

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
katedra biologických a lékařských věd

**Rh systém**  
**Antigeny a protilátky**

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: prim. MUDr. Vít Řeháček

Školitelka: prim. MUDr. Zdenka Hřebočková

Hradec Králové, 2010

Zdeňka Masopustová

Děkuji MUDr. Zdence Hřebačkové, primářce transfuzního a hematologického oddělení Kroměřížské nemocnice a.s., za cenné připomínky a konzultace při psaní této bakalářské práce. Děkuji prim. MUDr. Vítu Řeháčkovi za vedení bakalářské práce a odbornou pomoc.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny prameny, z nichž jsem čerpala způsobem ve vědecké práci obvyklým. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Zdeňka Masopustová

# Obsah

Obsah .....	4
Seznam použitých zkratek .....	7
<b>1. Úvod a zadání práce.....</b>	<b>8</b>
<b>2. Teoretická část.....</b>	<b>9</b>
2.1. Obecná imunologie .....	9
2.1.1. Antigen (imunogen).....	9
2.1.2. Protilátky.....	10
2.1.2.1. Struktura imunoglobulinu.....	10
2.1.2.2. Třídy.....	11
2.1.2.2.1. IgG.....	11
2.1.2.2.2. IgA.....	12
2.1.2.2.3. IgM.....	12
2.1.2.2.4. IgD.....	12
2.1.2.2.5. IgE.....	12
2.1.2.3. Přirozené protilátky.....	12
2.1.2.4. Imunní protilátky.....	13
2.1.2.5. Protilátky kompletní.....	13
2.1.2.6. Protilátky inkompletní.....	13
2.2. Skupinový systém Rh.....	14
2.2.1. Historie Rh systému.....	14
2.2.1.1. Dědičnost a názvosloví Rh systému.....	14
2.2.1.1.1. Wienerova koncepce Rh systému.....	14
2.2.1.1.2. Fisherova a Raceova koncepce Rh systému.....	15
2.2.1.1.3. Koncepce dvou lokusů.....	15
2.2.2. Antigeny a genové komplexy Rh.....	17
2.2.2.1. Antigen D (RH1).....	17
2.2.2.2. Antigeny C a c (RH2,RH4).....	18
2.2.2.3. Antigeny E a e (RH3,RH5).....	18
2.2.3. Protilátky Rh systému.....	20
2.2.3.1. Protilátka anti-D.....	20
2.2.3.2. Protilátka anti-D weak.....	20
2.2.3.3. Protilátka anti-C.....	20

2.2.3.4. Protilátka anti–c.....	20
2.2.3.5. Protilátka anti–E.....	20
2.2.3.6. Protilátka anti–e.....	21
2.3. Nemoci spojené s protilátkami.....	22
2.3.1. Akutní (intravaskulární) potransfuzní hemolytická reakce.....	22
2.3.1.1. Hemolytické reakce s IgG protilátkami.....	22
2.3.2. Pozdní potransfuzní hemolytická reakce.....	22
2.3.3. Hemolytické onemocnění novorozence.....	23
2.3.3.1. Hemolytické onemocnění novorozence při Rh inkompatibilitě.....	23
2.3.4. Autoimunitní hemolytická anémie (AIHA).....	24
2.3.4.1 Autoimunitní hemolytická anémie s tepelnými protilátkami.....	24
2.3.4.2 Autoimunitní hemolytická anémie s chladovými protilátkami.....	24
2.3.4.3 Paroxysmální chladová hemoglobinurie .....	24
2.3.4.4 Polékové hemolytické anémie.....	24
2.4. Imunohematologické vyšetřovací metody.....	25
2.4.1. Laboratorní vyšetření antigenů Rh systému.....	25
2.4.1.1. Zkumavková metoda.....	25
2.4.1.2. Sloupcová (gelová) aglutinace.....	25
2.4.1.3. Přímá nekompetitivní ELISA - "Sandwich".....	26
2.4.1.4. Molekulárně biologické metody.....	27
2.4.1.4.1. Kvantitativní PCR.....	27
2.4.2. Laboratorní vyšetření protilátek.....	28
2.4.2.1. Zkumavková metoda.....	28
2.4.2.1.1. Vyšetření v solném prostředí – přímá aglutinace....	28
2.4.2.1.2. Enzymový test.....	28
2.4.2.1.3. Antiglobulinové testy.....	28
2.4.2.2. Metoda sloupcové (gelové) aglutinace.....	29
2.4.2.3. Nepřímá kompetitivní ELISA.....	30
2.4.2.4. Určení specifity protilátek.....	31
<b>3. Experimentální část.....</b>	<b>32</b>
3.1. Screening protilátek.....	32
3.2. Identifikace protilátek.....	33
<b>4. Výsledky a diskuse.....</b>	<b>34</b>

4.1. Screening protilátek v roce 2005.....	34
4.2. Screening protilátek v roce 2006.....	35
4.3. Screening protilátek v roce 2007.....	36
4.4. Screening protilátek v roce 2008.....	37
4.5. Screening protilátek v roce 2009.....	38
4.6. Vyhodnocení.....	39
<b>5. Závěr.....</b>	<b>42</b>
<b>6. Seznam použité literatury.....</b>	<b>43</b>
<b>Abstrakt.....</b>	<b>45</b>

## Seznam použitých zkratk

AIHA	Autoimunitní hemolytická anémie
HON	Hemolytické onemocnění novorozence
PAT	Přímý antiglobulinový test
NAT	Nepřímý antiglobulinový test
Ig	Imunoglobulin
Ag	Antigen
Ab	Protilátka
ISBT	International Society of Blood Transfusion, mezinárodní společnost pro krevní transfuze
LISS	Low Ionic Strength Solution, roztok o nízké iontové síle
AGH	Antiglobulinum humanum, protilátka proti lidské bílkovině
PCR	Polymerásova řetězová reakce
LFA	Low frequency antigens, antigeny o nízké frekvenci výskytu
HFA	High frequency antigens, antigeny o vysoké frekvenci výskytu
ELISA	Enzym-Linked Immuno Sorbent Assay

## 1. Úvod a zadání práce

Rh systém představuje soubor celé řady klinicky významných antigenů, vyskytujících se na membráně erytrocytů. Tyto antigeny spolu s příslušnými protilátkami hrají důležitou roli při potransfuzních reakcích, hemolytickém onemocnění novorozence či autoimunitní hemolytické anémii. Detekce těchto antigenů je založena na reakci příslušného antigenu a specifické protilátky. Proto je správné určení Rh antigenů důležité pro léčbu a prevenci těchto stavů. Antigeny Rh systému patří mezi nejúčinnější a nejsilnější antigeny. Tvorba protilátek proti těmto antigenům závisí jak na vnímavosti každého jedince, tak na četnosti kontaktu s antigenem. Protilátky se mohou vytvořit jak při transfuzi, tak také během těhotenství, kdy matka a dítě nemají shodný genotyp. V případě neshody genotypu matky a dítěte se může vyskytnout hemolytické onemocnění novorozence (HON). Proto je nutné v těhotenství nebo před podáním transfuze vyšetřit tyto pacienty, zda nemají v séru protilátky, a tím předejít nežádoucím komplikacím.



## 2. Teoretická část

### 2.1. Obecná imunologie

#### 2.1.1. Antigen (imunogen)

Antigen je složitá organická molekula schopná vyvolat imunitní odpověď. Antigen se nachází na povrchu buněk nebo je rozpuštěný v tělních tekutinách. Na svém povrchu má určité specifické struktury tzv. antigenní determinanty, které se váží se specifickou protilátkou. Obvykle jsou to bílkoviny nebo jednoduché cukry spojené do polysacharidů. Na povrchu krevních buněk (erytrocyty, leukocyty, trombocyty) se nacházejí antigenní struktury, které jsou jedinečné pro určitý druh krevní buňky (např. skupinový systém Rh se vyskytuje jen na erytrocytech), jiné se mohou nacházet na různých druzích krevních elementů. Většina membránových proteinů je bohatá na jednoduché cukry – oligosacharidy. Glykoproteiny, glykolipidy, ale i další membránové proteiny jsou známé jako antigeny krevních skupin. Proces, při kterém organismus rozpozná antigen a reaguje na něj aktivací určitého druhu bílých krvinek nebo tvorbou protilátek, se nazývá imunizace<sup>1</sup>.

Druhy antigenů jsou uvedeny v tab. č. 1.

Tab. č. 1 Druhy antigenů (převzato z<sup>2</sup>)

Druh antigenu	Charakteristika	Příklad
exoantigen	antigen vnějšího původu	mikroorganismy
autoantigen	antigen vnitřního původu	jaderné antigeny cytoplazmatické antigeny tkáňově specifické antigeny
superantigen	antigen schopen vyvolat aktivaci velkého počtu lymfocytů	stafylokokový antigen
alergen	antigen schopný vyvolat u vnímavého jedince patologickou imun. reakci	pyly, součásti prachu, potraviny, léky aj.

## 2.1.2. Protilátky

Protilátka je látka bílkovinné povahy, která se specificky váže na antigen. Soubor všech protilátek séra se svými biochemickými vlastnostmi řadí mezi globuliny. Protože jejich úlohou je zajišťovat tzv. humorální obranu, tj. obranu pomocí rozpustných látek, označuje se celá tato skupina globulinů zapojených do obrany organismu jako imunoglobuliny. Imunoglobuliny se nachází v séru, tělních tekutinách a také na povrchu B-lymfocytů<sup>3</sup>.

### 2.1.2.1. Struktura imunoglobulinu.

Každá protilátka je složena ze dvou identických těžkých (označovaných H dle angl. heavy) a dvou identických lehkých řetězců (L dle angl. light). Lehké a těžké řetězce se liší počtem aminokyselin i molekulovou hmotností. Řetězce jsou vzájemně svázány kovalentními disulfidickými můstky. Celá makromolekula má tvar písmena ypsilon s výkyvnými raménky. Mezi lehkým a těžkým řetězcem se nachází vždy jeden disulfid; mezi dvěma těžkými řetězci jich bývá různý počet – dle třídy a podtřídy Ig. Na řetězcích jsou domény:

- Variabilní (V) - formuje rozpoznávací část pro Ag a vytváří vazebné místo.
- Konstantní (C) - určuje sekundární biologické funkce Ig, je totožná ve všech protilátkách téže třídy. Protilátky mají krátké biologické poločasy – od 2 do 23 dní.

Imunoglobulinové molekuly lze rozštěpit na dvě části pomocí enzymu papain, a to na Fab-fragment, který obsahuje vazebné místo pro Ag, a na Fc-fragment, který reaguje s Fc-receptory fagocytů.

Imunoglobulinové řetězce se dělí na:

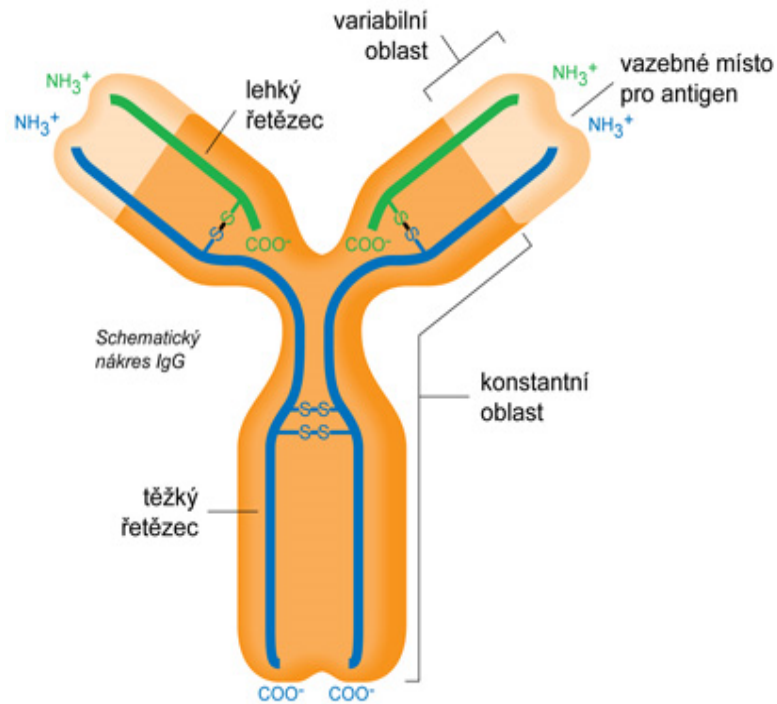
- **Lehké řetězce**

Sestávají se z variabilních a konstantních domén – ty bývají označovány jako VL a CL. Vyskytují se ve dvou typech:  $\kappa$  a  $\lambda$ . V jedné imunoglobulinové molekule jsou vždy oba řetězce téhož typu. Oba typy se v jedné molekule nevyskytují. U člověka je častější typ  $\kappa$ .

- **Těžké řetězce**

Na základě odlišnosti aminokyselin a cukerného složení se rozlišuje pět druhů těžkých řetězců. Bývají analogicky označovány řeckými písmeny ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ). V imunoglobulinové molekule se mohou vyskytovat jen dva souhlasné těžké

řetězce. Těžké řetězce mají určující úlohu pro dělení protilátek na třídy (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM). Liší se jak složením, tak svou velikostí<sup>3</sup>. Viz. obr. č. 1



Obr. č. 1 Struktura imunoglobulinu IgG (převzato z<sup>4</sup>)

## 2.1.2.2. Třídy

### 2.1.2.2.1. IgG

Je to nejhojněji vyskytující se třída, která převažuje všude v těle. Vyskytuje se výhradně ve formě monomeru. Díky této formě může pronikat přes placentu<sup>3</sup>.

#### **2.1.2.2.2. IgA**

Nacházíme ji ve dvou formách – slizniční a sérové. Slizniční IgA se skládá ze dvou monomerů spojených J-řetězcem a ze sekrečních komponent. Sérový IgA je buď monomer, dimer nebo trimer. Oligomery jsou spojeny J-řetězcem. IgA je základem slizniční imunity gastrointestinálního a dýchacího ústrojí. Podporuje fagocytární odstraňování cizích částic. Neaktivuje komplement, ale funguje jako opsonin. V těle je ho méně nežli IgG, ale celková denní produkce je nejvyšší ze všech imunoglobulinů, neboť má krátký poločas (přibližně čtyřikrát kratší než IgG). IgA je secernován do mateřského mléka<sup>3</sup>.

#### **2.1.2.2.3. IgM**

Vyskytuje se jako pentamer, což způsobuje také jeho vysokou molekulovou hmotnost kvůli které proniká jen těžko mimo cévní řečiště a při obraně se tedy uplatňuje zvláště intravaskulárně. Neprochází placentou. V těle se vytváří jako první imunoglobulin při styku s antigenem, teprve později se tvoří další izotopy. IgM je syntetizován již v zárodcích. Je zvláště účinný proti bakteriím a virům. Účinně aktivuje klasickou dráhu komplementu, avšak neváže se na Fc-receptory fagocytů<sup>3</sup>.

#### **2.1.2.2.4. IgD**

Je zastoupen relativně málo. Nachází se hlavně na povrchu B-lymfocytů, kde má funkci receptoru pro antigen. Vyvolává uvolňování histaminu z mastocytů a bazofilních leukocytů<sup>3</sup>.

#### **2.1.2.2.5. IgE**

Nachází se v množství ještě nižším než IgD. Protilátky IgE jsou zodpovědné za reakce časně přecitlivělosti a podílí se rovněž na obraně proti parazitům<sup>3</sup>.

### **2.1.2.3. Přirozené protilátky**

Přirozené protilátky se nacházejí v séru, tyto imunoglobuliny se v organismu tvoří přirozeným způsobem v průběhu života. Jsou tvořeny přirozeným kontaktem s mikroorganismy a jinými živočišnými strukturami životního prostředí. Patří do imunoglobulinové třídy IgM reagující při nižších teplotách. Mezi tyto protilátky patří například protilátky AB0 systému<sup>1</sup>.

#### **2.1.2.4. Imunní protilátky**

Tyto protilátky se tvoří po překonávání nemocí nebo po pasivním styku s antigenem. Bez tohoto styku by se nevytvořily. Příkladem tvorby imunních protilátek je těhotenství nebo krevní převody. Řadí se do imunoglobulinové třídy IgG a reagují při 37°C. Mezi imunní protilátky patří například anti-D, anti-C, anti-c, anti-E, anti-e<sup>1</sup>.

#### **2.1.2.5. Protilátky kompletní**

Patří do IgM třídy. Způsobují aglutinaci erytrocytů v solném prostředí.

#### **2.1.2.6. Protilátky inkompletní**

Patří do IgG třídy. U těchto protilátek aglutinace probíhá jen za přítomnosti suplementu, který zviditelní specifickou vazbu s odpovídajícím antigenem.

## 2.2. Skupinový systém Rh

### 2.2.1. Historie Rh systému

Tento komplikovaný a velmi důležitý skupinový systém objevili v roce 1940 Landsteiner a Wiener. Při pokusech, kterými chtěli připravit imunní séra anti-M a anti-N, imunizovali králíky krvinkami opice Macaca Rhesus. Zjistili imunní protilátku, která shlukovala lidské krvinky nezávisle na jiných skupinových systémech. Tento nový a do té doby neznámý antigen na lidských erytrocytech označili „faktor Rhesus“, zkráceně Rh faktor <sup>5</sup>.

Přibližně 83% evropské populace je RhD pozitivní a asi 17% RhD negativní. V západní Africe nebo Číně je frekvence RhD pozitivních 97% a RhD negativních 3%. Rh systém je složen z více než 50 antigenů (viz. tab. č. 3) nebo antigeních komplexů, z nichž každý může být definován vlastní specifickou protilátkou. V rutinní diagnostice však postačuje určení šesti základních antigenů C, c, D, E, e a C<sup>W</sup>. Tyto antigeny byly objeveny po roce 1940 v souvislosti s hemolytickými onemocněními novorozenců a s hemolytickými potransfuzními reakcemi.

#### 2.2.1.1. Dědičnost a názvosloví Rh systému

Dnes existuje několik navzájem odlišných imuno hematologických a genetických koncepcí skupinového systému Rh. Wienerova koncepce dnes už není zcela vyhovující pro svoji složitost. Druhá koncepce dle Fishera a Racea je jednodušší k pochopení celkových vzájemných spojitostí v Rh systému - viz. tab. č. 2. Třetí koncepce je založena na molekulárně-genetickém podkladě (viz. tab. č. 3).

##### 2.2.1.1.1. Wienerova koncepce Rh systému

Wiener považoval systém Rh za polyalelický systém, jehož geny formují antigen skládající se ze tří dílčích faktorů, schopných reagovat se dvěma až třemi specifickými antiséry. Geny označil symbolem Rh, jestliže šlo o pozitivní, a symbolem rh, když šlo o Rh negativní antigeny; brzy písmeno h vynechal a používal jen r, resp. R. Tyto symboly doplnil indexy, popř. různým typem písmen, aby odlišil jednotlivé komplexní antigeny. Uznával 10 základních („standardních“) genů a antigenů a jejich další více

nebo méně známé alely. Jeho koncepce je spíše sérologická, pro genetiku méně vyhovující, ale i méně pravděpodobná <sup>1,5,8</sup>.

### 2.2.1.1.2. Fisherova a Raceova koncepce Rh systému

Fisherova a Raceova koncepce vycházela z představy, že systém Rh je reprezentován třemi velmi úzce spojenými alelickými páry genů, které označují C – c, D – d a E – e. Sled těchto hustě vedle sebe uložených genetických míst v dědičném materiálu (v řetězci deoxyribonukleové kyseliny příslušného autozomu) je s největší pravděpodobností CDE, resp. dce, přičemž d je amorfní, bez vlastního antigenního produktu, proto se označuje také jako (d) nebo jednoduše výraznou tečkou (D/.). Každé z genového místa může mít více alel, variant, parciálních genů apod., jako to pozorujeme i v jiných skupinových systémech. Tři úzce svázaná místa dědičného materiálu vytvářejí na jednom autozomu jeden haplotyp <sup>1,5,8</sup>.

Četnost výskytu a kombinací je uvedena v tabulce č. 2 s uvedením obou nomenklatur v evropské populaci.

Tab. č. 2 Četnost výskytu a kombinací s uvedením obou nomenklatur (převzato z <sup>6</sup>)

CDE nomenklatura	Wienerova nomenklatura	Četnost
CDe	R <sub>1</sub>	40,55 %
cde	r	39,17 %
cDE	R <sub>2</sub>	14,16 %
cDe	R <sub>0</sub>	2,69 %
Cde	r'	0,94 %
cdE	r''	0,62 %
CDE	R <sub>z</sub>	0,23 %
CdE	r <sub>y</sub>	0,01 %

### 2.2.1.1.3. Koncepce dvou lokusů

Poslední genetické teorie ukázaly, že antigeny Rh systému jsou lokalizovány na Rh proteinech erytrocytové membrány. Antigeny Rh systému jsou produkty genů nacházejících se na chromozomu 1. Rozlišují se dva blízce podobné Rh proteiny, a to RhD a RhCcEe. Tyto proteiny jsou kódovány dvěma příbuznými geny, a to RHD

(1p34.2-p36), které určují přítomnost nebo nepřítomnost antigenu D, a RHCE (1p36.2-p34), které určují antigeny C/c a E/e<sup>13</sup>. Geny, které kódují C/c a E/e antigeny, jsou kodominantní alely. RHCE existuje ve čtyřech alelických formách a každá alela určuje vyjádření dvou antigenů v kombinacích Ce, ce, cE nebo CE. Kódující Rh glykoprotein je lokalizován na šestém chromozomu (6p11-21) a je označován RHAG. RHD a RHCE geny jsou velmi podobné, každý obsahuje deset exonů. Odpovídající polypeptidy jsou tedy velmi podobné, liší se pouze ve 36 ze 417 aminokyselinových zbytků v každém polypeptidu. S polymorfismem C/c souvisí substance 6 nukleotidů a následně 4 aminokyselin RhCcEe proteinu, polymorfismus E/e je určován pouze jednou nukleotidovou substancí a jednou změněnou aminokyselinou<sup>13,14</sup>.

V tabulce č. 3 jsou uvedeny antigeny Rh systému včetně ISBT nomenklatury, která je celosvětovým standardem pro identifikaci, označování a zpracování informací z lidské krve, buněk, tkání a orgánů.

Tab. č. 3 Antigeny Rh systému včetně nomenklatur a frekvencí výskytu (převzato z<sup>15</sup>)

Nomenklatura			
ISBT	tradiční	Sérologické vlastnosti	Frekvence
RH1	D	přítomnost/ absence D proteinu	b-85%, č-99%, a-99%
RH2	C	(Cys16, Ile60, Ser68) Ser103 na CcEe	b-68%, č-27%, a-93%
RH3	E	Pro226 na CcEe proteinu	b-29%, č-22%, a-39%
RH4	c	Pro103 na CcEe proteinu	b-80%, č-96%, a-47%
RH5	e	Ala226 na CcEe proteinu	b,č-98%, a-96%
RH6	f	antigeny c a e v cis pozici	b-65%, č-92%, a-12%
RH7	Ce	antigeny C a e v cis pozici	b-68%, č-27%, a-92%
RH8	C <sup>w</sup>	Gln41 na CcEe proteinu	b-2%, č-1%, ČR-6%
RH9	C <sup>x</sup>	Ala36 na CcEe proteinu	LFA (<0,01%)
RH10	V	Val245 Gly336 na CcEe proteinu	b-1%, č-30%
RH11	E <sup>w</sup>	Hybridní RhcE gen	LFA
RH12	G	Ser103 na D Ce(E) proteinu	b-84%, č-92%, a-100%
RH17	Hr <sub>o</sub>	(anti-RH17 u D--, D..., Dc, DC <sup>w-</sup> )	HFA (~100%)
RH18	Hr	(neg u Rh <sub>null</sub> , D--/D--, he <sup>S-</sup> )	HFA (~100%)
RH19	hr <sup>S</sup>	(anti-hr <sup>S</sup> reaguje silněji s f+)	HFA (98%)
RH20	VS	Val245 na CcEe	LFA č-32%
RH21	C <sup>G</sup>	(slabá forma C antigenu?)	b-68%
RH22	CE	antigeny C a E v cis pozici	<1% - 2% a
RH23	D <sup>w</sup>	u varianty D <sup>Va</sup> C(c)e	LFA
RH26	c-like	RH:-26=Ser96 na cE(e) proteinu	47-96%
RH27	cE	antigeny c a E v cis pozici	b-28%, č-22%, a-38%
RH28	hr <sup>H</sup>	v asociaci s antigenem VS	LFA



RH29	RH29	u všech Rh antigenů, chybí jen u Rh <sub>null</sub>	HFA
RH30	Go <sup>a</sup>	u varianty D <sup>IVa</sup>	LFA
RH31	hr <sup>B</sup>	(anti-hr <sup>B</sup> reaguje silněji s Ce)	HFA (98%)
RH32	=R <sup>N</sup>	u variant =R <sup>N</sup> DBT	LFA
RH33	Har	u varianty D <sup>Har</sup>	LFA
RH34	Hr <sup>B</sup>	(anti-Hr reaguje silněji s C+>c+>DcE/DcE)	HFA
RH35	1114	(Rh komplex se slabými C,e a normálním D)	LFA
RH36	Be <sup>a</sup>	(Rh komplex se slabými c, e, f, D-)	LFA
RH37	Evans	U variant D <sup>·</sup> a D <sup>IVb</sup>	LFA
RH39	C-like	(reaguje silněji s C+ než C-)	HFA
RH40	Tar	u varianty D <sup>VII</sup>	LFA
RH41	Ce-like	(na rozdíl od anti-Ce neg s C <sup>w</sup> e v cis pozici)	b-70%
RH42	Thornton	(anti-RH42 reaguje s komplexem Ce <sup>S</sup> )	LFA, č-2%
RH43	Crawford	(pouze jeden případ, nejistá souvislost s RH)	LFA
RH44	Nou	(anti-Nou separovatelná prostř. D <sup>IVa</sup> (C)- v anti-Hr <sub>o</sub> )	HFA
RH45	Riv	(kódován raritním komplexem D <sup>IVa</sup> (C)-	LFA
RH46	Sec	(anti-Sec u imunizovaných homozygotů Rh32)	HFA
RH47	Dav	(anti-Dav separovatelná prostř. D <sup>·</sup> v anti-Hr <sub>o</sub> )	HFA
RH48	JAL	(č=(c)(e) komplex, b=(C)(e)komplex)	LFA
RH49	STEM	(u Dce hr <sup>S</sup> nebo hr <sup>B</sup> negat.)	LFA, č-6%
RH50	EPTT	u varianty DFR a D <sup>Har</sup>	LFA
RH51	MAR	(MAR-jsou homozygotní pro C <sup>w</sup> a/nebo C <sup>x</sup> )	LFA
RH52	BARC	u varianty D <sup>IV</sup> Ce (typ II a III)	LFA

Obsolentní: RH13 (Rh<sup>A</sup>), RH14 (Rh<sup>B</sup>), RH15 (Rh<sup>C</sup>), RH16 (Rh<sup>D</sup>), RH24 (E<sup>T</sup>), RH25

## 2.2.2. Antigeny a genové komplexy Rh

### 2.2.2.1. Antigen D (RH1)

Rozdělení populace na RhD pozitivní a RhD negativní je podmíněno přítomností antigenu D, a to bez ohledu na to, zda je v homozygotní nebo heterozygotní formě. RhD pozitivní jsou buď DD nebo Dd, RhD negativní dd. Antigen D je ze všech antigenů Rh systému nejsilnější ve své antigennosti. RhD negativní lidé bývají ohroženi antigenem D, a to především po podání transfuze RhD pozitivní krve nebo těhotné ženy. Při imunizaci si tyto jedinci s RhD negativními antigeny mohou vytvořit protilátku anti-D. K této imunizaci postačí i několik desítek mililitrů RhD pozitivní krve. Antigen d neexistuje <sup>7</sup>.

Na místě alely D se mohou vyskytovat jak kvantitativně slabé D antigeny označované D weak (dříve označované D<sup>u</sup>), tak kvalitativně odlišné antigeny tzv. variantní. Nejčastější varianty D antigenů jsou D<sup>VI</sup>, D<sup>VII</sup>, DFR. Skupina D variant čítá více než dvě desítky různých fenotypů. Tyto varianty jsou charakterizovány absencí určitých Rh epitopů a možností vytvářet anti-D protilátky proti normálním Rh antigenům<sup>14</sup>.

#### **2.2.2.2. Antigeny C a c (RH2, RH4)**

C a c antigeny jsou produkty alel RHCE. Oproti antigenu D jsou antigeny C, c slabší ve své antigenosti. Gen C se vyskytuje nejčastěji v kombinaci s genem D, naproti tomu gen c je nejčastěji v kombinaci s genem d a e. Kombinace genů Dce je méně častá.

Na místě alely C se může vyskytovat více alel. Nejznámější je varianta C<sup>w</sup>, která může nahradit alelu C ve všech genových komplexech Rh. Alela C<sup>w</sup> se vyskytuje u pobaltských národů, a to kolem 8%. Alela c neobsahuje žádné známé varianty<sup>7,14</sup>.

#### **2.2.2.3. Antigeny E a e (RH3, RH5)**

E a e antigeny reprezentují další pár RHCE alel. Výskyt antigenu E není tak četný jako výskyt antigenu e. Antigen E se vyskytuje nejčastěji v kombinaci s antigenem D. Antigen E bývá nejčastější příčinou aloimunizace u těhotných žen.

Také na místech E a e se mohou vyskytovat další alely a varianty jako je zeslabený antigen E<sup>u</sup> nebo alela E<sup>w</sup><sup>7,14</sup>.

V tabulce č. 4 je uveden výskyt nejdůležitějších genotypů a fenotypů Rh systému s frekvencí výskytu ve střední Evropě.

Tab. č. 4 Výskyt nejdůležitějších genotypů a fenotypů Rh systému ve střední Evropě (převzato z <sup>6)</sup>)

FENOPTY		MOŽNÉ GENOTYPY	
CcDee	33,97%	CDe/cde	31,74%
		CDe/cDe	2,18%
		Cde/cDe	0,05%
CCDee	17,74%	CDe/CDe	16,42%
		CDe/Cde	0,76%
ccddee	15,34%	cde/cde	15,34%
CcDEe	12,42%	CDe/cDE	11,46%
		CDe/cdE	0,50%
		Cde/cDE	0,27%
		CDe/cde	0,18%
		CDE/cDe	0,01%
		CdE/cDe	< 0,01%
ccDEe	11,89%	cDE/cde	11,10%
		cDE/cDe	0,76%
		cdE/cDe	0,03%
ccDEE	2,18%	cDE/cDE	2,00%
		cDE/cdE	0,18%
ccDee	2,17%	cDe/cde	2,10%
		cDe/cDe	0,07%
Ccddee	0,74%	Cde/cde	0,74%
ccddEe	0,49%	CDE/CDe	0,49%
CCDEe	0,19%	CDE/CDe	0,19%
		CDE/Cde	< 0,01%
		CDE/cDE	0,06%
		CDE/cdE	< 0,01%
Ccddee	0,01%	Cde/Cde	0,01%
CcddEe	0,01%	Cde/cdE	0,01%
		CdE/cde	< 0,01%
99,65%		96,65%	

### **2.2.3. Protilátky Rh systému**

Protilátky v Rh systému jsou jen velmi zřídka přirozené. Zpravidla jsou získány imunizací následkem chybné transfuze nebo v těhotenství zásluhou difference antigenů matky a dítěte. Většinou jde o protilátky třídy IgG, méně často o IgM a zcela výjimečně o IgA protilátky. Reagují při 37°C a nevážou komplement.

#### **2.2.3.1. Protilátka anti-D**

Dříve byla nejdůležitější protilátkou, a to díky své síle. Může být příčinou hemolytické potransfuzní reakce, ale stejně tak i těžkého hemolytického onemocnění novorozence. V dnešní době není tak častá, a to hlavně díky včasné prenatální péči a převodům kompatibilní krve <sup>6</sup>.

#### **2.2.3.2. Protilátka anti-D weak**

D weak je kvantitativně slabý D antigen s menším počtem kopií proteinů. RhD negativní jedinci mohou tvořit protilátky nejen anti-D, ale také anti-D weak. U RhD pozitivních jedinců se protilátka anti-D weak nemůže vytvořit, protože by se mohla zaměřit i na vlastní D antigen <sup>9</sup>.

#### **2.2.3.3. Protilátka anti-C**

Tato protilátka se vyskytuje převážně u D negativních jedinců. D pozitivní naproti tomu tvoří vzácně anti-C. To je dáno různou skladbou antigenů v genotypu každého jedince. Protilátka anti-C je zpravidla směs protilátek anti-CC<sup>w</sup>, která bývá často provázena protilátkou anti-D <sup>6</sup>.

#### **2.2.3.4. Protilátka anti-c**

Tato protilátka se vyskytuje poměrně vzácně. Často je provázena protilátkou anti-E, velmi vzácně protilátkou anti-e. Vytvořit protilátku anti-c jsou schopni jen ti jedinci, kteří mají antigen C v homozygotní formě <sup>6</sup>.

#### **2.2.3.5. Protilátka anti-E**

Patří k poměrně častým protilátkám, zejména u těhotných žen. Může se vyskytovat společně s protilátkou anti-D a občas i jako protilátka přirozená.

Je častější než anti–C. Po anti–D je to nejčastější protilátka, může se vyskytovat společně s ní <sup>6</sup>.

#### **2.2.3.6. Protilátka anti–e**

Je extrémně vzácná protilátka, protože počet e negativních jedinců, tedy potenciaálně schopných vytvořit protilátku, je malý <sup>6</sup>.

## **2.3. Nemoci spojené s protilátkami**

### **2.3.1. Akutní (intravaskulární) potransfuzní hemolytická reakce**

Účinkem protilátky přítomné v plazmě příjemce dochází k rychlé destrukci erytrocytů. Zřídka dochází k rozpadu erytrocytů příjemce v důsledku přítomnosti protilátek dárce v transfuzním přípravku <sup>10</sup>.

#### **2.3.1.1. Hemolytické reakce s IgG protilátkami**

Tyto reakce jsou způsobeny protilátkami namířenými nejčastěji proti antigenům systému Rh (anti-D), Kell atd. Nejde o přirozené protilátky, příjemce musí být v době podání transfuzního přípravku senzibilizován. Pravděpodobnost je nejvyšší u polytransfundovaných pacientů, ale také u těhotných žen. Hemolýza nastává ve slezině, kde jsou vychytávány erytrocyty povlečené IgG protilátkou. Protilátku, která způsobila hemolýzu, je nutno vždy přesně identifikovat. V předtransfuzním vzorku nemusí být zjistitelná běžnými vyšetřovacími metodami. Po transfuzi bývá protilátka detekována jen výjimečně, protože sérum po hemolýze protilátku neobsahuje. Titr protilátek však rychle narůstá během několika dnů po transfuzi <sup>10,11</sup>.

### **2.3.2. Pozdní potransfuzní hemolytická reakce**

Příčinou jsou protilátky IgG proti antigenům Rh systému (E, c a zvláště D), ale i jiným antigenům. Dochází k pozvolnému nárůstu protilátek, které se objevují za 4 až 8 týdnů po transfuzi. Zjistitelné hodnoty narůstají až za 5 měsíců, kdy jsou již všechny transfundované erytrocyty odstraněny z cirkulace. Při další transfuzi je imunitní odpověď rychlejší. Vysoké koncentrace protilátek se objeví během několika dnů po podání transfuze. Dárcovské krvinky se rozpadají extravaskulárně. Diagnostika některých protilátek nemusí být vždy jednoduchá, koncentrace protilátek klesá rychleji a předtransfuzní testy mohou být negativní i u pacientů ve skutečnosti senzibilizovaných. Příkladem může být protilátka anti – E <sup>11</sup>.

### 2.3.3. Hemolytické onemocnění novorozence

Toto onemocnění je podmíněno inkompatibilitou mezi matkou a plodem. Na vzniku inkompatibility se může podílet většina erytrocytárních antigenů. Nejzávažnější je inkompatibilita v Rh systému, nejčtenější je v AB0 systému. Dojde-li k průniku erytrocytů dítěte přes placentu do oběhu matky, začne si matka vytvářet imunitní protilátky proti těmto antigenům, které sama nemá a které dítě zdědilo od otce. K tomuto obvykle dochází v druhé polovině těhotenství, nejčastěji při samotném porodu. Přes placentu do krevního oběhu dítěte mohou pronikat jen protilátky třídy IgG. Protilátky třídy IgM, jako jsou přirozené aglutininy v AB0 systému, jsou pro přechod placentární bariérou příliš velké a onemocnění nevyvolávají. Proniknou-li protilátky třídy IgG do oběhu dítěte, zkrátí přežívání erytrocytů na 45 až 70 dní. V těžkých případech vzniká špatné prokrvení tkání až srdeční nedostatečnost a generalizovaný edém plodu<sup>11,12</sup>.

#### 2.3.3.1. Hemolytické onemocnění novorozence při Rh inkompatibilitě

Je to onemocnění způsobené imunitními protilátkami proti antigenům Rh systému, které si vytváří RhD negativní matka pokud je plod RhD pozitivní. Protilátky přestupují v těhotenství placentou a vedou k hemolýze krvinek dítěte.

Onemocnění vzniká, jestliže je matka RhD negativní a plod je po otci RhD pozitivní. Erytrocyty plodu mohou způsobit aloimunizaci matky s následnou tvorbou protilátek, které díky své velikosti mohou přecházet placentární bariérou a vedou k hemolýze krvinek plodu. Většinou jde o protilátky proti antigenu D, E.

Po primární imunizaci probíhá tvorba protilátek pomalu, často třídy IgM. Měřitelné protilátky se objeví asi za 6 měsíců. Většinou se však po té začínají tvořit protilátky třídy IgG. V následném těhotenství při RhD pozitivě plodu dochází k sekundární imunitní odpovědi, což vede k rychlé tvorbě protilátek anti-D, většinou třídy IgG. V průběhu těhotenství je běžnou praxí určovat krevní skupinu v AB0 a Rh systému všech těhotných. Dále je opakovaně prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek, v případě pozitivního nálezu se provádí identifikace a stanovuje titer protilátky.

Profylaktickým podáním anti-D gamaglobulinu v potřebné dávce lze teoreticky téměř zabránit senzibilizaci RhD<sup>11</sup>.

### **2.3.4. Autoimunitní hemolytická anémie (AIHA)**

Protilátky jsou namířeny proti vlastním erytrocytům organismu, jde o hemolytické stavy. V rámci autoimunitní anémie lze rozlišit AIHA s tepelnými protilátkami, chorobu chladových aglutininů, paroxysmální chladovou hemoglobinurii a léky indukované hemolytické stavy <sup>10,11</sup>.

#### **2.3.4.1 Autoimunitní hemolytická anémie s tepelnými protilátkami**

Příčina selhání imunitního systému, který tvoří protilátky proti vlastním strukturám, není dosud známa. Přítomné protilátky optimálně reagují při 37°C. Protilátky jsou převážně namířeny proti Rh systému nejčastěji specifity anti-e, ojedinele pak proti jiným systémům. Protilátky jsou nejčastěji třídy IgG. Mohou vázat komplement a tím způsobit intravaskulární destrukci erytrocytů <sup>11</sup>.

#### **2.3.4.2 Autoimunitní hemolytická anémie s chladovými protilátkami**

Příčina poruchy imunitního systému je nejasná, stejně jako u AIHA s tepelnými protilátkami. Přítomné protilátky reagují při teplotách nižších než 32°C. Chladové protilátky jsou třídy IgM a mají schopnost aktivovat komplement, i když v některých případech jen částečně <sup>11</sup>.

#### **2.3.4.3 Paroxysmální chladová hemoglobinurie**

Onemocnění je charakterizováno vznikem hemoglobinurie po expozici chladu. Hemolýza je způsobena aktivací komplementu při tělesné teplotě 37°C chladovou protilátkou třídy IgG, nejčastěji specifity anti-P <sup>11</sup>.

#### **2.3.4.4 Polékové hemolytické anémie**

Léky mohou způsobit zkrácené přežívání erytrocytů, a to buď oxidací hemoglobinu nebo léky indukovanými imunitními mechanismy <sup>11</sup>.



## 2.4. Imunohematologické vyšetřovací metody

Imunohematologické vyšetřovací metody zahrnují vyšetření antigenů na erythrocytech a protilátek, které jsou namířeny proti těmto antigenům. Tyto metody jsou součástí celé řady transfuzních vyšetření, ať již jde o předtransfuzní vyšetření, vyšetření v těhotenství nebo vyšetření dárců krve, či potransfuzní reakce.

### 2.4.1. Laboratorní vyšetření antigenů Rh systému

Při vyšetření antigenů se jako výchozí materiál používají čisté erythrocyty zbavené séra nebo plazmy.

#### 2.4.1.1. Zkumavková metoda

Je to nejstarší metoda, která je i přes své limity v přesnosti stále ještě používána.

Princip: pomocí známých diagnostických sér se na erythrocytech vyšetřovaného dokazuje přítomnost nebo nepřítomnost antigenů Rh systému.

Provedení: důkladně promyté erythrocyty se rozředí fyziologickým roztokem. Z takto vzniklé suspenze se odebere kapka a přidá se diagnostické sérum. Směs je inkubována a posléze odstředěna. Při provedení je třeba dbát pracovního postupu výrobce.

Hodnocení: aglutinace (pozitivní reakce) svědčí o přítomnosti příslušného antigenu Rh systému na povrchu erythrocytu. Při negativní reakci se tento antigen na erythrocytu nevyskytuje<sup>18</sup>.

#### 2.4.1.2. Sloupcová (gelová) aglutinace

Tato technika byla vyvinuta koncem 80. let. Reakce probíhá v mikrozkušnicích naplněných speciálním gelem, který má funkci síta. Gel obsahuje odpovídající protilátky nebo reagentie dle stanovení. Testy jsou založeny na principu nepřímého Coombsova testu. Mezi firmy vyrábějící sloupcové aglutinace patří např. DiaMed, Grifols, BioRad.

Princip: Gel, který má funkci síta, je nasycen odpovídající protilátkou. Po odstředění se aglutinované erythrocyty zřetelně oddělí od neaglutinovaných erythrocytů.

Provedení: suspenze vyšetřovaných erytrocytů se odpipetuje do mikrozkušavky, která je již od výrobce napuštěna reagensy pro stanovení příslušného antigenu. Při provedení je třeba dbát pracovního postupu výrobce.

Zhodnocení: Pozitivní reakce je viditelná jako červená linka na gelové suspenzi (komplexy antigen – protilátka neprocházejí gelovým sítem). U negativní reakce jsou erytrocyty viditelné na dně mikrozkušavky jako červený sediment<sup>18</sup>. Viz. obr. č. 2.



Obr. č. 2 Vyšetření fenotypu pomocí sloupcové aglutinace.

### 2.4.1.3. Přímá nekompetitivní ELISA - "Sandwich"

Metoda je založena na vysoce specifické interakci protilátky a antigenu. Umožňuje jak detekci, tak i kvantitativní stanovení antigenu.

Princip: použijí se dvě protilátky, které mezi sebou zachytí antigen a vytvoří tzv. sandwich. Antigen se zachytí na imobilizované protilátce a po promytí se přidá značená protilátka enzymem (nejčastěji peroxidáza, alkalická fosfatáza,  $\beta$ -galaktosidáza a glukóza oxidáza). Další promytí odstraní nenasazené značené protilátky, přidá se substrát pro enzym a po určité době se reakce zastaví. Poté se změří intenzita vzniklého zbarvení. K detekci je využita enzymová reakce, kdy je bezbarvý substrát přeměněn na barevný produkt.

Vzniklý barevný produkt je stanoven spektrofotometricky. Rozsah enzymové reakce je poté přímo úměrný množství přítomného antigenu. Tato metoda umožňuje měření malých množství antigenu<sup>19</sup>.

#### **2.4.1.4. Molekulárně biologické metody**

Nejčastěji používané molekulárně biologické metody v imunohematologii jsou metody založené na principu PCR. Jsou to jednoduché enzymatické metody, které umožňují prakticky neomezenou amplifikaci požadovaných specifických úseků DNA nebo RNA.

Princip: PCR je opakovaná řízená denaturace dvouřetězcové DNA a následná renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Tyto oligonukleotidy slouží následně jako primery pro syntézu nového řetězce DNA. Amplifikace DNA probíhá v opakujících se cyklech, které mají tři kroky: 1. Denaturace.

2. Annealing (hybridizace primerů)

3. Extenze (polymerace)

Po prvním cyklu PCR se počet řetězců DNA ve směsi zdvojnásobí <sup>16,17</sup>.

##### **2.4.1.4.1. Kvantitativní PCR**

Polymerázové řetězové reakce se ve svém základním uspořádání používají především ke kvalitativním stanovením. Použití pro kvantifikaci určité sekvence ve vzorku (např. pro měření exprese určitého genu) ztěžuje skutečnost, že po jistém počtu cyklů se rychlost amplifikace zpomalí. Přesto existují postupy, které kvantifikaci templátu umožňují. Bývají založeny na měření množství PCR produktu v průběhu amplifikace (tzv. PCR v reálném čase – real-time PCR) <sup>16,17</sup>.

###### **o Princip TagMan PCR**

Kromě primerů se do reakce vkládá další oligonukleotid, který dosedá na amplifikovaný úsek. Tento oligonukleotid je na jednom konci označený fluorescenční značkou a na druhém konci nese tzv. zhášeč. Pokud je fluorescenční látka v těsné blízkosti zhášeče, je její fluorescence potlačena. Vlastní PCR probíhá obvyklým způsobem až do okamžiku, kdy DNA polymeráza při syntéze nového řetězce narazí na značený nukleotid. V tom okamžiku jej začne vytěšňovat z templátového vlákna a štěpí jej. Tím se uvolní fluorescenční sonda do roztoku a ve speciálním PCR cykleru je možné měřit fluorescenci přímo ve zkumavce v průběhu amplifikace. Intenzita fluorescence je úměrná množství nasynthesized PCR produktu <sup>16</sup>.

## 2.4.2. Laboratorní vyšetření protilátek

Screening protilátek se provádí se 2 - 3 různými diagnostickými erytrocyty. Diagnostické erytrocyty jsou takové erytrocyty, u kterých známe antigeny. Při vyšetřování protilátek se jako výchozí materiál používá sérum nebo plazma. Jsou to tzv. vyhledávací metody.

### 2.4.2.1. Zkumavková metoda

#### 2.4.2.1.1. Vyšetření v solném prostředí – přímá aglutinace

Tímto testem jsou vyšetřovány nepravidelné přirozené protilátky a získané imunní protilátky kompletní povahy.

Princip: reakce kompletních a přirozených imunních protilátek s diagnostickými erytrocyty v prostředí 0,9% roztoku NaCl.

Provedení: společně jsou inkubovány diagnostické erytrocyty a vyšetřované sérum.

Hodnocení: dojde-li k aglutinaci, obsahuje sérum kompletní protilátku IgM.

Test se provádí jak při pokojové teplotě, tak při 37°C, protože mnoho protilátek má své reakční optimum při tělesné teplotě <sup>18</sup>.

#### 2.4.2.1.2. Enzymový test

Princip: enzymy jako je bromelin, papain a ficin mají schopnost natrávit povrch erytrocytů, čímž je přiblíží k sobě a tak ulehčí aglutinaci. Snižují zeta-potenciál erytrocytů, které se mohou vzájemně více přiblížit. Tímto způsobem je možno zvýšit citlivost téměř všech antigenů.

Provedení: společně jsou inkubovány diagnostické erytrocyty, sérum vyšetřovaného a enzym např. bromelin, papain.

Hodnocení: hodnotí se, zda došlo k aglutinaci <sup>18</sup>.

#### 2.4.2.1.3. Antiglobulinové testy

Součástí těchto testů je sérum antiglobulinum humanum (AGH), což je sérum proti lidské bílkovině. Tímto precipitačním sérem se prokazuje spojení protilátek se specifickými antigeny na erytrocytech. Sérum se získává imunizací zvířat lidskými globuliny. Rozlišujeme dva testy - přímý a nepřímý Coombsův test.

### ***Přímý Coombsův test***

Je používán za předpokladu, že k vazbě protilátky na vlastní erythrocyty (senzibilizaci) došlo již in vivo, tedy v organismu vyšetřovaného. Např. při vyšetřování potransfuzních reakcí následkem podání inkompatibilní krve, při podezření na hemolytické onemocnění novorozence a při diagnostice získané hemolytické anémie. Vyšetřovaným materiálem jsou erythrocyty.

Princip: senzibilizované erythrocyty vytvářejí aglutinaci se sérem AGH.

Provedení: důkladně promyté erythrocyty se rozředí fyziologickým roztokem. Z takto vzniklé suspenze je odebrána kapka, ke které se přidá AGH sérum. Směs se inkubuje a poté se centrifuguje.

Hodnocení: je-li vzorek pozitivní, došlo k senzibilizaci erythrocytů<sup>18</sup>.

### ***Nepřímý Coombsův test***

Slouží k vyšetření inkompletních protilátek volně cirkulujících v séru pomocí AGH séra a známých typových erythrocytů. Nepřímý Coombsův test slouží k vyhledávání protilátek v těhotenství, při zkouškách kompatibility před transfuzí, u dárců krve atd. Vyšetřovaným materiálem je sérum nebo plazma.

Princip: důkaz vazby inkompletní protilátky na diagnostické krvinky pomocí AGH séra. Tento test se používá k průkazu velmi slabých inkompletních protilátek.

Provedení: k diagnostickým erythrocytům se přidává vyšetřované sérum. Po inkubaci při 37°C a centrifugaci je zhodnocena přítomnost kompletních protilátek. Pokud je vzorek negativní, promytím se zbaví erythrocyty séra a přidá se AGH sérum a odstředí.

Hodnocení: je-li vzorek pozitivní, znamená to, že diagnostické erythrocyty byly senzibilizovány inkompletní protilátkou<sup>18</sup>.

### **2.4.2.2. Metoda sloupcové (gelové) aglutinace**

Tato metoda se v laboratořích používá především při screeningu nepravidelných imunních protilátek. Screening protilátek se provádí jak v enzymatickém prostředí, tak metodou nepřímého antiglobulinového testu.

Princip: dojde-li k senzibilizaci diagnostických erythrocytů protilátkou přítomnou v plazmě, vznikne komplex antigen protilátka. Tento komplex neprojde gelem který má funkci síta.

Provedení: do příslušných mikrozkušavek se odpipetuje příslušné množství diagnostických erytrocytů, přidá se sérum nebo plazma. Pokud se jedná o enzymový test, přidá se ještě enzym. Při provedení je třeba dbát pracovního postupu výrobce.

Hodnocení: U pozitivní reakce (viz obr. č. 3) se provádí identifikace protilátek.

Pokud nedošlo k senzibilizaci erytrocytů, jsou tyto erytrocyty viditelné na dně mikrozkušavky jako červený sediment. Při senzibilizaci erytrocyty neprojdou gelovým sítem a zůstávají na gelu<sup>18</sup>.



Obr. č. 3 Pozitivní screening protilátek.

### 2.4.2.3. Nepřímá kompetitivní ELISA

Používá se pro detekci přítomnosti protilátky. Princip této metody je založen na tom, že antigen zakotvený na pevný nosič soutěží se stanovovaným antigenem ve vzorku o omezený počet vazebných míst na molekulách protilátky. Čím více antigenu obsahuje analyzovaný vzorek, tím méně protilátky se naváže na zakotvený antigen. Nenavázané složky se odstraní a následně se přidá enzymem značená sekundární protilátka proti navázané protilátce. Konečná detekce je uskutečněna enzymovou reakcí, kdy vzniká barevný produkt. Intenzita zbarvení je měřena spektrofotometricky<sup>19</sup>.

#### o Princip Capture systému

antigeny jsou imobilizovány na povrchu jamek polystyrénových mikrodestiček. Lidská plazma/ sérum a Capture LISS jsou pipetovány do jednotlivých jamek a inkubovány. Po promytí a centrifugaci se přítomnost případných protilátek zobrazí pomocí indikátorových krvinek s navázanou anti-IgG, nebo obsahující anti-IgG i anti-IgM. Tento test je vhodný k detekci a identifikaci neočekávaných, významných

IgG protilátek proti erytrocytárním antigenům. Tato metoda je založena na modifikaci Coombsova testu <sup>20</sup>.

#### **2.4.2.4. Určení specifity protilátek**

Pro určení specifity je screening s třemi diagnostickými erytrocyty nedostatečný. Pro přesné určení, o jakou protilátku jde, je tedy nutno použít panel, ve kterém se nachází osm až jedenáct diagnostických erytrocytů, které dávají předpokládanou reakci. Tyto panely umožní detekovat protilátku v závislosti na testovací tabulce.

Princip: dojde-li k senzibilizaci diagnostických erytrocytů protilátkou přítomnou v plazmě, vznikne komplex antigen-protilátka. Tento komplex neprojde gelem, který má funkci síta.

Provedení: do příslušných mikrozkušavek se odpipetuje příslušné množství diagnostických erytrocytů, přidá se sérum nebo plazma. Pokud se jedná o enzymový test, přidá se ještě enzym. Při provedení je třeba dbát pracovního postupu výrobce.

Hodnocení: Pokud nedošlo k senzibilizaci erytrocytů, jsou tyto erytrocyty viditelné na dně mikrozkušavky jako červený sediment. Při senzibilizaci erytrocyty neprojdou gelovým sítem a zůstávají na gelu <sup>18</sup>.

### 3. Experimentální část

Transfuzní oddělení Kroměřížské nemocnice, a.s., od roku 2000 vyšetřuje nepravidelné imunní protilátky pomocí sloupcové aglutinace od firmy DiaMed-ID. Pomocí tzv. ID-karet se zde vyšetřují antigeny Rh systému, screening protilátek, identifikace protilátek, testy kompatibility v Coombsově a enzymovém prostředí, atd.

#### 3.1. Screening protilátek

Postup při screeningu protilátek.

Reagencie: ID – diluent 2: Modifikovaný LISS roztok pro přípravu suspenze erytrocytů.

ID – diluent 1 (bromelinový roztok) – reagencie pro enzymový test.

Pomůcky: ID-Pipetor, ID-Trips (špičky), ID-Inkubátor, ID-Centrifuga.

Krevní vzorek: Sérum nebo plazma.

Diagnostické erytrocyty: ID – DiaCell I-II-III.

ID-Karta: LISS/Coombs + NaCl/Enzym (karta se skládá ze tří mikrozkušavek obsahující polyspecifické AGH a tří mikrozkušavek obsahující neutrální gel).

Provedení testu: Všechna činidla musí mít pokojovou teplotu. Do mikrozkušavky se vždy pipetují nejprve erytrocyty.

- 1) Příprava ID–Karty: Karta se označí jménem nebo číslem vyšetřovaného.
- 2) ID-Karta je držena ve svislé pozici; z požadovaného počtu mikrozkušavek se odstraní aluminiová folie.
- 3) Diagnostické erytrocyty jsou jemně resuspendovány, pipetovány do příslušných mikrozkušavek po 50  $\mu$ l (v pořadí 1 až 3, 4 až 6) a označeny odpovídajícími diagnostickými erytrocyty.
- 4) Do každé mikrozkušavky se přidá 25  $\mu$ l plazmy/séra vyšetřovaného.
- 5) ID-karta se inkubuje při 37°C po dobu 15 minut v ID-Inkubátoru (ID-INCUBATOR 37 SI).
- 6) ID-Karta je centrifugována po dobu 10 min v ID-Centrifuze (ID-CENTRIFUGE 6S).
- 7) Odečet a vyhodnocení výsledků<sup>18</sup>.



## 3.2. Identifikace protilátek

Postup při identifikaci protilátek.

Reagencie: ID – diluent 2: Modifikovaný LISS roztok pro přípravu suspenze erytrocytů.

ID – diluent 1 (bromelinový roztok) – reagencie pro enzymový test.

Pomůcky: ID-Pipetor, ID-Trips (špičky), ID-Inkubátor, ID-Centrifuga.

Krevní vzorek: Sérum nebo plazma.

Diagnostické erytrocyty: ID-DiaPanel (11 diagnostických erytrocytů)

ID-karty: LISS/Coombs (jedna karta se skládá ze šesti mikrozkušavek obsahujících polyspecifické AGH).

NaCl/Enzym (jedna karta se skládá ze šesti mikrozkušavek obsahujících neutrální gel).

Provedení testu: Všechna činidla musí mít pokojovou teplotu. Do mikrozkušavky se pipetují vždy nejprve erytrocyty.

- 1) Příprava ID–Karty: Karta se označí jménem nebo číslem vyšetřovaného.
- 2) ID-Karta je držena ve svislé pozici; z požadovaného počtu mikrozkušavek se odstraní aluminiová folie.
- 3) Diagnostické erytrocyty jsou jemně resuspendovány, pipetovány do příslušných mikrozkušavek po 50  $\mu$ l (v pořadí 1 až 11) a označeny odpovídajícími diagnostickými erytrocyty.
- 4) Do každé mikrozkušavky se přidá 25  $\mu$ l plazmy/séra vyšetřovaného.
- 5) ID-karta se inkubuje při 37°C po dobu 15 minut v ID-Inkubatoru (ID-INCUBATOR 37 SI).
- 6) ID-Karta je centrifugována po dobu 10 min v ID-Centrifuze (ID-CENTRIFUGE 6S).
- 7) Odečet a vyhodnocení výsledků <sup>18</sup>.

## 4. Výsledky a diskuse

Pozitivita protilátek byla sledována po dobu pěti let (v letech 2005-2009). Ročně prošlo screeningovým vyšetřením přibližně 3500 vzorků. Identifikace protilátek byla prováděna na transfuzním oddělení Kroměřížské nemocnice. Podklady pro tuto práci byly získány taktéž na transfuzním oddělení Kroměřížské nemocnice, a.s. Pozitivní identifikace protilátek u těhotných žen po aplikaci anti-D není započtena.

### 4.1. Screening protilátek v roce 2005

V roce 2005 prošlo screeningovým vyšetřením 3818 vzorků.

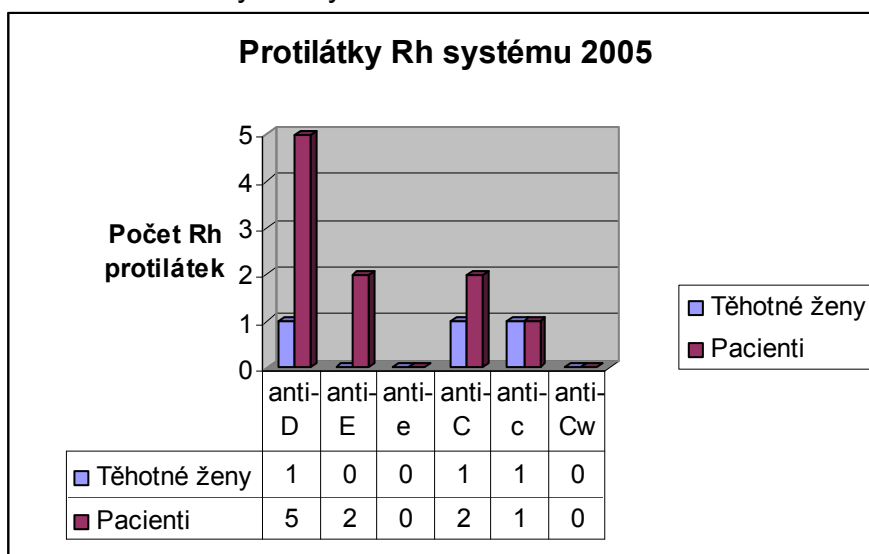
Pozitivních bylo 77 vzorků. Při následné typizaci bylo identifikováno:

- 13 protilátek Rh systému (viz. graf č. 1)
- 15 protilátek z ostatních systémů
- 12 protilátek, jejichž specifita se nepodařila určit
- 4 nespecifické chladové protilátky
- 13 nespecifických reakcí v bromelinu
- 3 PAT pozitivní
- 4 anti-D neimunní povahy
- 13 výsledků negativní typizace

Z určených protilátek Rh systému se nejčastěji vyskytovala protilátka anti-D.

Směs protilátek: anti-C+D byla identifikována ve třech vzorcích.

Graf č. 1 Protilátky Rh systému za rok 2005



## 4.2. Screening protilátek v roce 2006

V roce 2006 prošlo screeningovým vyšetřením 3617 vzorků.

Pozitivních bylo 80. Při následné typizaci bylo identifikováno:

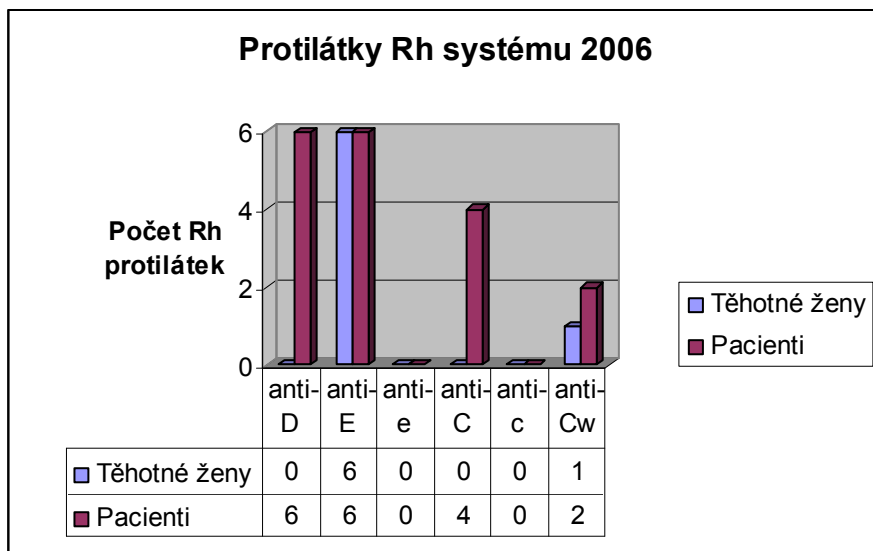
- 25 protilátek z Rh systému (viz. graf č. 2)
- 19 protilátek z ostatních systémů
- 9 protilátek, jejichž specifita se nepodařila určit
- 3 nespecifické chladové protilátky
- 9 nespecifických reakcí v bromelinu
- 2 PAT pozitivní
- 6 anti-D neimunní povahy
- 7 výsledků negativní typizace

Z určených protilátek Rh systému se nejčastěji vyskytovala protilátka anti-E.

Směs protilátek: anti-D+C ve dvou vzorcích

anti-D+C+E u jednoho vzorku

Graf č. 2 Protilátky Rh systému za rok 2006



### 4.3. Screening protilátek v roce 2007

V tomto roce prošlo screeningovým vyšetřením 3767 vzorků.

Pozitivních bylo 60. Při následné typizaci bylo identifikováno:

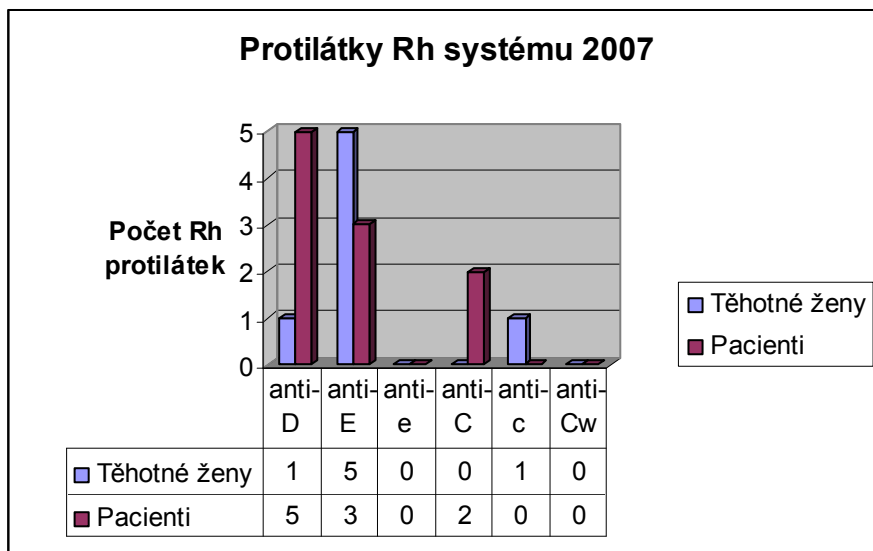
- 17 protilátek Rh systému (viz. graf č.3)
- 15 protilátek z ostatních systémů
- 8 protilátek, jejichž specifita se nepodařila určit
- 5 nespecifických chladových protilátek
- 3 nespecifické reakce v bromelinu
- 1 PAT pozitivní
- 6 anti-D neimunní povahy
- 5 výsledků negativní typizace

Z určených protilátek Rh systému se nejčastěji vyskytovala protilátka anti-E.

Směs protilátek: anti-D+C u jednoho vzorku

anti-E+Fy<sup>a</sup> u jednoho vzorku

Graf č. 3 Protilátky Rh systému za rok 2007



## 4.4. Screening protilátek v roce 2008

V tomto roce prošlo screeningovým vyšetřením 3709 vzorků.

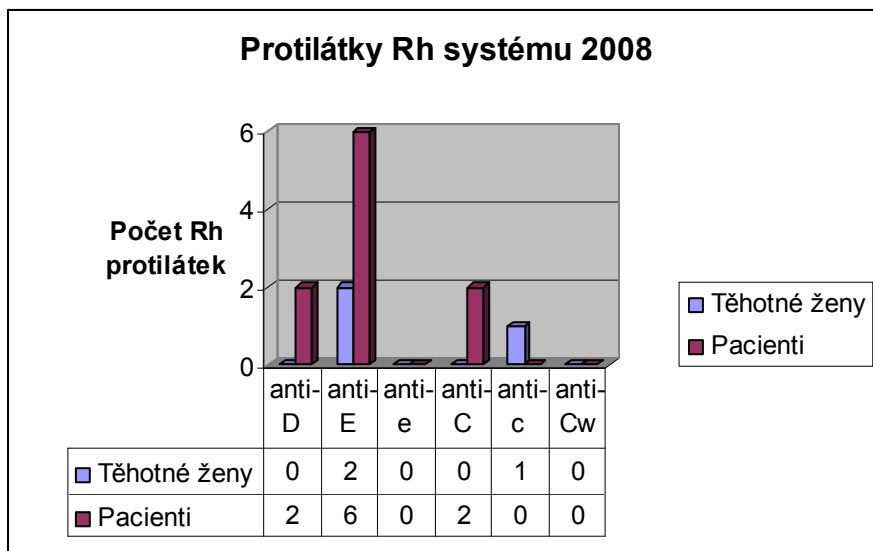
Pozitivních bylo 46. Při následné typizaci bylo identifikováno

- 13 protilátek Rh systému (viz.graf č. 4)
- 8 protilátek z ostatních systémů
- 5 protilátek, jejichž specifita se nepodařila určit
- 2 nespecifické chladové protilátky
- 11 nespecifických reakcí v bromelinu
- 3 PAT pozitivní
- 1 anti-D neimunní povahy
- 3 výsledky negativní typizace

Z určených protilátek Rh systému se nejčastěji vyskytovala protilátka anti-E.

Směs protilátek: anti-D+C u jednoho vzorku.

Graf č. 4 Protilátky Rh systému za rok 2008



## 4.5. Screening protilátek v roce 2009

V tomto roce prošlo screeningovým vyšetřením 3590 vzorků.

Pozitivních bylo 41. Při následné typizaci bylo identifikováno:

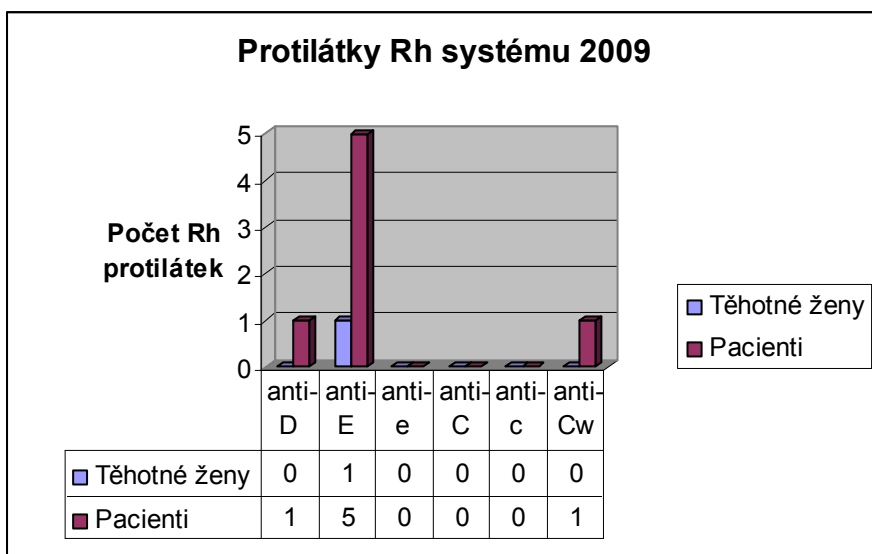
- 8 protilátek Rh systému (viz. graf č . 5)
- 16 protilátek z ostatních systémů
- 4 protilátky, jejichž specifita se nepodařila určit
- 1 nespecifická chladová protilátka
- 5 nespecifických reakcí v bromelinu
- 2 PAT pozitivní
- 2 anti-D neimunní povahy
- 3 výsledky negativní typizace

Z určených protilátek Rh systému se nejčastěji vyskytovala protilátka anti – E.

Směs protilátek: anti-E+Kell u jednoho vzorku

anti-E+S u jednoho vzorku

Graf č. 5 Protilátky Rh systému za rok 2009



## 4.6. Vyhodnocení

Při vyhodnocení shora uvedených dat byly zjištěny skutečnosti, které jsou souhrnně zpracovány v tab. č. 4, 5.

- Výskyt protilátek anti-D má klesající tendenci. Tato skutečnost může být důsledkem zlepšení prenatální péče a včasné aplikace protilátky anti-D matkám při inkompatibilitě v Rh systému .
- Zvýšený výskyt protilátky anti-E. Tato protilátka byla od roku 2006 mezi protilátkami Rh systému identifikována nejčastěji a v posledních dvou letech výrazně převýšila výskyt protilátky anti-D. Výskyt antigenu E v populaci je kolem 27%, čímž vzniká vysoké riziko imunizace např. při transfuzích nebo v těhotenství.
- Nulový výskyt protilátky anti-e je podmíněn více než 96% výskytem antigenu e v populaci. Tato skutečnost způsobuje vzácnost výskytu protilátky anti-e.
- Protilátka anti-C bývá často provázena protilátkou anti-D, což bylo prokázáno u osmi vyšetřovaných. Kombinace protilátek anti-C+D byla zaznamenána jako nejčastější mezi různými kombinacemi.
- Protilátky anti-D neimunní povahy jsou protilátky u těhotných žen po aplikaci imunoglobulinu anti-D, které nejsou vyhodnoceny v tab. č. 4. Tyto protilátky jsou vytvořeny v důsledku preventivní imunizace RhD negativních žen a po čase vymizí. Tyto protilátky neimunní povahy jsou uvedeny v tab. č. 5.
- Protilátky ostatních systémů jsou souhrnně uvedeny v tab. č. 5. Byly zde identifikovány např. protilátky anti-K, anti-M, anti-Fy<sup>a</sup>, anti-S.

Tab. č. 4. Vyhodnocení protilátek Rh systému za dobu pěti let

<b>Rok</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>
<b>Počet screeningových vyšetření</b>	3818	3617	3767	3709	3590
<b>Pozitivní screening protilátek</b>	77	80	60	46	41
<b>Protilátky Rh systému</b>	13	25	17	13	8
Protilátky Rh systému v %	16,88%	31,25%	28,33%	28,26%	19,51%
<b>anti-D</b>	6	6	6	2	1
<b>anti-E</b>	2	12	8	8	6
<b>anti-e</b>	0	0	0	0	0
<b>anti-C</b>	3	4	2	2	0
<b>anti-c</b>	2	0	1	1	0
<b>anti-C<sup>w</sup></b>	0	3	0	0	1
Směs protilátek anti-C+D	3	2	1	2	0
Směs protilátek anti-C+D+E	0	1	0	0	0
Směs protilátek anti-E+Fy <sup>a</sup>	0	0	1	0	0
Směs protilátek anti-E+Kell	0	0	0	0	1
Směs protilátek anti-E+S	0	0	0	0	1



Tab. č. 5. Vyhodnocení protilátek z ostatních systémů za dobu pěti let

<b>Rok</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>
<b>Protilátky z ostatních systémů</b>	15	19	15	8	16
Protilátky z ostatních systémů v %	19,48%	23,75%	25%	17,39%	39,02%
<b>Protilátky, jejichž specifita se nepodařila určit *</b>	12	9	8	5	4
Protilátky, jejichž specifita se nepodařila určit v %	15,58%	11,25%	13,33%	10,87%	9,76%
<b>Nespecifická chladová protilátka</b>	4	3	5	2	1
Nespecifická chladová protilátka v %	5,19%	3,75%	8,33%	4,35%	2,44%
<b>Nespecifických reakcí v bromelinu</b>	13	9	3	11	5
Nespecifických reakcí v bromelinu v %	16,88%	11,25%	5,0%	23,91%	12,2%
<b>PAT pozitivní</b>	3	2	1	3	2
PAT pozitivní v %	3,90%	2,5%	1,67%	6,52%	4,88%
<b>anti-D neimunní povahy **</b>	4	6	6	1	2
anti-D neimunní povahy v %	5,19%	7,5%	10,0%	2,17%	4,88%
<b>Negativní typizace ***</b>	13	7	5	3	3
Negativní typizace v %	16,88%	8,75%	8,33%	6,52%	7,32%

\* Screening protilátek pozitivní, následná typizace jednoznačně neprokázala specifitu protilátky.

\*\* Pozitivní identifikace protilátek u těhotných žen po aplikaci anti-D.

\*\*\* Screening protilátek pozitivní, následná typizace negativní.

## 5. Závěr

I přes nové metody, které imunohematologie přináší, není možné zcela zabránit imunizaci člověka. Stále platí fakt, že transfuze je pro pacienta rizikem.

Dodržováním standardních operačních postupů však lze předejít omylům, které jsou mnohdy fatální. Platí to nejen o protilátkách Rh systému, ale o všech imunních protilátkách. Každá protilátka je specifická, a proto je třeba při jakékoliv pozitivitě dbát zvýšené opatrnosti.

## 6. Seznam použité literatury

1. HRUBIŠKO, M., a spol.: *Hematologie a krevní transfuze II. Krevní transfuze*. 1.vyd. Praha: Avicentrum, 1983, s. 15,16, 42, 44, 45.
2. BARTŮŇKOVA, J., ŠEDIVÁ, A.: *Imunohematologie – minimum pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997, s. 14. ISBN 80-85875-36-5.
3. HOREJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J.: *Základy imunohematologie*. 1. vyd. Praha: Triton, 1998, s. 44, 45, 46, 47. ISBN 80-85875-73-X.
4. KODÍČEK, M.: *Imunoglobuliny*. Biochemické pojmy : výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2010-05-02]. Available from www: <[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=imunoglobuliny](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=imunoglobuliny)>
5. KVASNIČKA, J., SOUČEK, V.: *Hematologie a transfuzní služba*. 1.vyd. Brno:Institut pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků, 1986, s.103.
6. ECKSTEIN, R.: *Imunohematologie a transfuzní lékařství*. 1.vyd. 1994, s. 19, 36, 37, 38, 39, 40.
7. HRUBIŠKO, M.: *Základy hemoterapie*. 1.vyd. Martin: Osveta, 1974, s.149, 150, 151,155.
8. SAKALOVA, A., LIPŠIC, T., a spol.: *Hematológia a transfuziológia*. 1.vyd. Martin:Osveta, 1995, s.147, 149, 152, 170, 171, 425, 427. INSB 80-217-0444-6.
9. PÍSAČKA, M.: Praktické aspekty určování antigenů Rh systému. *Transfuze a hematologie dnes*. 2000. roč.6, č.4, s.128-133.
10. PECKA, M.:*Laboratorní hematologie v přehledu. Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. 1.vyd. Český Těšín: Finidr, 2006, s.214, 214. ISNB 80-86682-02-1.

11. PENKA, M., a spol.: *HEMATOLOGIE I Neonkologická hematologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2001, s.63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71, 72. ISBN 80-247-0023-9.
12. HROMADNÍKOVÁ, I., a spol.: Neinvazivní RHD, RHC a RHE genotypizace plodu z periferní krve RhD negativních těhotných žen. *Transfuzie a hematologie dnes*. 2004. roč.10, č.1, s.13-18.
13. OVERFIELD, J., DAWIDSON, M., HAMER, D.: *Transfusion science*. 2. vyd. Oxford: Scion Publishing Ltd, 2007, s.93, 95, 96. ISBN 978-1-904842-40-8.
14. DANIELS, G., BROMILOW, I.: *Essential guide to blood groups*. 1. vyd. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2007, s.39, 41. ISBN 978-1-4051-5349-2.
15. PÍSAČKA, M., Současné poznatky o Rh systému. *Transfuzie a hematologie dnes*. 2000, roč. 6, č.3, s.79 - 81.
16. <http://www.wikiskripta.eu/index.php/PCR> [2010-09-01]
17. [http://cs.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1\\_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1\\_reakce](http://cs.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce) [2010-09-01]
18. Standardní operační postupy TO Kroměřížské nemocnice a.s.
19. [http://www.biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/ELISA\\_cz.html](http://www.biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/ELISA_cz.html) [2010-11-01]
20. [http://www.apr.cz/cz/imunohematologie/galileo\\_echo/capture.html](http://www.apr.cz/cz/imunohematologie/galileo_echo/capture.html) [2011-03-30]

## **Abstrakt**

Tato bakalářská práce je zaměřena na antigeny a protilátky Rh systému.

Protilátky Rh systému nejsou přirozené, vyskytují se převážně jako imunní. Antigeny Rh systému patří k nejsilnějším imunogenům s největší četností výskytu. Pozitivita protilátek byla sledována po dobu pěti let (v letech 2005 - 2009). Ročně prošlo screeningovým vyšetřením přibližně 3500 vzorků. Ve sledovaném období bylo identifikováno kolem patnácti druhů různých protilátek s různou frekvencí výskytu. V některých případech vyžadovala identifikace protilátek složitější postupy.

Podklady k bakalářské práci byly získány na transfuzním a hematologickém oddělení Kroměřížské nemocnice a.s.

## **Abstract**

This work is focused on antigens and antibodies of the Rh system.

Antibodies of the Rh system are not natural; they occur mostly as immune antibodies. Antigens of the Rh system are among the strongest immunogens with the greatest frequency. Antibody positivity was observed over a period of 5 years (2005 - 2009). Approximately 3500 blood samples per year were examined in screening tests and approximately 15 kinds of different antibodies with different occurrence frequency were identified. In some cases identification required more complicated procedures.

The foundation of this work was acquired at the Transfusion and Haematology Ward at Kroměříž Hospital.