručuje shodné výsledky. Pouze u manuálního vyšetření screeningu protilátek ve zkumavce byla u obou pozitivních vyšetření Basic QC zjištěna slabší reakce, což je způsobeno menší citlivostí zkumavkové metody.

U screeningu protilátek je kvantitativní úspora reagensů u sloupcové aglutinace jak manuální tak oběma analyzátory výrazná oproti vyšetření ve zkumavce. Uvážíme-li pracnost vyšetření ve zkumavce, časovou náročnost a neodmyslitelně hlavně menší citlivost tohoto vyšetření, bylo rozhodnutí o jeho nepoužívání správnou volbou. Toto porovnání jen potvrzuje hodnocení uvedené výše a také správnost rozhodnutí používat pro screening protilátek testy sloupcové aglutinace.

Vyjádřená časová náročnost vyšetření jednotlivých souborů přinesla možnost jednoduchého kvantitativního vyjádření úspory lidské pracovní síly. Přinesla jednoznačný výsledek ušetření celkem dvou pracovních sil díky každému analyzátoru.

V tabulce 12 jsou zachyceny jednotlivé kroky během vyšetření, a jestli mohou přinést možnost chyby. Manuální provedení sebou nese možnost chyby ve všech uvedených kritických bodech vyšetření. Automatizované pouze jednou u poloautomatu Qasar IV, kde je možnost záměny při přípravě reagensů. Reagencie nejsou opatřeny čárovými kódy. Automat Techno TwinStation prošel všemi kritickými body bez možnosti chyby.

Abstract

Automation in hematology

Nowadays automation in immunohematologic testing is becoming part of routine methods used in transfusion laboratories. It also has got considerable importance for pre-transfusion testing of patients and for immunohematologic testing of blood donors.

Immunohematology was the last among all medical laboratories into which automation was introduced. The use of robust techniques made it possible. These techniques are column agglutination carried out on gel or on glass microballs and solid phase technique. The latest method is Erythrocytes Magnetizer technology and it is not so widespread yet.

The aim of this thesis is practical performance of immunohematologic methods, blood group AS0 RhD, antibody screening. Tube testing, testing on microtiter plates and using column agglutination. Manual performance was compared with Qasar IV and Techno TwinStation analyzers. Other aims were quantitative description of reagent saving, human labor force and to assess other effects which are more sensitive methods, greater safety and exclusion of possible mistake during the automated testing process.

The theoretical part deals with particular tests and their possible performance techniques. Automation contributes to minimize possible risks. Automation reduces process steps, the need for worker intervention and exponentially decreases the number of potential mistakes. Introduction of automation also helps to standardize procedures and reagents to increase reliability, result interpretation and results of the tested process. On top of that automation is useful for generation of reliable results, their objective interpretation, better documentation, monitoring and traceability and labour force saving. It brings security not only to patients but also to medical workers. Inseparable necessities are space conditions and device service.

The practical part of this thesis was performed in the Blood Bank Department of Hospital České Budějovice, Ltd, where I am employed. Samples examined in this thesis included 24 patient samples, 24 blood donor samples and 2 samples for inner quality

control. In all 50 samples blood group ABO RhD was tested manually in test tubes and on microtiter plates. Antigen screening was tested in test tubes, on microtiter plates and using column agglutination. Patient samples were analysed using Techno TwinStation analyser and blood donor samples were analysed using semi-automatic machine Qasar IV. 10 slightly positive screenings of patient antigens (previously tested using Techno TwinStation analyser) and 10 positive screenings of blood donor antigens (previously tested using semi-automatic machine Qasar IV) were manually tested again in test tubes and on microtiter plates during 2013.

The results are recorded in relevant tables or for better understanding transformed into graphs.

It was found out that both manual and automatic testing give same results. Only in manual testing of antibody screening in test tube the reaction in both positive testing Basic QC, was a bit smaller which is caused by lower sensitivity of the test tube method.

In antibody screening the quantitative saving of reagents in column agglutination is bigger when tested both manually and with the use of both analysers than when tested in test tube. Concerning the difficulty, long-windedness and especially lower sensitivity of tube testing, the decision not to use this method was a correct choice. This comparison confirms assessments described above and also the correctness of decision to use column agglutination for antibody screening tests.

Different time consumption of testing of particular samples gave possibility for simple quantitative calculation of human labour force saving. It gave clear result – saving of two human labour forces thanks to each analyser.

Individual steps during testing are shown in table 12 and the chance of bringing the possibility of a mistake. Manual testing includes possibility of making a mistake in all mentioned critical moments of testing. Automated only once using semi-automatic machine Qasar IV, where there is a possibility of mistaken exchange during preparation of reagents. Reagents do not have bar codes. Techno TwinStation analyser succeeded in all critical steps without a mistake.

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 5. 5. 2014

.....

Alena Dominová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své práce primáři MUDr. Petru Biedermannovi za jeho pomoc, ochotu a rady při zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla upřímně poděkovat paní Janě Pozlerové. Svým spolupracovníkům z Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. a své rodině děkuji za trpělivost a podporu.

Obsah

Seznam použitých zkratek	10
Úvod.....	11
1 Teoretická část	12
1.1 Historie imunohematologie	12
1.2 Základní pojmy	14
1.2.1 Imunohematologie	14
1.2.2 Antigen	14
1.2.3 Protilátky	14
1.2.4 Reakce antigen-protilátka	16
1.3 Imunohematologické testy	17
1.3.1 Aglutinace.....	17
1.3.2 Přímé aglutinační testy	18
1.3.3 Nepřímé aglutinační testy.....	19
1.3.4 Hodnocení výsledků aglutinačních reakcí	20
1.4 Základní imunohematologická vyšetření	20
1.4.1 AB0 RhD	20
1.4.2 Screening protilátek.....	22
1.5 Automatizace.....	23
1.5.1 Testy sloupcové aglutinace.....	25
1.5.2 Testy pevné fáze	27
1.5.3 E. M. technologie	28
2 Cíl práce a hypotézy	29
2.1 Cíl práce	29
2.2 Hypotézy	29
3 Metodika	30
3.1 Charakteristika souboru	30
3.2 Preanalytická část.....	30
3.3 Analytická část.....	31

3.3.1 Reagencie, spotřební materiál a přístroje	31
3.3.2 Vyšetření AB0RhDve zkumavkách	33
3.3.3 Vyšetření AB0 RhD na mikrotitračních deskách	33
3.3.4 Vyšetření screeningů protilátek ve zkumavkách	34
3.3.5 Vyšetření screeningů protilátek na mikrotitračních deskách.....	34
3.3.6 Vyšetření screeningů protilátek gelovou sloupcovou aglutinací.....	35
3.3.7 Vyšetření pacientů na analyzátoru Techno TwinStation.....	35
3.3.8 Vyšetření dárců krve na poloautomatu Qasar IV	39
3.4 Postanalytická část	42
4 Výsledky	43
4.1 Porovnání vyšetření krevních skupin a screeningů protilátek různými metodami	43
4.2 Porovnání finančních nákladů.....	45
4.3 Kvantitativní vyjádření úspor reagentů	46
4.4 Časová náročnost vyšetření krevních skupin a screeningů protilátek.....	47
4.5 Kvantitativní vyjádření úspory lidské pracovní síly	49
4.6 Pozitivní screening protilátek u dárců krve.....	50
4.6.1 Poměr celkového počtu vyšetření k pozitivním	50
4.6.2 Porovnání výsledků různých metod vyšetření pozitivního screeningu protilátek u dárců krve	51
4.7 Pozitivní screening protilátek u pacientů	51
4.7.1 Porovnání různých metod vyšetření pozitivního screeningu protilátek u pacientů.....	52
4.8. Možné chyby během vyšetření.....	53
5 Diskuze	54
6 Závěr	57
7 Seznam použitých zdrojů.....	58
8 Klíčová slova	63

Seznam použitých zkratk

AIHA	autoimunitní hemolytická anémie
AHG	antihumanum globulinum (antiglobulinové sérum)
Basic QC	vnitřní kontroly kvality DiaMed/BioRad
ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
ČR	Česká republika
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (antikoagulační roztok)
EHK	externí hodnocení kvality
E. M.	Erythrocytes Magnetizer
ERY	erythrocyty
ET	enzymatický test
Ig	imunoglobulin
LIS	laboratorní informační systém
LISS	low ionic strength salt solution (solný roztok o nízké iontové síle)
LISS/NAT	nepřímý antiglobulinový test s použitím erytrocytů resuspendovaných v roztoku o nízké iontové síle
MP	mikrotitrační deska
NAT	nepřímý antiglobulinový test
NIS	nemocniční informační systém
NISS	norma ionic strength salt solution (solný roztok o normální iontové síle)
PAT	přímý antiglobulinový test
PBS	pufrovaný fyziologický roztok pH 6,98
PC	personal computer
SPRCA	solid phase red cell adherence
TRS	transfuzní oddělení
TP	transfuzní přípravek

Úvod

Imunohematologie se zabývá vlastnostmi krve a krevních elementů vzhledem k imunitním reakcím probíhajícím v organismu, zabývá se antigeny a protilátkami krevních skupinových systémů (Fábryová et al. 2012).

Základní vyšetření krevní skupiny a screeningu protilátek se provádí ve všech laboratořích transfuzních oddělení a krevních bank. Provádí se všem pacientům jako součást předtransfuzního vyšetření, těhotným ženám, novorozencům, hematologickým pacientům, při imunohematologickém vyšetření dárců krve.

Principem těchto vyšetření je hemaglutinace. K vyšetření se v dnešní době používají převážně zkumavky s nesrážlivou krví, nejlépe v EDTA, aby bylo možno provádět tato vyšetření automaticky. Velmi důležitá je preanalytická fáze jako soubor všech činností od odběru vzorku až k vlastnímu zpracování.

V současné době je snaha všech laboratoří provádět tato vyšetření na analyzátořech. Díky robustnějším technikám (především testy sloupcové aglutinace a testy pevné fáze) je možnost automatizace také v imunohematologii, jako poslední ze zdravotnických laboratoří. Přináší to sebou bezpečnost jak pro pacienty, tak pro zdravotníky.

Moje práce je zaměřena na praktické provedení imunohematologických metod (krevní skupina, screening protilátek) ve zkumavkách, na mikrotitračních deskách, sloupcovou aglutinací a manuální vyšetření porovnat s poloautomatem Qasar IV a automatem Techno TwinStation. Během všech vyšetření byly dodrženy zásady správné laboratorní praxe.

Téma automatizace v imunohematologii jsem si vybrala, protože pracuji na transfuzním oddělení a během své praxe jsem se účastnila přechodu od vyšetření pouze manuálního ve zkumavkách až k automatizaci provozu jak vyšetření dárců krve, tak pacientů.

Pokusím se kvantitativně vyjádřit úsporu reagensů, lidské pracovní síly, zhodnotit další efekty jako je zcitlivění metod, daleko větší bezpečnost při automatickém provádění.

1 Teoretická část

1.1 Historie imunohematologie

Vlastní historii imunohematologie předchází objevy na poli transfuzního lékařství.

Od dávné minulosti si lidé uvědomovali důležitost krve, ztotožňovaly ji se životem a přikládali jí funkci životní síly (Sakalová et al. 1995).

Zásadním objevem v moderním transfuzním lékařství je považován objev krevního oběhu v roce 1616 anglickým lékařem W. Harveyem. Následovaly první krevní převody mezi pokusnými zvířaty. V roce 1665 R. Lower spojil krční tepny dvou psů. V roce 1667 byla lékařem francouzského krále Ludvíka XIV. J. B. Denisem provedena první úspěšná transfuze krve u člověka, použil beránčí krev. Následující pokusy s transfuzemi zvířecí krve člověku však nebyly úspěšné, a proto byly na dlouhou dobu zakázané.

V roce 1819 prvním, kdo úspěšně použil lidskou krev, byl londýnský profesor fyziologie a porodnictví J. Blundell. Sestrojil přístroj, který usnadňoval transfuzi krve. Tento porodník se snažil o záchranu krvácejících rodiček při porodu. Zachycenou krev z vaginálního poporodního krvácení dále naředil ve fyziologickém roztoku a vrátil pacientkám zpět do žíly. Zaznamenal tímto první pokus v používání autologního krevního převodu (Fábryová et al. 2012). Roku 1824 byla vydána James Blundellovi kniha o transfuzi, ve které zdůrazňoval nutnost podání pacientovi pouze lidské krve a nutnosti velké opatrnosti během transfuze.

Prvním, kdo se pokusil provést transfuzi krve v českých zemích roku 1879, byl pražský lékař gynekologického oddělení Antonín Erpek podáním zvířecí krve. Provedl čtyři transfuze, z nichž jedna skončila smrtí ženy.

Na počátku 20. století díky objevu krevních skupin byla vysvětlena první hlavní příčina neúspěchu při krevních převodech.

Roku 1901 uveřejnil vídeňský lékař Karl Landsteiner svou práci o přirozené vlastnosti lidské krve, aglutinaci. Rozdělil lidskou krev do tří skupin dle aglutinačních schopností, označil je A, B, C. Roku 1902 Alfred von Castello a Adriano Sturli popsali, že některá lidská krev nelze zařadit do ani jedné skupiny definované Landsteinerem.

Roku 1907 český psychiatr Jan Janský publikoval rozřídění lidské krve do čtyř krevních skupin ve Sborníku klinickém. Krevní skupiny označil číslicemi I, II, III, IV (Penka et al. 2012). Roku 1910 k podobným výsledkům nezávisle na svých předchůdcích dospěl také Američan W. L. Moss. Tohoto roku došlo také ke změně značení krevních skupin na A, B, AB, 0, tak jak je používáme dodnes (Fábryová et al. 2012). V letech 1910-1911 polský mikrobiolog Ludvik Hirsfeld spolu s německým internistou Emilem von Dungernem dokázali platnost Mendelových zákonů dědičnosti také pro krevní skupiny. V praxi byly poznatky o krevních skupinách poprvé využity při podávání transfuzí prováděných americkým hematologem Reubenem Ottenbergem.

Druhou hlavní příčinou neúspěšných převodů krve bylo její srážení.

V letech 1914-1918 během první světové války pro velký počet zraněných bylo třeba zabezpečit pro nepřímou transfuzi koncentrovanou krev. Roku 1914 belgický chirurg Albert Hustin objevil protisrážlivý, lidskému organismus neškodný účinek citronanu sodného. Používá se dodnes. Roku 1915 byly tyto přípravky transfundovány britskými lékaři. Roku 1916 přidáním glukózy bylo možno krev po odběru několik dnů skladovat a vytvořit si její zásoby.

Následuje mohutný rozvoj v imunoematologii.

Roku 1939 Karl Landsteiner spolu s A. S. Wienerem objevili nový skupinový systém erytrocytů, z praktického hlediska velmi důležitý. Rh systém, pojmenovaný podle opice *Macacus Rhesus*, jejíž krvinky byly v pokusech použity. Tento systém pomohl vysvětlit dřívější nežádoucí potransfuzní reakce a většinu hemolytických onemocnění novorozenců. Po roce 1946 dochází k objevování dalších antigenních systémů erytrocytů, např. Duffy, Kell, Kidd, Lutheran (Penka et al. 2012).

1.2 Základní pojmy

1.2.1 Imunohematologie

je vědní obor zabývající se vlastnostmi krve a krevních elementů z pohledu imunitních reakcí probíhajících v organismu, zabývá se antigeny a protilátkami krevních skupinových systémů (Fábryová et al. 2012).

1.2.2 Antigen

je látka, kterou imunitní systém rozezná a reaguje na ni tvorbou protilátek nebo tvorbou efektorových buněk. Může být rozpustný v tělních tekutinách nebo zabudovaný v membránových strukturách buněk.

Imunogenicita je schopnost antigenu vyvolat imunitní odpověď.

Antigenicita je schopnost antigenu vyvolat protilátkovou odpověď.

Antigeny krevních skupin jsou biochemicky glykoproteiny a glykolipidy, kdy antigení schopnost nese složka cukerná nebo lipoproteiny, u nichž antigení schopnost nese složka bílkovinná (Fábryová et al. 2012).

V současné době je popsáno 329 antigenů, 292 z nich je zařazeno do 33 systémů krevních skupin (Řeháček et al. 2013).

1.2.3 Protilátky

(imunoglobuliny) jsou proteiny, tvořící se po kontaktu s antigenem.

Strukturně jsou tvořeny dvěma těžkými řetězci (H), které jsou spojeny cysteinovými můstky. Každý H řetězec je spojen cysteinovým můstkem s jedním lehkým řetězcem (L). Konec těžkého a lehkého řetězce je variabilní (V_H a V_L), vytváří spolu vazebné místo pro antigen. Molekula imunoglobulinu se může proteolyticky rozštěpit na fragmenty. Dva shodné značené Fab, mající jedno vazebné místo pro antigen a fragment Fc vážící se na Fc receptor fagocytů

nebo komplementový protein C1. Další kontrolované štěpení může z Fab fragmentů získat fragment Fv skládající se z nekovalentně asociovaných konců obou řetězců. Pantová oblast je ta oblast, kde jsou těžké řetězce spojeny cysteinovými můstky.

Izotypy (třídy)těžkých řetězců dělí imunoglobuliny na IgM (řetězec μ), IgD (řetězec δ), IgG (řetězec γ), IgA (řetězec α) a IgE (řetězec ϵ) (Hořejší et al. 2009).

Protilátky typu IgG (podtřídy IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) jsou nejdůležitější, ze všech imunoglobulinů obsažených v séru tvoří 80%, procházejí placentou. IgG3 a IgG1 dobře aktivují komplement (protein C1) a nejlépe se váží na Fc receptory fagocytů.

Protilátky typu IgM jsou v séru obsaženy jen asi 4%. Mají velkou molekulu, pentamer, nemohou projít placentou. Jako první se tvoří ve vyvíjejícím se plodu, jako první se tvoří v primární imunitní odpovědi. Ve většině případů jsou kompletní a chladové. Spolu s komplementovým proteinem C1 aktivují kaskádový proces vedoucí k intravaskulární lýze erytrocytů.

Protilátky typu IgA (podtřídy IgA1, IgA2) v séru jsou nejčastěji dimery. Neprocházejí přes placentu, neváží komplement. V imunitních reakcích aktivují komplement alternativní cestou a působí jako spouštěč komplementové kaskády.

Protilátky se dělí podle:

- původu (zvířecí, lidské, rostlinné, umělé)
- specifity (specifické reagující pouze s jedním antigenem, nespecifické reagující s většinou buněk)
- způsobu vzniku (imunní, tvořící se po kontaktu s antigenem; přirozené, tvořící se po kontaktu s antigenem podobným antigenu erytrocytů; autoprottilátky jsou typ imunitních protilátek proti vlastním antigenům)
- prokazující se serologické reakce (kompletní, aglutinující erytrocyty přímo, typ IgM, inkompletní, neaglutinující erytrocyty přímo, ale až po přidání podpory, typ IgG)
- tepelného optima reakce (tepelné, aglutinující erytrocyty při 37°C, většinou IgG, chladové aglutinující při nízké teplotě, optimálně 4°C, většinou IgM (Fábryová et al. 2012).

1.2.4 Reakce antigen-protilátka

Je chemická reakce glykoproteinové molekuly protilátky s epitopy na povrchu membrány erytrocytu.

V případě je-li antigen rozpustný: precipitace (vysrážení, precipitinogen, precipitin) nebo neutralizace (vytvoří se komplex antigen-protilátka), pokud je antigen vázán na povrchu krvinky, je reakcí: aglutinace (shlukování – aglutinogen, aglutinin), lýza (lyzinogen, lyzin), nebo cytotoxicita (cytotociny). Stabilitu vazby antigen-protilátka zajistí komplementarita elektrického náboje, vazba mezi vodíkovými molekulami, hydrofobní vazba, Van der Waalovy síly (Sakalová et al. 1995).

Afinita je síla vazby mezi protilátkou a epitopem (epitop je malá část molekuly antigenu, jež je rozpoznána imunitními receptory).

Avidita je celková síla vazby protilátky k jednomu antigenu s více epitopy.

Vazbu antigen-protilátka ovlivňuje:

- koncentrace (poměr mezi Ag a Ab)
- pH (pro udržení optimálního pH se provádí testy v prostředí pufovaného fyziologického roztoku, optimální pH kolem 7)
- teplota (za nižších teplot většinou protilátky třídy IgM, označovány jako chladové, za vyšší teploty IgG, označovány jako tepelné)
- iontová síla reakčního média (běžně izotonický fyziologický roztok, rychlejší dosažení požadované vazby je za použití roztoku s nižším obsahem iontů – LISS)
- schopnost vázat komplement (Řeháček et al. 2013).

Komplement je systém asi třiceti proteinů obsažených v séru a na membránách. Nejdůležitějších je 9 sérových proteinů značených C1 až C9. Kaskádově se přemění z formy neaktivní v aktivní. Membránu erytrocytů poškozují aktivní formy. Vytvořený Membrane Attack Complex (MAC) perforuje erytrocytární membránu, z erytrocytu unikne hemoglobin – intravaskulární hemolýza.

Extravaskulární hemolýza proběhne v játrech nebo ve slezině.

V játrech-protilátky naváží komplement, po aktivaci C3 na membráně erytrocytu zůstane C3b. Proběhne adheze na makrofágový receptor a vlastní fagocytóza.

Ve slezině jsou erytrocyty fagocytovány tak, že se naváže IgG protilátka na Fc receptor na membráně makrofágu (Bartůňková et al. 2011).

1.3 Imunohematologické testy

K průkazu antigenů a protilátek se používají serologické techniky. Principem imunohematologických testů je aglutinace.

1.3.1 Aglutinace

Je vazba protilátky na erytrocyt, která vyvolá shlukování krvinek.

1. fáze je vazba specifické protilátky na antigen na povrchu erytrocytu, sensibilizace

2. fáze je vlastní aglutinace, což je propojení dvou erytrocytů prostřednictvím protilátkové vazby.

Protilátky třídy IgM splňují tyto dvě fáze, jsou proto nazývány kompletními protilátkami, které **přímo aglutinují**.

Protilátky třídy IgG splňují pouze první fázi, jsou proto nazývány inkompletními protilátkami, které **aglutinují nepřímo** (Řeháček et al. 2013).

Podmínky pro vznik aglutinace:

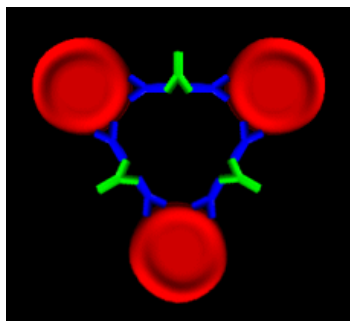
-vzdálenost mezi erytrocyty (V solném prostředí 20-30 nm, možná pouze pro IgM, protilátky vzhledem k velikosti jejich molekuly. IgG aglutinují až po zmenšení vzdálenosti mezi erytrocyty snížením zeta potenciálu. Zeta potenciál je rozdíl v potenciálu mezi negativně nabitými erytrocyty a kationty v okolním prostředí. Snížení lze docílit například pomocí albuminu, polybrenu, proteolytických enzymů) (Pecka 2005).

-zesílení vazby mezi antigenem a protilátkou pomocí polyetylenglykolu, který extrahuje vodu ze svého okolí, tím se vazba zesílí, zvýší se koncentrace protilátky

-snížení iontové síly reakčního prostředí pomocí roztoku o nízké iontové síle. (LISS je roztok NaCl s albuminem, glycinem a želatinou pufrovaný fosfátem. Je hypotonický -zvětší se objem erythrocytu a jeho povrch, antigeny se od sebe vzdálí – tím k nim mají protilátky snadnější přístup, sníží se zeta potenciál, -redukuje se negativní náboj.)

-spojení protilátek navázaných na erythrocytech pomocí protilátek proti lidskému IgG (vytvoření můstku mezi IgG na odlišných erythrocytech, princip antiglobulinového testu).

Obrázek 1: Antiglobulinový test



Dostupné z:

<http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/transfusionsmedizin/lbef_transfusionsmedizin.htm#Agglutinationstest>

1.3.2 Přímé aglutinační testy

Používají se k vyšetření AB0 skupiny, RhD a dalších antigenů (např. C, c, E, e, M, N) pomocí protilátek IgM (v dnešní době především monoklonálních).

Lze je provádět sklíčkovým testem, zkumavkovým testem, na mikrotitračních deskách typu U, testem pevné fáze, testem sloupcové aglutinace na gelových kartách, novou aglutinační technologií Erythrocytes Magnetizer (E. M. Technologie) (Řeháček et al. 2013).

1.3.3 Nepřímé aglutinační testy

1. Antiglobulinový test (synonymum Coombsův test) se používá k detekci IgG protilátek.

Přímý antiglobulinový test (PAT) detekuje protilátky IgG nebo složky komplementu navázané na erytrocytech *in vivo*. Používá se k průkazu imunitního typu hemolýzy u pacientů po transfuzích, transplantacích, u potransfuzních reakcí, při průkazu autoimunitní hemolytické anémie, u hemolytického onemocnění novorozence.

Nepřímý antiglobulinový test (NAT) detekuje vazbu protilátky nebo C3 složky komplementu s erytrocytem vzniklou *in vitro*. Používá se k průkazu významných nepravidelných protilátek proti erytrocytům, k jejich identifikaci, při předtransfuzním vyšetření u testů kompatibility, pro detekci antigenů (např. Duffy, S, s) pomocí diagnostických protilátek IgG. Používané antihumanum globulinum (AHG) musí být komplexní, obsahující složku anti-IgG a anti-C3, aby byly detekovány nejen protilátky IgG, ale také protilátky závislé na komplementu (Penka et al. 2012). Od konce 80. let minulého století byl povinně zařazen k předtransfuznímu vyšetření screening protilátek prováděný tímto testem (Dobry et al. 2011).

Lze jej provádět testem zkumavkovým, testem pevné fáze, testem E. M. Technologie, testem sloupcové aglutinace (Řeháček et al. 2013).

2. Enzymový test, kde se působením proteolytických enzymů (bromelin, ficin, papain) sníží elektronegativní náboj erytrocytů, redukuje se množství kyseliny sialové na povrchu erytrocytové membrány, uvolňují se molekuly vody z povrchu erytrocytů, odstraňují se některé membránové antigeny.

Enzymový test je testem doplňkovým, vhodným pro vyšetření potransfuzních reakcí, u polytransfundovaných pacientů (Penka et al. 2012). Tento test může být přínosem při identifikaci směsi protilátek, některé reakce zesílí, jiné zůstanou stejné, některé vymizí (Řeháček et al. 2013). Provedení enzymového testu může být jednostupňové (erytrocyty + enzym + sérum/plazma) nebo citlivější dvoustupňové (enzymaticky upravené erytrocyty + sérum/plazma). Nejsou považovány za rutinní

metodu pro screening protilátek (Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_07).

1.3.4 Hodnocení výsledků aglutinačních reakcí

- kvalitativní (negativní, pozitivní)
- semikvantitativní (síla pozitivní reakce se vyjadřuje pomocí křížků, od + až po ++++)
- kvantitativní (titrem protilátky, titer určuje prokazatelná aglutinace u nejvyššího ředění).

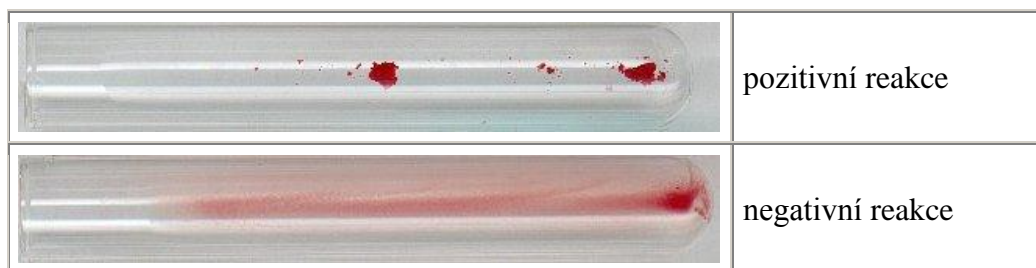
Správné hodnocení je velmi důležité a musí být řádně vedeno v dokumentaci (Tesařová et al. 2008).

1.4 Základní imunohematologická vyšetření

1.4.1 AB0 RhD

Toto vyšetření se provádí u všech pacientů s předpokládanou možností transfuze, u těhotných žen, u novorozenců a u dárců krve. Určují se minimálně antigeny A a B (stanovení aglutinogenů), protilátky anti-A, anti-B (stanovení aglutininů), přítomnost RhD antigenu. Při jejich určování se využívá přímá aglutinace ve zkumavkách, mikrotitračních destičkách nebo na kartách sloupcové aglutinace (Řeháček et al. 2013).

Obrázek 2: Aglutinace zkumavkový test



Dostupné z:

<http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/transfusionsmedizin/lbef_transfusionsmedizin.htm#Agglutinationstest>

AB0 vyšetření musí v případě antigenů a protilátek odpovídat, každá diskrepance musí být vyřešena před vydáním výsledku.

U novorozenců a dětí do věku 4 měsíců by mělo být vyšetření aglutinogenů provedeno dvakrát pomocí diagnostických sér s dvěma různými klony pro každou specifitu, protože zde chybí možnost kontrolního vyšetření aglutininů.

RhD se provádí 2x různými monoklonálními diagnostickými séry anti-D třídy IgM nedetekující variantu D^{VI}.

Důležité je si uvědomit, že monoklonální diagnostika anti-D mohou mít rozdílnou schopnost detekovat slabé a variantní antigeny D. Při zachycení diskrepance nebo výrazného zeslabení reakcí by měl být pacient považován za D-variantního až do vyřešení diskrepance (Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_07).

Rozlišujeme tři kategorie výsledků u vyšetření antigenu D (lze použít označení D nebo RhD):

D pozitivní je se všemi použitými diagnostickými séry anti-D jasně pozitivní reakce

D negativní je se všemi použitými diagnostickými séry anti-D jasně negativní reakce

D^{w/v} (slabý antigen D/varianta antigenu D):

- se všemi použitými diagnostickými séry anti-D slabší reakce (2+ a slabší)
- s použitými diagnostickými séry anti-D zcela diskrepantní reakce (pozitivní x negativní)

- s použitými diagnostickými séry anti-D rozdíl v síle reakce
- nečekaný nálezn anti-D imunizace bez autoreakce u osoby se zdánlivě normálním antigenem D
- diskrepance mezi anamnestickým údajem a současným vyšetřením
- diskrepance mezi výsledky vyšetření jedince postupy doporučenými pro dárce a příjemce krve.

Dárce krve nebo jejích složek RhD pozitivní a RhD^{w/v} má transfuzní přípravky (TP) označeny RhD pozitivní, dárce RhD negativní má TP označeny RhD negativní.

Příjemci erytrocytového TP RhD pozitivnímu bude podán erytrocytový TP RhD pozitivní, příjemci RhD^{w/v} a RhD negativnímu bude podán erytrocytární TP RhD negativní (Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2012_10).

1.4.2 Screening protilátek

Provádí se u všech předtransfuzních vyšetření (AB0RhD, screening protilátek, test kompatibility), u těhotných žen, u novorozenců a u dárců krve. Základem je NAT provedený zkumavkovým testem, testem sloupcové aglutinace nebo testem pevné fáze. Doplňkovým testem je test enzymový. K vyšetření se používá screeningový panel diagnostických erytrocytů s jednotlivě provedenými reakcemi nejčastěji tří typů erytrocytů. U dárců krve lze použít erytrocyty ve směsi, poolované. S pozitivním screeningem protilátek se můžeme setkat u těhotných žen, u transfundovaných pacientů u pacientů s AIHA (Řeháček et al. 2013).

Za referenční techniku je považován NAT ve zkumavkovém provedení za použití erytrocytů resuspendovaných v LISS (LISS-NAT). Jeho hranice citlivosti je brána za standardní nepodkročitelné minimum. Technika s normální iontovou silou (NISS) není doporučována vzhledem k delší inkubaci a k většímu množství vyšetřovaného vzorku. Může být vhodnou při problémech vázaných na LISS (LISS-dependentní autoprottilátky, nespecifické reakce).

Za standardní techniky jsou považovány testy sloupcové aglutinace a testy pevné fáze.

Při zjištění pozitivního screeningu protilátek je třeba provést identifikace protilátek pomocí identifikačního panelu diagnostických erytrocytů za účelem určení specifity a klinického významu zjištěné protilátky. Toto speciální vyšetření provádí pouze laboratoře účastníci se systémem externího hodnocení kvality (Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_07).

1.5 Automatizace

Nové techniky spolu s rozvojem informačních technologií, používání čárových kódů a cílená akreditace laboratoří vyvolávají potřebu automatizace postupně ve všech laboratořích. Je nutná celková rozvaha, jak vytvořit co nejlepší a nejkompexnější soustavu. Nestačí pouze propojení v rámci LIS, nezbytné se ukazuje celkové propojení i s nemocničním informačním systémem (NIS).

Automatizace v první řadě je hlavně proces analyzující laboratorní vyšetření. Primárním cílem je vytvoření efektivní, produktivní, bezpečné a kvalitní laboratoře. Vytvoření rozvahy na jaký počet vzorků, jaký objem z nich představuje vyšetření statim, kolika pracovních míst se to dotýká. Splní-li vynaložené náklady očekávání. Stejně jako preanalytická část je důležitá také postanalytická část, která je v současné době nejméně využívána (Zima 2007).

Automatizace přináší výhody:

- redukuje chyby spojené s manuálním provedením testů
- redukuje subjektivní interpretaci výsledků vyšetření
- objektivní interpretace výsledků vyšetření
- dává míru bezpečnosti, která u manuálních testů chybí
- nedochází k chybám při přepisu výsledků do dokumentace
- reprodukovatelnosti testů
- přináší jistotu pacientům
- přináší jistotu zdravotníkům
- pozitivní identifikace vzorků, reagensů

- identifikace obsluhy
- kontroly parametrů testů jako je čas, objem, teplota
- úspory časové a personální
- sledovatelnosti (traceability) a možnosti uchovávání dat

Automatizace přináší změny:

- dosavadních zvyků a postupů
- v myšlení
- v know-how zdravotníků
- v pokroku do budoucna (Zedníček 2007).

Před zavedením automatizace je výhodné vydefinovat celý proces, pracovní zátěž. Nezapomenout na řízení změn, vybrat si automat či poloautomat, vhodné zálohovací zdroje. Nelze opomenout pravidelná školení zdravotníků s jejich aktivní účastí. Neodmyslitelnými náležitostmi jsou prostorové podmínky, servis přístrojů, servis dodavatelů reagentů, od stávajících uživatelů zpětná vazba a v neposlední řadě obrát. Ne vše lze automatizovat. Zůstává urgentní příjem u pacientů, statim vyšetření, nestandardní vzorky, speciální testy, potransfuzní reakce, typizace antigenů u pacientů, AIHA (Katovská and Kupská 2013).

Nové robustnější techniky (test sloupcové aglutinace, test pevné fáze) přinesly také pro imuno hematologii možnost využití přístrojové techniky. Používají se pouze přístroje a diagnostika splňující příslušné legislativní požadavky na příslušné zdravotnické prostředky označené CE. (Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_07). Proto je původní vyšetření ve zkumavkách nahrazováno těmito novými testy, které umožňují automatizaci prováděných vyšetření a jejich následné převedení do laboratorního informačního systému.

Jak u vyšetřovaných dárců, tak i u příjemců je třeba provést základní imuno hematologická vyšetření, kterými u dárců jsou: krevní skupina (AB0 RhD), screening protilátek, Rh fenotypizace a Kell. U příjemců: krevní skupina (AB0 RhD), screening protilátek, test kompatibility (Mannessier 2003). Všechny tyto metody jsou hemaglutinační. Při všech těchto činnostech je nutné snížit riziko lidských chyb (při příjmu vzorku, jeho evidenci, vlastním provedení požadovaných vyšetření,

interpretaci výsledků, uvolňování výsledků), zajistit přesnou sledovatelnost a dohledatelnost všech kroků v průběhu vyšetřování, provádět vnitřní kontroly kvality, spravovat a analyzovat všechna chybová hlášení (Delamaire 2005).

Srovnáním provedených vyšetření jak testy sloupcové aglutinace, tak testy pevné fáze spolu s vyšetřením ve zkumavkách se dochází k jednoznačnému závěru, že testy pevné fáze a sloupcové aglutinace jsou srovnatelné v citlivosti metod, kdy testy pevné fáze vycházejí poněkud citlivější, citlivost zkumavkových vyšetření je však nesrovnatelně nižší (Weisbach et al. 2006).

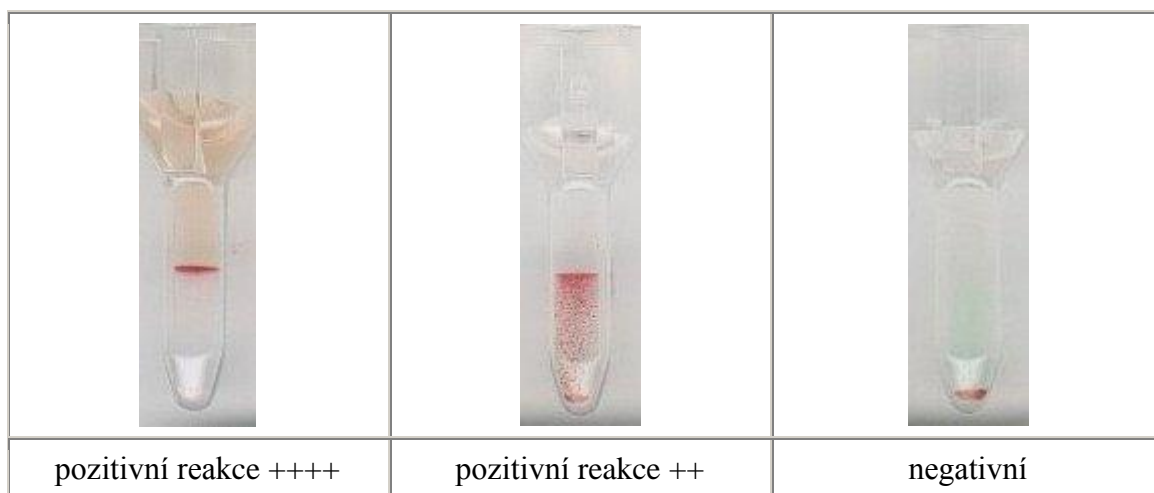
V imunohematologii jsou běžně používány jak poloautomaty, tak automaty. Poloautomaty dávají větší otevřenost, skládají se z více modulů, centrifuga a reader nejsou přímou součástí zařízení. Dá se u nich kombinovat jak používání mikrotitračních desek, tak karet. To je u automatů možné pouze u typu Techno TwinStation. Pořizovací cena poloautomatů je nižší, bývá zde však vyžadováno více zásahů obsluhy. Naproti tomu je zde volná volba v používaných reagentech. Automaty od založení vzorků až do vyhodnocení pracují uzavřeným systémem (Delamaire 2005). Výběr poloautomatů a automatů se odvíjí hlavně dle potřeb laboratoře. Automaty dodávané firmami jsou vázány příslušnými testy, pro které jsou určeny.

1.5.1 Testy sloupcové aglutinace

Provádí se na gelových kartách v mikrozkušavkách obsahující dextran gelové matrix. Gel se chová jako síto, aglutinované erythrocyty zůstanou rozptýlené v gelu, negativní erythrocyty projdou na dno mikrozkušavky. K tomuto oddělení dochází během centrifugace. Gel může být neutrální pro provedení přímé aglutinace v solném prostředí nebo enzymatických testů. Může obsahovat specifická činidla jako AHG na provádění přímého či nepřímého antiglobulinového testu nebo specifické protilátky (např. anti-A, anti-B, anti-D, anti-Kell). V případě potřeby se karty inkubují, poté se centrifugují podle kontrolovaných parametrů. Odpadá nepříjemné promývání u nepřímého antiglobulinového testu, jak je tomu u zkumavkových metod. Promývání sebou nese riziko nedostatečného promytí nebo naopak může vést k disociaci slabě

navázaných protilátek (Engelfriet et al. 2003). Reakce pomocí gelové techniky jsou stabilní nejméně po dobu 48 hodin, v elektronickém formátu mohou být uchovávány libovolně dlouhou dobu.

Obrázek 3: Sloupcová aglutinace na gelu



Dostupné z:

<http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/transfusionsmedizin/lbef_transfusionsmedizin.htm#Agglutinationstest>

Další test sloupcové aglutinace má v mikroskopických místo gelu skleněné mikrokuličky využívající gradientu hustoty. I zde odpadá promývání při nepřímém antiglobulinovém testu. V obou metodách se pracuje s roztokem o nízké iontové síle (LISS), který pomáhá zvýšit citlivost protilátek, které se nacházejí v nízkém titru, snižuje iontovou sílu prostředí, tím zvyšuje počet spojení protilátek (Duguid and Bromilow 1993).

Automat WADiana firmy Grifols (Španělsko) je plně automatizovaný (walk-away), využívající testy gelové sloupcové aglutinace. Stejně tak Techno TwinStation firmy DiaMed/Bio-Rad(Švýcarsko) využívá testy gelové sloupcové aglutinace, pro ně je provedení plně automatické. Lze na něm provádět vyšetření AB0 RhD také na mikrotitračních deskách. Tato operace je poloautomatická, ale výrazně finančně

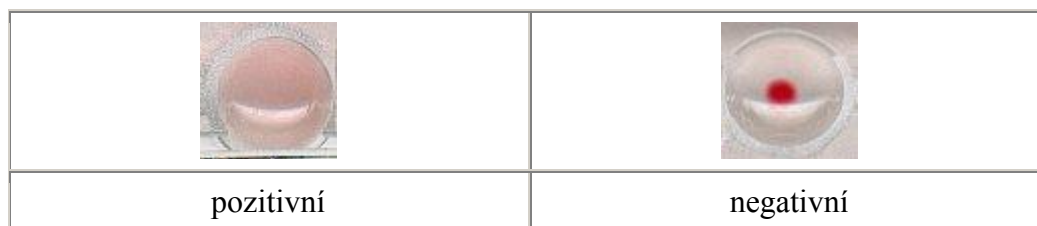
méně náročná. Automat AutoVue Innova od firmy Ortho Clinical Diagnostics (USA) pracuje s testy sloupcové aglutinace s mikrokuličkami.

Porovnání Techno TwinStation a AutoVue Innova s manuálním provedením v předtransfuzním vyšetření přinesla další obsáhlá studie. Oba automaty mají automatický reader používající digitální obraz, oba vykazují vysokou přesnost a rychlost vyšetření, nabízí tři hlavní cíle: méně chyb, méně práce, vyšší výkon. Nebyly zjištěny žádné chybné výsledky ani v manuálním provedení. AutoVue Innova vykazuje větší citlivost v titracích a je 3,5x rychlejší v dokončení 100 testů screeningu protilátek než Techno TwinStation (Shin et al. 2008).

1.5.2 Testy pevné fáze

Testy pevné fáze (technologie Capture-solid phase red cell adherence, SPRCA) adherujících erytrocytů používající navázaný antigen nebo protilátku na pevném nosiči prokazují protilátku nebo antigen ve vzorku. Provádí se na mikrotitračních deskách typu „U“. Nejdříve jsou erytrocyty navázány na povrch mikrojamek, jejich antigeny se využijí k navázání specifických erytrocytárních IgG protilátek během 5 minutové inkubace. Promytím jsou z jamek odstraněny nenavázané IgG, jsou přidány erytrocyty s protilátkami, sloužící jako indikátor. Během centrifugace dojde ke kontaktu navázaných erytrocytárních IgG s protilátkami indikátorových erytrocytů. Při pozitivní reakci zůstávají erytrocyty rozptýleny po ploše jamky, zatímco při negativní reakci se vytváří terčík nahloučených erytrocytů na dně jamky (Sandler et al. 2000).

Obrázek 4: SPRCA



Dostupné z:

<http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/transfusionsmedizin/lbef_transfusionsmedizin.htm#Agglutinationstest>

Systém ABS2000 používá mikrotitrační desky, pracuje s testy pevné fáze, stejně jako modernější automaty Galileo, Galileo Echo a Galileo NEO všechny od firmy Immucor (USA). Porovnání Galileo a AutoVue Innova firmy Ortho Clinical Diagnostics bylo provedeno v metodě screeningu protilátek a jejich identifikaci současně. Vedle jejich podobného výkonu a citlivosti je jasné, že není možné pracovat takto souběžně při běžném vyšetřování, ale je třeba zajistit shodu přítomných antigenů na screeningových krvinkách jako na příslušných identifikačních panelech, aby se zabránilo pozitivnímu výsledku screeningu protilátek a negativnímu výsledku identifikace z důvodu chybění některého antigenu na panelu (Garozzo et al. 2007).

1.5.3 E. M. technologie

Testy zmagnetizovaných erytrocytů využívají paramagnetické kuličky navázané na membráně erytrocytu pro přenos antigenu či protilátky, které se v přítomnosti externího magnetického pole dostávají na dno mikrotitrační desky, magnetické síly nahrazují centrifugaci, protřepávání umožní odečítání pozitivních nebo negativních reakcí. Testy zmagnetizovaných erytrocytů jsou prováděny na automatech Qwalys od firmy Diagast (Francie). Jedná se zatím o nejnovější technologii v imunohematologii, u které není třeba promývání ani centrifugace, což je její velkou předností (Bouix et al. 2008).

2 Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce je praktické provedení imunohematologických metod (krevní skupina, screening protilátek) ve zkumavkách, na mikrotitračních deskách, sloupcovou aglutinací a manuální provedení porovnat s poloautomatem Qasar IV a automatem Techno TwinStation. Kvantitativně vyjádřit úsporu reagensů, lidské pracovní síly, zhodnocení dalších efektů-zcitlivění metod, daleko větší bezpečnost (vyloučení možné záměny při vyšetřování) při automatickém provádění.

2.2 Hypotézy

Hypotéza 1

Při zkumavkové metodě je největší spotřeba reagensů.

Hypotéza 2

Automatizace přináší úsporu lidské síly.

Hypotéza 3

Sloupcová aglutinace je z použitých metod nejcitlivější.

Hypotéza 4

Automatizované provedení metod je nejbezpečnější.

3 Metodika

3.1 Charakteristika souboru

Praktická část mé bakalářské práce byla zpracována na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. Soubor tvořilo 24 vzorků pacientů a 24 vzorků dárců krve a 2 vzorky sloužící pro vnitřní kontrolu kvality. U všech těchto 50 vzorků byla vyšetřena manuálně krevní skupina AB0 RhD ve zkumavkách a na mikrotitračních deskách. Screening protilátek byl vyšetřen ve zkumavkách, na mikrotitračních deskách a sloupcovou aglutinací. Vzorky pacientů byly analyzovány na analyzátoru Techno TwinStation vzorky dárců krve byly analyzovány na poloautomatu Qasar IV. Dále bylo v průběhu roku 2013 manuálně ve zkumavkách a na mikrotitračních deskách opakováno 10 vzorků slabě pozitivních screeningů protilátek pacientů původně vyšetřených na analyzátoru Techno TwinStation a 10 pozitivních screeningů protilátek vzorků dárců krve původně vyšetřených na poloautomatu Qasar IV.

3.2 Preanalytická část

Preanalytická část byla provedena v souladu s Doporučeními Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_07 ze dne 1. 3. 2011 verze 2 (2012_4), č. STL2011_08 ze dne 1. 3. 2011 a č. STL2012_09 ze dne 19. 4. 2012.

3.3 Analytická část

3.3.1 Reagencie, spotřební materiál a přístroje

Reagencie:

- nesrážlivý vzorek krve v EDTA
- diagnostické monoklonální sérum anti-A Sanquin/Exbio
- diagnostické monoklonální sérum anti-B Sanquin/Exbio
- diagnostické monoklonální sérum anti-A,B Sanquin/Exbio
- diagnostické monoklonální sérum anti-D 1 IgM IVT
- diagnostické monoklonální sérum anti-D 2 IgM Milipore/Dynex
- diagnostické monoklonální sérum anti-D 3 IgM/IgG Milipor/Dynex
- negativní kontrola (monoclonal control) Milipor/Dynex
- typové erytrocyty A₁, B, 0 TRS Nemocnice České Budějovice, a.s.
- typové erytrocyty A₁, B DiaMed/BioRad
- screeningový panel diagnostických erytrocytů ID-DiaCel I-II-III DiaMed/BioRad
- směsné (poolované) diagnostické erytrocyty ID-DiaCell Pool DiaMed/BioRad
- vnitřní kontrola kvality DiaMed Basic Q. C. 1, 2 DiaMed/BioRad
- polyspecifické AHG IVT
- sensibilizované erytrocyty (antiglobulin control) Check cell (Weak) Immucor
- plastová mikrotitrační deska DiaMed-MP Test (používaná kombinace A, B, AB, DVI-, DVI+, ctl / A₁, B) DiaMed/BioRad
- ID karty LISS/Coombs kombinované s AHG polyspecifické DiaMed/BioRad
- ID-Diluent 2 (modifikovaný LISS) DiaMed/BioRad
- ID-Diluent 1 (modifikovaný bromelin) DiaMed/BioRad
- promývací roztok A (Washsolution) DiaMed/BioRad
- promývací roztok B (Washsolution) DiaMed/BioRad
- pufovaný fyziologický roztok (PBS) Nemocnice České Budějovice, a.s. Lékárna

Spotřební materiál:

- jednorázové plastové pipety 3ml
- stojánky na zkumavky
- jednorázové Wassermannovy a aglutinační zkumavky
- vícekanálová pipeta 10-200 μ l
- ID-pipetor EP5
- špičky k pipetám
- stojánky na zkumavky
- plastová mikrotitrační deska typu „U“
- rukavice
- stojan na zkumavky a ID-karty DiaMed/Biorad
- zásobník s rozplňovačem na ID-Diluent 2 a na ID-Diluent 1

Přístroje:

- centrifuga Hettich universal 320
- centrifuga Hettich universal 32
- centrifuga Rotofix
- mikroskop Binokul-Zeiss
- třepačka mikrotitračních desek Heidolph Titramax 100
- centrifuga DiaMed ID 1202
- inkubátor DiaMed DG 223
- imuno hematologický analyzátor Techno TwinStation
- Lyra reader MP
- imuno hematologický poloautomat Qasar IV
- Duet reader

3.3.2 Vyšetření AB0 RhD ve zkumavkách

Postup:

1 kapka = 50 μ l

Z vyšetřovaných vzorků nejdříve připravíme do popsaných Wassermannových zkumavek 5% náplav erytrocytů v PBS. Zkumavky vyšetřovaných vzorků poté centrifugujeme 5 minut při 1000ot./min, oddělí se plazma od erytrocytů.

Schéma pro vyšetření pacientů: anti-A, anti-B, anti-A,B, anti-D 1, anti-D 2, negativní kontrola, typové erytrocyty A₁, B.

Schéma pro vyšetření dárců: anti-A, anti-B, anti-D 2, anti-D 3, negativní kontrola, typové erytrocyty A₁, B, autokontrola.

Do předem popsaných aglutinačních zkumavek nakapeme po 1 kapce diagnostických sér a typových erytrocytů. Do zkumavek s diagnostickými séry nakapeme 1 kapku vyšetřovaného náplavu erytrocytů. Do zkumavek s typovými erytrocyty nakapeme po 1 kapce vyšetřované plazmy. Centrifugujeme 1 minutu při 1000ot./min.

Jemným poklepem na dno zkumavky odečteme aglutinaci. Výsledky zaznamenáme do primární dokumentace (SOP TRS).

3.3.3 Vyšetření AB0 RhD na mikrotitračních deskách

Postup:

Z vyšetřovaných vzorků nejdříve připravíme do popsaných Wassermannových zkumavek 5% náplav erytrocytů v ID-Diluentu 1 pro vyšetření pacientů. Pro vyšetření dárců připravíme 5% náplav erytrocytů v PBS. Poté vyšetřované vzorky centrifugujeme 5 minut při 1000ot./min., oddělí se plazma od erytrocytů.

Schéma pro vyšetření pacientů: anti-A, anti-B, anti-A,B, anti-DVI-, anti-DVI+, negativní kontrola, typové erytrocyty A₁, B. Do mikrotitrační desky nakapeme ID-pipetorem EP5 do jamek s diagnostickými séry 50 μ l náplavu erytrocytů, do prázdných jamek přidáme 50 μ l vyšetřované plazmy a 50 μ l typových erytrocytů.

Schéma pro vyšetření dárců: anti-A, anti-B, anti-D 1, anti-D 2, negativní kontrola, typové erythrocyty A₁, B, autokontrola. Do prázdné mikrotitrační desky nejdříve nakapeme vícekanálovou pipetou 25μl diagnostická séra a typové erythrocyty. Poté ID-pipetorem EP5 přidáme 25μl erythrocytového náplavu k diagnostickým sérům a do poslední prázdné jamky. Přidáme stejné množství plazmy k typovým krvinkám a vlastnímu náplavu erythrocytů v poslední jamce. Inkubujeme 10 minut při pokojové teplotě.

Centrifugujeme 1 minutu při 1000ot./min. Protřepeme na třepače mikrotitračních desek Heidolph Titramax 100 2 minuty při 900vibracích/min., pak 30 vteřin při 300 vibracích/min. Odečítáme aglutinaci v jednotlivých jamkách (SOP TRS).

3.3.4 Vyšetření screeningu protilátek ve zkumavkách

Postup:

1 kapka = 50μl

Vyšetřované vzorky centrifugujeme 5 minut při 5000ot./min. Do popsaných zkumavek nakapeme 2 kapky vyšetřované plazmy a 2 kapky diagnostických erythrocytů v PBS. Pro vyšetření pacientů použijeme screeningový panel ID-DiaCel I-II-III. Pro vyšetření dárců použijeme poolované erythrocyty. Inkubujeme 60 minut při 37°C. Promyjeme zkumavky v nadbytku PBS, opakujeme 3x. Přidáme 2 kapky AHG, inkubujeme 10 minut při 37°C. Centrifugujeme 1 minutu při 1000ot./min. Odečítáme makroskopicky i mikroskopicky (Sakalová et al. 1995).

3.3.5 Vyšetření screeningu protilátek na mikrotitračních deskách

Postup:

Vyšetřované vzorky centrifugujeme 5 minut při 5000ot./min. Do popsaných mikrotitračních desek nakapeme 25μl vyšetřované plazmy a 25μl diagnostických erythrocytů v PBS. Pro vyšetření pacientů použijeme screeningový panel ID-DiaCel I-II-III. Pro vyšetření dárců použijeme poolované erythrocyty. Inkubujeme

60 minut při 37°C. Promyjeme destičku v nadbytku PBS, opakujeme 3x. Přidáme 50μl AHG, inkubujeme 10 minut při 37°C. Centrifugujeme 1 minutu při 1000ot./min. Postupně roztřepáváme na třepačce. Odečítáme makroskopicky (Sakalová et al 1995).

3.3.6 Vyšetření screeningu protilátek gelovou sloupcovou aglutinací

Postup:

Vyšetřované vzorky centrifugujeme 5 minut při 5000ot./min. Do popsaných ID-karet nakapeme 50μl diagnostických erytrocytů, přidáme 25μl vyšetřované plazmy. Pro vyšetření pacientů použijeme screeningový panel ID-DiaCel I-II-III. Pro vyšetření dárců použijeme poolované erytrocyty. Inkubujeme 15 minut při 37°C. Centrifugujeme 10 minut při 906ot./min. Odečítáme makroskopicky (SOP TRS).

3.3.7 Vyšetření pacientů na analyzátoru Techno TwinStation

Obrázek 5: Analyzátor Techno TwinStation DiaMed/BioRad



Zdroj: Autor

Techno TwinStation (DiaMed/BioRad) je imuno hematologický analyzátor kombinující testování mikrotitračních desek přímou aglutinací a ID-karet gelovou sloupcovou aglutinací. Je prvním analyzátozem na našem oddělení určený

pro imunohematologická předtransfuzní vyšetření pacientů. Jedinou jeho chybou z pohledu nás uživatelů je nemožnost předřazení vyšetření s časovou naléhavostí požadavku statim. Využívá se pro vyšetření označená časovou naléhavostí požadavku standardně. Umožňuje plně pozitivní identifikaci vyšetřovaných vzorků, reagensů a ID-karet čárovými kódy, identifikaci obsluhy. Kontrolou je dávkování plazmy nebo séra. Elektronicky detekuje úroveň hladiny vzorků, reagensů a ID-Diluentů, detekuje sraženiny při nasávání erytrocytů. Detekuje promývací roztoky a odpad pomocí plováků. Nasává a promývá fluidní obvod. Zároveň probíhá automatická kontrola parametrů testů (čas, objemy, teplota), čísla šarží a expirací (DiaMed materiály firmy).

Naše oddělení na analyzátoru Techno TwinStation vyšetřuje krevní skupinu AB0 RhD, screening protilátek, test kompatibility. Je to plně automatizovaný systém pro vyšetřování na ID-kartách pro gelovou sloupcovou aglutinaci. Pro mikrotitrační desky nám slouží jako rozkapávač a inkubátor, tyto desky odečítáme na readeru Lyra, který je s analyzátozem propojen (Lyra MP reader je zároveň centrifuga, třepačka a čtecí zařízení pro mikrotitrační desky).

Obrázek 6: Lyra MP reader a software Maestro



Zdroj: Autor

Analyzátor se skládá ze vzorkového karuselu s kapacitou 36 vzorků, z karuselu pro reagentie s kapacitou 24 reagentií, z karuselu pro 3 mikrotitrační desky, 2 pipetovacích jehel a 2 centrifug s inkubátory na sobě navzájem nezávislými. Má k dispozici 2 obvody pro ID-Diluenty a promývací roztoky (Wash Solution A, B). K vyšetření lze použít výhradně reagentie firmy DiaMed/BioRad.

Sestava je řízena integrálním softwarovým produktem Maestro. Všechny operace jsou ovládány pomocí dotykového monitoru. Automat umožňuje obousměrnou komunikaci s laboratorním informačním systémem (LIS). K vyšetřovanému vzorku jsou přiřazena požadovaná vyšetření v LIS, provede se import do softwaru Maestro. Po skončení analýzy se vyšetření validují a exportují zpět do LIS. Denně se provádí archivace vyšetření (Techno TwinStation, Lyra návod k obsluze).

Postup:

Vyšetřované vzorky centrifugujeme 5 minut při 5000ot./min.

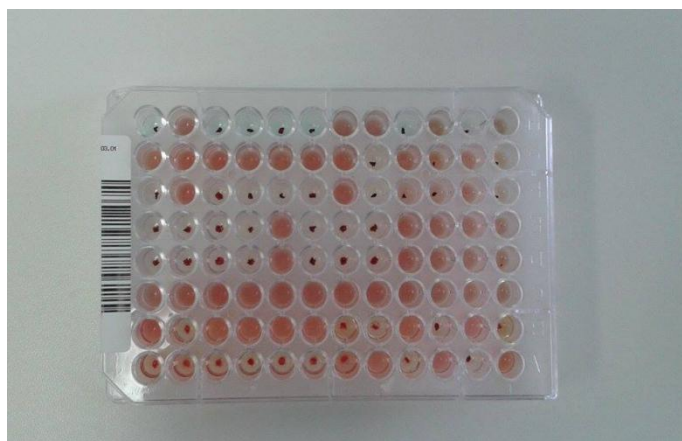
V LIS zadáme u vyšetřovaných vzorků požadovaná vyšetření (AB0 RhD, screening protilátek), provedeme převod do Maestra. Vložíme vyšetřované vzorky do vzorkového karuselu čárovým kódem do výřezu. Reagentie, destičky i karty jsou opatřeny čárovými kódy již od výrobce. V karuselu pro reagentie jsou vloženy typové erytrocyty A₁, B a diagnostické erytrocyty I, II, III. V karuselu pro mikrotitrační desky jsou vloženy 2 desky Dia Med-MP Test. Do centrifugy jsou vloženy 4 ID karty. Analýza se spustí tlačítkem START. Ovládání se provádí na dotykové obrazovce. Po rozkapání vzorků proběhne 10 minut inkubace mikrotitračních desek, ty se potom spolu se vzorky vyndají z analyzátoru a vloží se do readeru Lyra, kde proběhne jejich centrifugace, roztřepání a odečtení. Výsledky se automaticky přenesou do Maestra. Vyšetření screeningu protilátek probíhá zcela automatizovaně ve vložených ID kartách, rozkapání, 15 minut inkubace při 20°C, 15 minut inkubace při 37°C, 10 minut centrifugace, fotometrické odečtení, interpretace výsledků. Jeho průběh s časovým údajem sledujeme na obrazovce. Po skončení analýzy výsledky validujeme, provedeme export do LIS (SOP TRS).

Obrázek 7: Pozitivní screening protilátek



Zdroj: Autor

Obrázek 8: AB0 RhDDiaMed-MP Test



Zdroj: Autor

3.3.8 Vyšetření dárců krve na poloautomatu Qasar IV

Obrázek 9: Poloautomat Qasar IV



Zdroj: Autor

Qasar IV (HTZ/Dynex, UK) používáme na našem oddělení od roku 2012. Jeho předchůdcem byl Quasar používaný od roku 2000 a prvním rozplňovacím zařízením bylo SPD 2000 používané od roku 1990. Qasar IV má modulární konstrukci. To znamená, že si lze sestavit pracovní plošinu skládající se ze 4 modulů dle vlastní potřeby. Každý z modulů sestává buď z pozic pro 3 mikrotitrační desky anebo 16 gelových karet. Na pracovní plošině jsou dva stojánky pro mikrozkuhavky, kde se připravují erytrocytární náplavy z vyšetřovaných vzorků. Sestava našeho oddělení je tvořena 3 moduly pro mikrotitrační desky a 1 modulu pro gelové karty. K pipetování jsou k dispozici 2 pipetovací jehly. Karusel má kapacitu pro 96 zkumavek. Zásobník reagensů je chlazený s kapacitou pro 15 reagensů. Velká výhodou tohoto poloautomatu je ve volné volbě reagensů. Není vázána používáním reagensů od distributorské firmy.

Zahrnuje plně automatizovanou identifikaci vzorků, reagensů, mikrotitračních desek a gelových karet a obsluhy. Přístroj pracuje pouze při zavřeném bezpečnostním víku. Nabízí nejvyšší úroveň v přesnosti pipetování a v rychlosti analýzy (Dynex materiály firmy).

Naše oddělení zde provádí kompletní imunohematologická vyšetření u dárců krve, AB0 RhD, screening protilátek, Rh fenotyp a Kell.

Celá sestava je tvořena poloautomatem Qasar IV, 2 PC a Duet readerem, který využívá identifikační soubory z polautomatu Qasar IV. Toto vysoce citlivé zařízení měří a interpretuje aglutinační výsledky z mikrotitračních desek a gelových karet pomocí softwaru Aurora. Využívá čárových kódů destiček a karet. Oba přístroje jsou bezpečně spojeny, splňují nejpřísnější požadavky správné výrobní praxe pro transfuzní službu. Získané výsledky jsou automaticky převáděny do LIS (Qasar IV, Duet uživatelská příručka).

Obrázek 10: Duet



Dostupné z: <http://www.htz.biz/duet_main.htm>

Postup:

Vyšetřované vzorky centrifugujeme 5 minut při 5000ot./min.

Vzorky vložíme do vzorkového karuselu. Mikrotitrační desky polepíme čárovými kódy a vložíme do modulu pro mikrotitrační desky na pracovní plošinu přístroje. Do modulu pro gelové karty vložíme ID karty. V zásobníku reagentů máme uloženy tyto reagenty: anti-A, anti-B, anti-D 2, anti-D 3, negativní kontrolu, typové erythrocyty A₁, B, diagnostické erythrocyty poolované. Spustíme program pro společné rozplnění AB0 RhD a screening protilátek. Po dokončení rozkapání inkubujeme ID-karty

v inkubátoru DiaMed 15 minut při 37°C. Mikrotitrační desky centrifugujeme 1 minutu při 1000ot./min. Poté je roztřepeme na třepačce mikrotitračních desek Heidolph Titramax 100 2 minuty při 900 vibracích/min, 30 sekund při 300 vibracích/min. V softwaru Aurora pracujeme s měřením, vložené mikrotitrační desky jsou čteny v analyzátoru Duet. Lze vytisknout primární protokol.

ID-karty po skončení inkubace centrifugujeme 10 minut při 906ot./min.. Po centrifugaci jsou měřeny v analyzátoru Duet. Soubor těchto vyšetření je automaticky přenesen do LIS (SOP TRS).

Obrázek 11: AB0 RhD vyšetření dárců krve



Zdroj: Autor

Obrázek 12: Negativní screening protilátek



Zdroj: Autor

3.4 Postanalytická část

Postanalytická část byla provedena v souladu s Laboratorní příručkou Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s.

4 Výsledky

4.1 Porovnání vyšetření krevních skupin a screeningů protilátek různými metodami

V první praktické části byl použit soubor 24 vzorků pacientů jednoho dne spolu s 2 vzorky denní kontroly, u kterých jsou známy krevní skupiny a specifita antierytrocytárních protilátek. Manuální vyšetření bylo provedeno ve stejném sledu jako na analyzátoru, současně vyšetření krevních skupin a screeningu protilátek.

Tabulka 1. Porovnání vyšetření krevních skupin a screeningů protilátek u pacientů

Číslo pacienta	Krevní skupina			Screening protilátek			
	Manuál zkumavka	Manuál MP	Techno	Manuál zkumavka	Manuál MP	Manuál sloupcová aglutinace	Techno
xxx13579	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13580	AB+	AB+	AB+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13581	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13582	0+	0+	0+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13583	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13584	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13585	0+	0+	0+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13586	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13587	B+	B+	B+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13588	0+	0+	0+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13589	0+	0+	0+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13590	0+	0+	0+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13591	AB+	AB+	AB+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13592	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13593	0+	0+	0+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13594	0+	0+	0+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13595	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13596	0+	0+	0+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13597	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13598	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13599	0+	0+	0+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13600	B-	B-	B-	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13601	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx13602	B+	B+	B+	negativní	negativní	negativní	negativní
Basic Q. C. 1	A-	A-	A-	pozitivní reakce +	pozitivní reakce ++	pozitivní reakce ++	pozitivní reakce ++

Basic Q. C. 2	B+	B+	B+	pozitivní reakce +	pozitivní reakce ++	pozitivní reakce ++	pozitivní reakce ++
------------------	----	----	----	-----------------------	---------------------------	------------------------	------------------------

Zdroj: Autor

V další praktické části byl použit soubor 24 vzorků dárců krve jednoho dne spolu s 2 vzorky denní kontroly, u kterých jsou známy krevní skupiny a specifita antierytrocytárních protilátek. Manuální vyšetření bylo provedeno ve stejném sledu jako na analyzátoru, současně vyšetření krevních skupin a screeningu protilátek.

Tabulka 2. Porovnání vyšetření krevních skupin a screeningů protilátek u dárců krve

Číslo dárce krve	Krevní skupina			Screening protilátek			
	Manuál zkumav ka	Manuál MP	Qasar IV	Manuál zkumavka	Manuál ně MP	Manuál sloupcová aglutinace	Qasar IV
xxx08459	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08460	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08461	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08462	0+	0+	0+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08463	0-	0-	0-	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08464	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08465	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08466	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08467	B+	B+	B+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08468	0+	0+	0+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08469	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08470	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08471	A-	A-	A-	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08472	A-	A-	A-	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08473	AB+	AB+	AB+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08474	B+	B+	B+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08475	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08476	B-	B-	B-	negativní	negativní	negativní	negativní
xxxx0877	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08478	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08479	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08480	B+	B+	B+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08481	AB+	AB+	AB+	negativní	negativní	negativní	negativní
xxx08482	A+	A+	A+	negativní	negativní	negativní	negativní
Basic Q. C. 1	A-	A-	A-	pozitivní reakce +	pozitivní reakce ++	pozitivní reakce ++	pozitivní reakce ++

Basic Q. C. 2	B+	B+		pozitivní reakce +	pozitivní reakce ++	pozitivní reakce ++	pozitivní reakce ++
------------------	----	----	--	-----------------------	---------------------------	------------------------	------------------------

Zdroj: Autor

4.2 Porovnání finančních nákladů

Finanční náklady jsou vyjádřeny v příslušných tabulkách, vztahují se na cenu jednoho vyšetření. U reagensů bylo připočteno 10% obecně počítané ztráty.

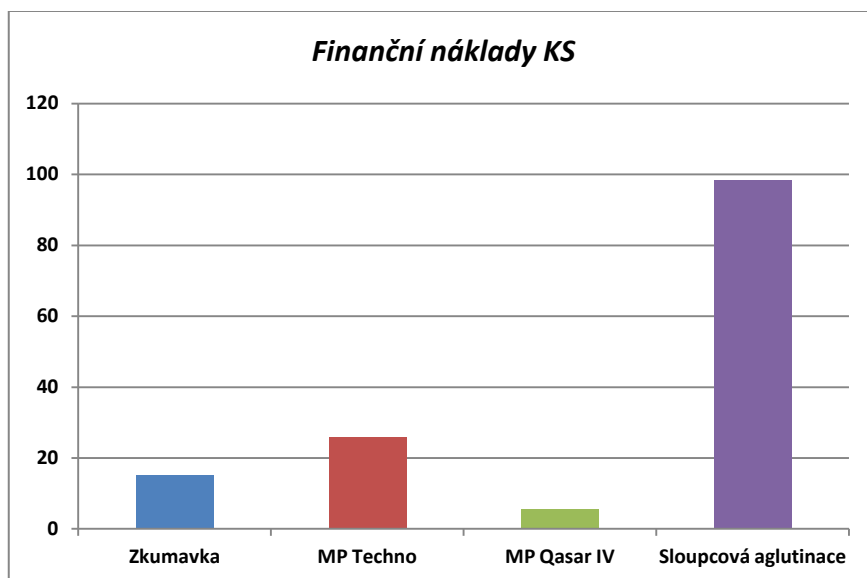
Kvantitativní vyjádření bylo provedeno pouze u v současné době používaných metod vyšetření. Navíc byla vyčíslena cena krevní skupiny sloupcovou aglutinací, přestože není prováděna, ale používaný analyzátor nám toto vyšetření umožňuje.

Tabulka 3. Finanční náklady na vyšetření 1 krevní skupiny v Kč s DPH

Materiál	Zkumavka	MP Techno	MP Qasar IV	Sloupcová aglutinace
Diagnostická séra	7,0		3,9	
Zkumavky	4,9			
MP			0,5	
MP Test		14,7		
Karta ABO/D				60,2
Karta NaCl				35,3
PBS	0,2		0,1	
ID-Diluent 1		9		9
Typové erytrocyty A ₁ , B		2,2		2,2
Pipety 3 ml	3			
Mikrozkumavky			1	
Celkem	15,1	25,9	5,5	98,3

Zdroj: Autor

Graf 1. Finanční náklady na vyšetření 1 krevní skupiny v Kč s DPH



Zdroj: Autor

Tabulka 4. Finanční náklady na vyšetření 1 screeningu protilátek v Kč s DPH

Materiál	Sloupcová aglutinace Techno	Sloupcová aglutinace Qasar IV
Screeningový panel	8,6	
Poolované erythrocyty		2,7
Karta LISS/Coombs	62,2	20,7
Celkem	70,8	23,4

Zdroj: Autor

4.3 Kvantitativní vyjádření úspor reagensů

Tabulka 5. Spotřeba reagensů na 1 zkumavku nebo 1 jamku v µl

Metoda	Zkumavka	Techno	Qasar IV	Manuálně sloupcová aglutinace
KS	50	50	25	50
screening protilátek	150	100	50	100

Zdroj: Autor

4.4 Časová náročnost vyšetření krevních skupin a screeningů protilátek

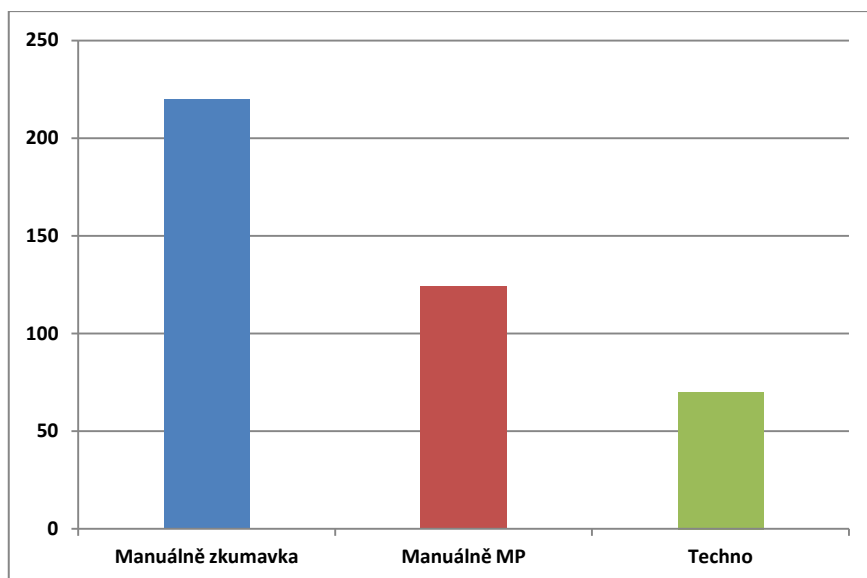
Časovou náročnost jsem vyjádřila ze souběžného vyšetření krevních skupin a screeningu protilátek stejně u pacientů jako u dárců krve ze souborů uvedených v části 4.1 (Porovnání vyšetření krevních skupin a screeningu protilátek různými metodami). Při manuálním vyšetření pro co nejekonomičtější využití času provádí se nejdříve rozkapání screeningu protilátek, během jeho inkubace se provádí vyšetření krevních skupin.

Tabulka 6. Časová náročnost souboru vyšetření krevních skupin a screeningů protilátek v minutách u pacientů

Činnosti	Manuálně zkumavka	Manuálně MP	Techno
Centrifugace vzorků	5	5	5
Označení	30	5	
Rozkapání	45	25	20
Inkubace	60	60	30
Promývání	20	13	
Centrifugace	1	1	10
Roztřepání		1,5	
Vyhodnocení	48	8	5
Kontrola se sensibilisovanými erytrocyty	6	2,5	
Roztřepání		1	
Vyhodnocení	5	2	
Celkem	220	124	70

Zdroj: Autor

Graf 2. Časová náročnost souboru vyšetření krevních skupin a screeningů protilátek v minutách u pacientů



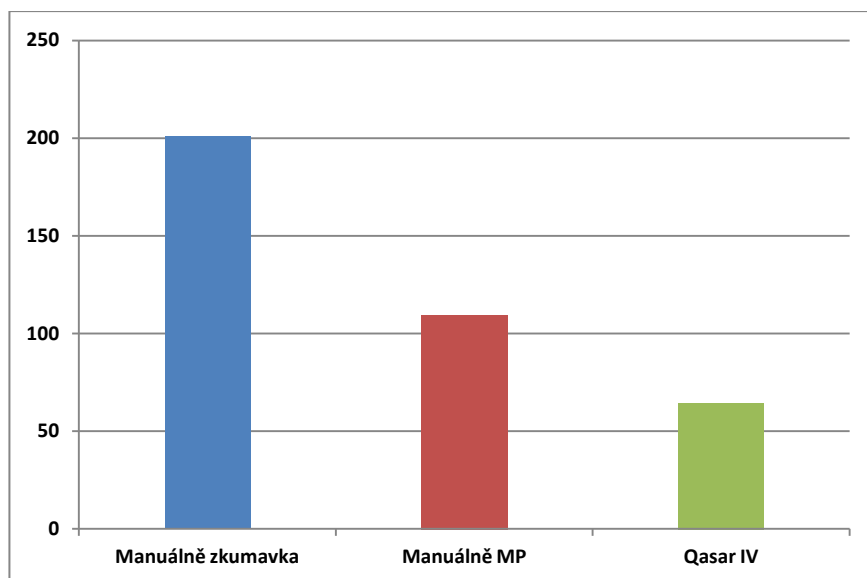
Zdroj: Autor

Tabulka 7. Časová náročnost souboru vyšetření krevních skupin a screeningů protilátek v minutách u dárců krve

Činnosti	Manuálně zkumavka	Manuálně MP	Qasar IV
Centrifugace vzorků	5	5	5
Označení	25	5	
Rozkapání	40	20	27
Inkubace	60	60	15
Promývání	15	9	
centrifugace	1	1	10
roztřepání		1,5	1,5
Vyhodnocení	25	4	6
Kontrola se sensibilisovanými erytrocyty	2	2	
Roztřepání		1	
Vyhodnocení	9	1	
Celkem	201	109,5	64,5

Zdroj: Autor

Graf 3. Časová náročnost souboru vyšetření krevních skupin a screeningů protilátek v minutách u dárců krve



Zdroj: Autor

4.5 Kvantitativní vyjádření úspory lidské pracovní síly

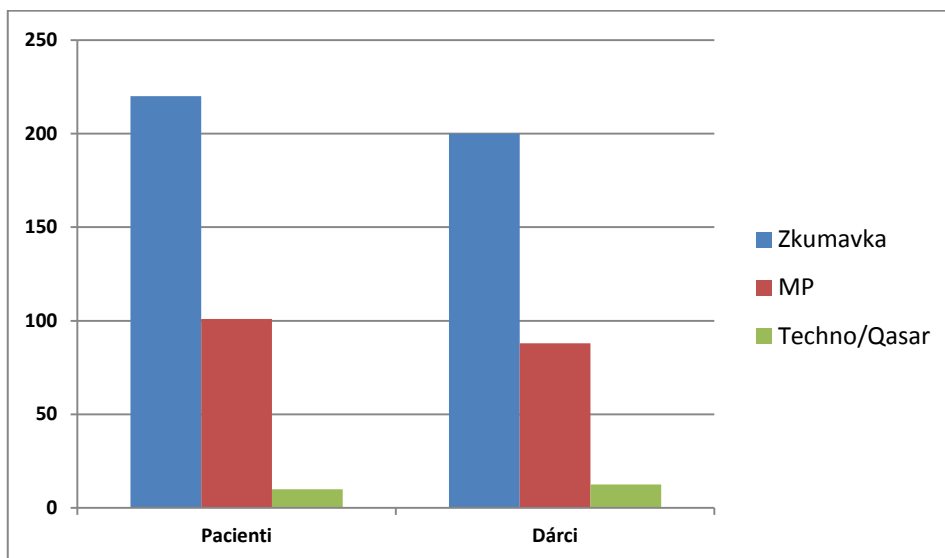
Vyjádření úspory lidské pracovní síly bylo vypočteno z předchozího oddílu 4.4 (Časová náročnost vyšetření krevních skupin a screeningů protilátek) odečtem doby, kdy pracovník manuálně neprovádí žádný úkon.

Tabulka 8. Vyjádření využití pracovní síly při zpracování souborů v minutách

Soubor	Zkumavka	MP	Techno
Pacienti	220	101	10
Soubor	Zkumavka	MP	Qasar IV
Dárci	200	88	12,5

Zdroj: Autor

Graf 4. Vyjádření využití pracovní síly při zpracování souborů v minutách



Zdroj: Autor

4.6 Pozitivní screening protilátek u dárců krve

Během roku 2013 bylo pouze 10 pozitivních screeningů protilátek u dárců krve vyšetřených na poloautomatu Qasar IV. Byly zpracovány dalšími metodami pro porovnání jejich citlivosti.

4.6.1 Poměr celkového počtu vyšetření k pozitivním

Tabulka 9. Počet vyšetřených screeningů protilátek u dárců krve v roce 2013

měsíc	počet	měsíc	počet
1	1364	7	1411
2	1396	8	1343
3	1319	9	1476
4	1433	10	1452
5	1497	11	1172
6	1288	12	1270
Počet vyšetřených screeningů protilátek: 16421			
Pozitivní screening protilátek: 10			

Zdroj: Autor

4.6.2 Porovnání výsledků různých metod vyšetření pozitivního screeningu protilátek u dárců krve

Jedná se o stejného dárce krve s protilátkou anti-D u vzorků č.: xxx00052 a xxx07753. Vzorky č.: xxx01434, xxx07187, xxx14840 s protilátkou anti-K náleží taktéž jednomu dárci krve.

Tabulka 10. Pozitivní screening protilátek u dárců krve

Dárci krve	Qasar IV	Manuál zkumavka	Manuál MP	Pohlaví	Určená specifita protilátky
xxx00052	+++	++	+++	Ž	anti-D
xxx01434	+	stopa	+ -	M	anti-K
xxx05495	++	+	++	Ž	anti-M
xxx05623	+	stopa	+ -	Ž	anti-K
xxx07187	+	stopa	+ -	M	anti-K
xxx07753	+++	++	+++	Ž	anti-D
xxx10720	++	+	++	Ž	anti-D, anti-C
xxx12488	++	+	++	Ž	anti-c
xxx14840	+	stopa	+ -	M	anti-K
xxx15612	++	+	++	Ž	anti-Le ^a

Zdroj: Autor

4.7 Pozitivní screening protilátek u pacientů

Během roku 2013 bylo vybráno 10 pozitivních screeningů protilátek vykazujících slabé pozitivní reakce v automatu Techno TwinStation. Byly vyšetřeny dalšími metodami pro porovnání jejich citlivosti.

4.7.1 Porovnání různých metod vyšetření pozitivního screeningu protilátek u pacientů

Tabulka 11. Pozitivní screening protilátek u pacientů

Pacienti	Techno	Manuál zkumavka	Manuál MP	Pohlaví	Určená specifita protilátky
xxx10146	+	stopa	+ -	Ž	anti-Lu ^a
xxx12138	+	stopa	stopa	Ž	Anti-Jk ^a
xxx13663	+	+ -	+	Ž	anti-C
xxx15421	+	stopa	+ -	Ž	anti-D
xxx16427	+	stopa	+ -	M	anti-Jk ^b
xxx16819	+ -	negativní	stopa	M	anti-D
xxx17871	+	+ -	+ -	M	anti-E
xxx20445	++	+	++	Ž	anti-D
xxx20568	+	+ -	+ -	M	anti-K
xxx21186	+ -	negativní	stopa	Ž	anti-E

Zdroj: Autor

4.8. Možné chyby během vyšetření

Tabulka 12. Možnost chyby během jednotlivých kroků vyšetření

Možnost chyby	Manuál zkumavka	Manuál MP	Manuál sloupcová aglutinace	Techno	Qasar IV
Příprava náplavu	ano	ano	ano	ne	ne
Příprava reagensie	ano	ano	ano	ne	ano
Rozkapání reagensie	ano	ano	ano	ne	ne
Označení	ano	ano	ano	ne	ne
Rozkapání	ano	ano	ano	ne	ne
Vyhodnocení	ano	ano	ano	ne	ne
Zapsání do primární dokumentace	ano	ano	ano	ne	ne
Zadání do LIS	ano	ano	ano	ne	ne
Možnost chyby celkem	8	8	8	0	1

Zdroj: Autor

5 Diskuze

V bakalářské práci jsem se zaměřila na praktické provedení základních imunohematologických testů, krevní skupina a screening protilátek. Tyto testy jsou těmi nejdůležitějšími v rámci předtransfuzního vyšetření pacientů, vyšetření těhotných žen, novorozenců a hematologických pacientů, ale také při imunohematologickém vyšetření dárců krve. Zaměřila jsem se na jejich provedení různými technikami, aby bylo možno jejich srovnání, zejména ve vztahu k porovnání manuálního provedení s provedením automatickým.

Automatické provedení je možné až na základě zavedených nových vyšetřovacích metod v imunohematologii. Transfuzní oddělení českobudějovické nemocnice používá základní vyšetření ve zkumavkách pouze k vyšetření krevních skupin. To pouze v případech, kdy je nelze provést automaticky. Buď z časových důvodů (nejrychlejší způsob, jak zjistit krevní skupinu pacienta zůstává zkumavka) nebo pokud se jedná o ověření krevní skupiny (porovnání předchozího výsledku s výsledkem v LIS). Testy sloupcové aglutinace jako standardní vyšetření pro metodu NAT se používají k vyšetření screeningu protilátek, testů kompatibility, identifikaci protilátek. Provádí se jak manuálně, tak automaticky. U předtransfuzního vyšetření převládá vyšetření automatizované, pouze vyšetření statim a již známý pozitivní screening protilátek, vyšetření potransfuzních reakcí, vyšetření novorozenců, AIHA nebo odběr vyšetřovaného vzorku v nevhodné zkumavce je prováděno manuálně.

Porovnáním souborů 24 vzorků pacientů a 2 vzorků Basic QC a 24 vzorků dárců krve také s 2 vzorky Basic QC (Tabulka 1 a Tabulka 2) bylo zjištěno, že provedení jak manuální tak automatické zaručuje shodné výsledky. Všechna vyšetření krevních skupin měla jasné pozitivní reakce, neuvádím proto sílu reakcí, protože na výsledek krevní skupiny neměly žádný vliv. Pouze u manuálního vyšetření screeningu protilátek ve zkumavce byla u obou pozitivních vyšetření Basic QC zjištěna slabší reakce (viz Tabulka 1 a 2), což je způsobeno slabší citlivostí zkumavkové metody. Moje výsledky jsou ve shodě s korejskou studií z roku 2008 (Shin et al. 2008) a také s doporučením odborné společnosti (Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství

ČLS JEP č. STL2011_07), že na základě dlouhodobých výsledků externí kontroly kvality robustnější techniky dosahují lepší výsledky než metoda zkumavková.

Porovnání finančních nákladů pro vyšetření krevní skupiny poskytlo předpokládané výsledky. Nejlevnější je mikrotitrační deska vzhledem k nejmenšímu používanému objemu reagensů, volnosti volby používaných reagensů. To je výhodou používaného poloautomatu Qasar IV. Vzhledem k používání monoklonálních citlivých sér je možno pro vyšetření ve zkumavkách používat menší objemy, než tomu bylo dříve.

Cena krevní skupiny na analyzátoru Techno TwinStation je vyšší jednak používáním většího objemu reagensů a také díky tomu, že je již mikrotitrační deska dodávána s předkapanými lyofilizovanými reagensy. Výrazně nejvyšší je cena krevní skupiny vyšetřené sloupcovou aglutinací. Pro nás by měla tu výhodu, že by se vyšetření na analyzátoru Techno TwinStation stalo plně automatizovaným. Ovšem ekonomická rozvaha každého oddělení pořád zůstává velmi důležitá.

U screeningu protilátek je kvantitativní úspora reagensů u sloupcové aglutinace jak manuální tak oběma analyzátory oproti vyšetření ve zkumavce. Uvážíme-li pracnost tohoto vyšetření, časovou náročnost a neodmyslitelně hlavně nižší citlivost tohoto vyšetření bylo rozhodnutí o jeho nepoužívání správnou volbou. Rozdíl ve finančních nákladech pro vyšetření screeningu protilátek u pacientů a dárců krve je dán pouze možností používat u dárců krve poolované diagnostické erytrocyty.

Vyjádřená časová náročnost vyšetření jednotlivých souborů přinesla možnost jednoduchého kvantitativního vyjádření úspory lidské pracovní síly. Přinesla jednoznačný výsledek ušetření celkem dvou pracovních sil díky každému analyzátoru.

V Tabulce 10 je přehled deseti vyšetření pozitivního screeningu protilátek. Porovnáním síly reakcí při jednotlivých metodách přináší tyto výsledky. Manuální provedení na mikrotitrační desce je srovnatelné se sloupcovou aglutinací. Všechny reakce 2+ a 3+ jsou totožné. U reakcí 1+ sloupcovou aglutinací jsou na MP slabší. Manuální provedení ve zkumavce je vždy o jeden řád slabší. Toto porovnání jen potvrzuje hodnocení uvedené výše a také správnost rozhodnutí používat pro screening protilátek testy sloupcové aglutinace. Tento soubor byť malý zároveň dokazuje, že imunizace je možná v těhotenství nebo transfuzí. Soubor tvoří samé ženy a 1 muž.

Jedná se o pravidelného dárce krve, proto se v souboru opakuje 3x. Imunizován byl podáním transfuzního přípravku s antigenem jemu cizím. Tato skutečnost byla zjištěna v LIS. Soubor zároveň potvrzuje, že dárce krve patří k zdravým jedincům, porovnáme-li celkový počet vyšetření k pozitivním (Tabulka 9).

Tabulka 11 (Pozitivní screening protilátek u pacientů) srovnání metod v Tabulce 10 (Pozitivní screening protilátek u dárců krve) jen potvrdí. Zároveň upřesní, že slabé reakce spolehlivě zachycené sloupcovou aglutinací by test provedený ve zkumavce zachytit nemusel. Toto potvrzuje studie uvádějící citlivost sloupcové aglutinace 93,5-100% oproti 50% citlivosti zkumavkových metod (Bajpai et al. 2012).

V Tabulce 12 jsou zachyceny jednotlivé kroky během vyšetření, a jestli mohou přinést možnost chyby. Manuální provedení sebou nese možnost chyby ve všech uvedených kritických bodech. Automatizované pouze jednou u poloautomatu Qasar IV, kde je možnost chyby při přípravě reagensů protože nejsou opatřeny čárovými kódy. Jejich správné vložení do určené pozice v zásobníku reagensů je manuálním úkonem obsluhy. Obsluha má velkou pomoc v daném řídicím programu, kde na obrazovce přesně vidí, do které pozice danou reagensii vložit. Automat Techno TwinStation prošel všemi kritickými body bez možnosti chyby. Podle vybrané studie porovnám postupně výhody automatizace: snížení lidských chyb při identifikaci vzorku (čárový kód, nelze zaměnit vzorek), snížení lidské chyby při provádění zkoušky (ze správné čárovým kódem opatřené reagensie, do přesně označené jamky na kartách i MP čárové kódy, vzorky stejně značeny), subjektivní rozdíly při interpretaci výsledků (zachování obrazu, přesné fotometrické vyhodnocení), předcházení chybám při přepisu výsledků do dokumentace (není žádné přepisování, výsledky automaticky do LIS), zlepšení objektivity, reprodukovatelnosti, ukládání a načítání výsledků (vše bez zásahu obsluhy), zlepšení dohledatelnosti všech proměnných, vzorků, reagensů, obsluhy (automaticky ukládáno, archivováno, nepřepisuje se ručně jako u manuálního provedení), snížení manuálního vstupu obsluhy (volná pracovní síla) (Bajpai et al. 2012).

Měla bych uvést nevýhody automatizace. Z pohledu obsluhy (zdravotníka) žádné nevýhody neshledávám, za předpokladu dobrého servisního zajištění. Důležitá je i návaznost vlastního automatizovaného vyšetření na laboratorní informační systém.

6 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo praktické provedení imunohematologických metod různými postupy a manuální provedení porovnat s poloautomatem Qasar IV a automatem Techno TwinStation. Dále jsem vyhodnotila finanční náklady a vyjádřila jsem kvantitativně úsporu reagensií, lidské pracovní síly. Zhodnotila citlivost jednotlivých metod, daleko větší bezpečnost automatizovaného provedení. Zpracovala jsem soubor 24 vzorků pacientů a 24 vzorků dárců krve a 2 vzorky sloužící pro vnitřní kontrolu kvality, soubor 10 vzorků dárců krve a 10 vzorků pacientů s pozitivním screeninem protilátek. Výsledky jsem zanesla do tabulek a grafů. Cíl mé práce tím byl splněn.

Hypotéza, že při zkumavkové metodě je největší spotřeba reagensií, se potvrdila u screeningu protilátek. Částečně u vyšetření krevních skupin, tam pouze v porovnání s vyšetřením na mikrotitrační desce na poloautomatu Qasar IV. U ostatních metod se nepotvrdila.

Průkazem úspory lidské síly díky automatizaci na obou používaných analyzátorech se potvrdila druhá hypotéza.

Že je sloupcová aglutinace z používaných metod nejcitlivější, prokázala má vyšetření a potvrdila hypotézu třetí. Mé výsledky jsou podloženy uvedenými studii a doporučením odborné společnosti

Vymezení kritických bodů možné chyby jednotlivých kroků vyšetření jednoznačně potvrdilo, že nejbezpečnější je automatizované provedení metod. Tím se potvrdila i hypotéza čtvrtá.

7 Seznam použitých zdrojů

BAJPAI M., KAUR R., GUPTA E. *Automation in immunohematology*. Asian J Transfus Sci. 2012 Jul; 6(2):140-4 [cit. 2014-03-03]. DOI: 10.4103/0973-6247.98914. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3439752>>

BARTUŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. vydání. Praha: Grada, 2011. 168 s. ISBN 978-80-247-3533-7.

BOUIX, O., FERRERA, V., DELAMAIRE, M., REDESDORFF, J. C., ROUBINET, F. *Erythrocyte-magnetized technology: An original and innovative method for blood group serology*. Transfusion. 2008 Sep; 48(9):1878-85 [cit. 2014-03-03]. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01790.x. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18522706>>

DELAMAIRE, M. *Automatisation au laboratoire d'immunohématologie érythrocytaire*. Transfusion Clinique et Biologique. 2005 Jun; 12(2):163-8 [cit. 2014-03-03]. DOI: 10.1016/j.tracli.2005.04.005. Dostupné z: <<http://www.em-consulte.com/article/34365/alertePM>>

DIAMED, materiály firmy. Dostupné z: <<http://www.diamed.ch>>

DOBRÝ, E., KVASNIČKA, J., a kol. *Hematologie a transfuzní služba: Zdravotnické aktuality 211*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1987. 310 s. ISBN 73521-08/9.

Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_07 ze dne 1. 3. 2011 verze 2 (2012_04). Dostupné z: <<http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>>

Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2011_08 ze dne 1. 3. 2011. Dostupné z: <<http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>>

Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2012_09 ze dne 19. 4. 2012. Dostupné z: <<http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>>

Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2012_10 ze dne 01. 11. 2012. Dostupné z: <<http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>>

DUGUID, J. K., BROMILOW, I. M. *New technology in hospital blood banking*. J ClinPathol. 1993 Jul; 46(7):585-8 [cit. 2014-03-04]. DOI: 10.1136/jcp.46.7.585. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8157739>>

DYNEX, materiály firmy. Dostupné z: <<http://www.dynex.cz>>

ENGELFRIET, C. P., MEULENBROEK, A. J., et al. *Imunohematologie*. 1. vydání. Amsterdam: Sanquin Blood Supply Foundation, 2003. 142 s. ISBN 90-5267-029-3.

FÁBRYOVÁ, V., a kol. *Imunohematológia a transfúzna medicína pre prax*. 1. vydání. Bratislava: Grada, 2012. 224 s. ISBN 978-80-8090-002-1.

GAROZZO, G., LICITRA, V., CRISCIONE, R., COMITINI, N., NOTO, Ch., LOMAGNO, R., RUTA, D., SPADOLA, G., ZAGO, V., BONOMO, P. *A comparison of two automated methods for the detection and identification of red blood cell alloantibodies*. BloodTransfusion. 2007 Jan; 5(1):33-40 [cit. 2014-03-03]. DOI: 10.2450/2007.0022-06. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204749>>

HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Triton, 2009. 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.

HRUBIŠKO, M., a kol. *Hematologie a krevní transfúze II: Krevní transfúze*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1983. 206 s. ISBN 08-056-83.

KATOVSKÁ, E., KUPSKÁ, L. *3 650 dní poté aneb automatizace imunohepatologických laboratoří ve FN Brno* Přednáška Praha 2013. Dostupné z: <http://www.uvn.cz/attachments/318_05_katovska_Automatizace.pdf>

Laboratorní příručka Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s.
Dostupné z:
<http://www.nemcb.cz/_data/files/NCB_TRS_SME_12_002%20Laboratorni%20priruc ka.pdf>

MANNESSIER, L. *Nouvel arrêté de bonnes pratiques d'immunohématologie : analyse critique*. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2003 Jun; 10(3):201-5 [cit. 2014-03-04]. DOI: 10.1016/1246-780(03)00056-9. Dostupné z: <<http://www.em-consulte.com/article/15802/alertePM>>

PECKA, M. *Základy imunohepatologie a transfuziologie*. 1. vydání. Hradec Králové: Střední zdravotnická škola a Vyšší zdravotnická škola Hradec Králové, 2005. 139 s. ISBN 80-903414-4-6.

PENKA, M., TESAŘOVÁ, E., a kol. *Hematologie a transfuzní lékařství II: Transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada, 2012. 192 s. ISBN 978-80-247-3460-6.

QASAR IV, READER DUET, uživatelská příručka.

ŘEHÁČEK, V., MASOPUST, J., a kol. *Transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada, 2013. 240 s. ISBN 978-80-247-4534-3.

SAKALOVÁ, A., LIPŠIC, T., a kol. *Hematológia a transfuziológia*. Martin: Osvěta 1995. 527 s. ISBN 80-217-0444-6.

SANDLER, S. G., LANGEBERG, A. RUMSEY, D. H., NOVAK, S. C. *A solid phase and microtiter plate hemagglutination method for pretransfusion compatibility testing*. *Haematologia*. 2000; 30(3):149-57 [cit. 2014-03-04]. DOI: 10.1163/156855900300109/43. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11128107>>

SANDLER S. G., LANDEBERG A., AVERY N., MINTZ P. D. *A fully automated blood typing systém for hospital transfusion services*. *Transfusion*. 2000 Feb; 40(2):201-7 [cit. 2014-03-04]. DOI: 10.1046/j.1537-2295.2000.40020201.x. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686004>>

SHIN S. Y., KWON K. C., KOO S. H., PARK J. W., KO C. S., SONG J. H., SUNG J. Y. *Evaluation of two automated instruments for pre-transfusion testing: AutoVue Innova and Techno TwinStation*. *Korean J Lab Med*. 2008 Jun; 28(3):214-20 [cit. 2014-03-04]. DOI: 10.3343/kjlm.2008.28.3.214. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18594174>>

SOUTH S. F., CASINA T. S., LI L. *Exponential error reduction in pretransfusion testing with automation*. *Transfusion.*, 2012 Aug; 52(8):81S-87S [cit. 2014-03-5]. DOI: 10.1111/j.1537-2995.22012.03816.x. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22882101>>

Standardní operační postupy Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s.

TECHNO návod k obsluze H 007 262 06.05V 1.1; *LYRA* návod k obsluze Doc N°H 007219 07.06 V 5.1

TESAŘOVÁ, E., a kol. *Vybrané kapitoly: Transfuzní lékařství a imunohematologie*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství nelékařských zdravotnických oborů, 2007. 112 s.

WEISBACH V., KOHNHAUSER T., ZIMMERMANN R., RINGWALD J., STRASSER E., ZINGSEM J., ECKSTEIN R. *Comparison of the performance of microtube column systems and solid-phase systems and the tube low-ionic-strength solution additive indirect antiglobulin test in the detection of red cell alloantibodies*. *Transfus Med.* 2006 Jun; 16(4):276-84 [cit. 2014-03-05]. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2006.0074.x. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16879156>>

ZEDNÍČEK, O. *Automatizace v imunohematologii-včera, dnes a zítra?* Přednáška Praha 2007. Dostupné z: <<http://www.eurexmedica.cz/files/0000000042.pdf>>

ZIMA, T. *Laboratorní automatizace proč a jak?* Přednáška 2007. Dostupné z: <<http://www.ulbld.lf1.cuni.cz/files/479/automatizace%20FONS%2010%2005.pdf>>

8 Klíčová slova

Imunohematologie

Krevní skupina

Screening protilátek

Automatizace

Sloupcová aglutinace

Key words

Immunohematology

Blood group

Antibody screening

Automation

Column agglutination