



VYŠETŘENÍ DÁRCŮ KRVE

Mgr. Jana Tylečková

VYŠETŘENÍ ODEBRANÉ KRVE A JEJÍCH SLOŽEK

- Vyhláška o lidské krvi 143/2008 ve znění pozdějších předpisů
- Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP
- Vzorek na vyšetření se obvykle získává v souvislosti s vlastním odběrem
- V odebrané krvi a jejích složkách se vyšetřují:
 - **Markery** nejvýznamnějších **infekčních chorob** přenosných krví
 - Základní **imunohematologické** parametry



SCREENING INFEKČNÍCH MARKERŮ

- **Serologická vyšetření (povinná):**
 - **Anti-HCV**
 - **HBsAg**
 - **Anti-HIV 1,2**
 - **Antigen p24 (HIV)**
 - **Vyšetření protilátek proti syfilis**
- **Nepovinná serologická vyšetření:**
 - **Kombinovaný test HCV Ag/Ab (provádí cca 1/3 zařízení v ČR)**
 - **Anti-HBc**



SCREENING INFEKČNÍCH MARKERŮ - SEROLOGICKÉ METODY

- **Serologické metody** - průkaz přítomnosti infekčního agens v krvi dárce je založen na průkazu specifických protilátek (nepřímý průkaz) nebo antigenů (přímý průkaz)
 - **Imunochemické metody** - založeny na reakci antigenních determinant s vazebným místem protilátky.
 - U imunochemických metod je dosahováno zvýšení citlivosti značením jedné z reagujících složek – antigenu nebo protilátky látkou, která je v závěru reakce detekována.
 - Na TTO nyní používány metody *chemiluminiscence* a *elektrochemiluminiscence*



OMEZENÍ SÉROLOGICKÝCH METOD

- Všechny screeningové laboratorní testy jsou zatíženy rizikem diagnostického okna
- Diagnostické okno sérologických testů:
 - HIV – 2 až 3 týdny
 - HBV – 4 až 6 týdnů
 - HCV – 2 až 6 měsíců
- Důraz na vysokou senzitivitu používaných testů
- metody NAT (Nucleic Acid Testing)



SCREENING INFEKČNÍCH MARKERŮ - PCR

- Přímý průkaz infekčního agens v krvi dárce je založen na detekci nukleových kyselin infekčního agens (NAT)
- **Detekce nukleových kyselin**
 - V současné době nabývá na významu především metoda *real-time PCR* a *multiplexní PCR*.
 - Tato moderní technologie umožňuje rychlou a citlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA infekčního agens.
- **MULTIPLXNÍ PCR**
 - Současná **amplifikace několika cílů najednou** (DNA, RNA)
 - Použito je **více párů specifických primerů** komplementárních k různým cílovým sekvencím v jedné amplifikační reakci
 - Reverzní transkripce a PCR amplifikace probíhá **v téže reakční směsi**
- **REAL-TIME PCR**
 - Reakční směs je obohacena o detekční sondy značené oznamovacími fluorescenčními barvivy, tyto sondy během PCR hybridizují se vznikajícími produkty
 - **Detekce a rozlišení PCR produktů v reálném čase jsou prováděny měřením fluorescence** uvolněných oznamovacích barviv



PCR

- **Polymerázová řetězová reakce** – metoda, která slouží k namnožení úseků DNA, výsledkem je obrovské množství kopií původní sekvence DNA
- Tři základní pochody PCR, které se cyklicky opakují:
 - 1. DENATURACE – denaturace DNA vlivem vysoké teploty (92 – 96°C), rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA, rozvolnění dvoušroubovice, vznik jednovláknové DNA
 - 2. HYBRIDIZACE – nasednutí krátkých úseků DNA (primery – 20 až 25 nukleotidů) při teplotě 45 – 65°C
 - 3. ELONGACE – na řetězec DNA je napojena DNA-polymeráza, která zajišťuje připojování nových nukleotidů (syntéza DNA)



SCREENING INFEKČNÍCH MARKERŮ - PCR

- Vyšetření nukleových kyselin (NAT) – v ČR nepovinné (v zemích Z Evropy se provádí):
 - HIV-RNA
 - HCV-RNA
 - HBV-DNA

- Dle epidemiolog. situace:
 - WNV - RNA (sezonně)
 - HTLV I/II - RNA (zámoří)



VÝZNAM NAT

○ Zkrácení diagnostického okna

- Je důležité, abychom byli schopni identifikovat dárce, kteří se nacházejí ve velmi časných fázích infekce HCV, HIV nebo HBV. Toto kritické období před vytvořením protilátek proti viru je označováno jako „imunologické okno“.
- U HIV a HCV vzniká již během „imunologického okna“ vysoká virémie, kdy pravděpodobnost přenosu nákazy je vysoká.
- Naopak během infekce HBV je rychlost replikace virů v období imunologického okna nízká.

- HIV o 7 – 9 dní
- HCV o 59 – 65 dnů
- HBV o 25 – 30 dnů



SCREENING INFEKČNÍCH MARKERŮ

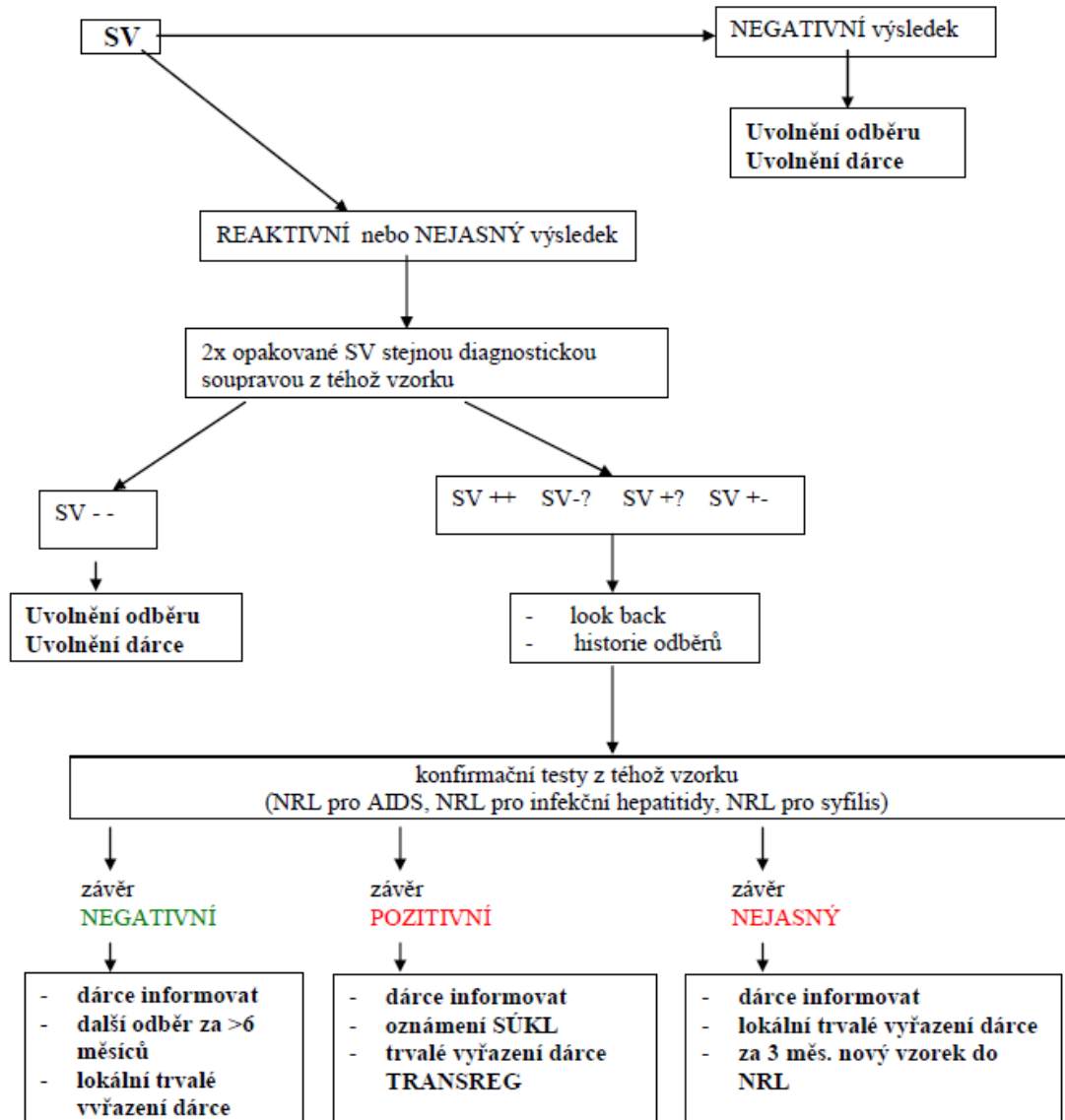
SEROLOGICKÉ METODY – POVINNÉ TESTY

- Anti-HCV
 - HBsAg
 - Anti-HIV 1,2
 - Antigen p24 (HIV)
 - Vyšetření protilátek proti syfilis
- V případě reaktivity se vzorek vyšetřuje v dubletu, při opakované reaktivitě se vzorek zasílá ke konfirmaci do NRL (povinnost), TP nejsou uvolněny k použití.

Typ reakce	1. vyšetření	2. vyšetření	3. vyšetření	Hodnocení laboratoře
				HBV, HCV, HIV, Syfilis
1	-	netestováno	netestováno	NEGATIVNÍ
2	+	-	-	NEGATIVNÍ
3	+	+	-	REAKTIVNÍ
4	+	+	+	REAKTIVNÍ



Vyšetření infekčních markerů u dárců krve TTO FN Brno (HIV, anti-HCV, HBsAg, syfilis)



IMUNOHEMATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ DÁRCŮ KRVE A JEJÍCH SLOŽEK

- Závazná vyšetření dle legislativy:
- Z každého odběru se provádí:
 - **vyšetření krevní skupiny AB0, RhD**
 - **screening nepravidelných protilátek proti erytrocytům**
- U každého dárce se stanoví **Rh fenotyp (C, c, E, e) a antigen Kell**. V případě nálezu Kell pozitivity se vyšetřuje i antigen **Cellano**.



STANOVENÍ AB0

○ **Noví dárči:**

- Vyš. 2x ze 2 nezávislých vzorků

(Za nezávislé vzorky lze považovat např. krevní vzorek odebraný před odběrem pro vyšetření krevního obrazu a/nebo krevní vzorek odebraný při vlastním odběru např. z přídatného váčku odběrové soupravy a/nebo segment hadičky spojené s transfuzní soupravou / transfuzním přípravkem.)

- Z toho alespoň 1x stanovení antigenů erytrocytů i stanovení protilátek proti nim
- *Minimálně:* diagnostická séra anti-A a anti-B, diagnostické erytrocyty A₁ a B. Druhé vyšetření AB0 může zahrnovat pouze určení antigenů.

○ **Opakování dárči:**

- Vyšetřují se alespoň antigeny erytrocytů (1x)
- Za druhé (referenční) vyšetření se považuje výsledek vyšetření v databázi z předchozích odběrů. Je nutné zajištění kontroly shody výsledku vyšetření krevní skupiny s údaji v databázi.



STANOVENÍ RHD ANTIGENU

○ Noví dárči:

- 2 vyšetření, ze dvou nezávislých vzorků
- Diagnostická séra: anti-D třídy IgM s 2 různými klony + kontrola falešné positivity („Rh kontrola“)
- **slabé D:**
 - vyšetřuje se u RhD negativních dárců ze 2 nezávislých vzorků
 - Diagnostická séra anti-D s 2 různými klony (IgG), metodou NAT + kontrola falešné positivity („Rh kontrola“). Diagnostická séra by měla zachytávat minimálně variantu DVI.
 - V případě **pozitivního** či diskrepantního výsledku **s oběma** diagnostickými **séry** pro vyšetření slabého D se **dárce** označí jako **D^{w/v}**, transfuzní **přípravek** jako **RhD pozitivní**; při jasné **negativitě s oběma séry** se dárce i transfuzní přípravek označí jako **RhD negativní**.

○ Opakovaní dárči:

- 1 vyšetření, diagnostické sérum anti-D třídy IgM + kontrola falešné positivity („Rh kontrola“)
- Za 2. (referenční) vyšetření se považuje výsledek vyšetření v databázi z předchozích odběrů
- Neprovádí se vyšetření slabého D



STANOVENÍ RH FENOTYPU A ANTIGENU KELL

- Vyš. antigenů **C, c, E, e** , Cw (dop.) a **K (Kell)**
- U nového dárce 1x + 1x se ještě ověřuje z druhého nezávislého vzorku nebo při následujícím odběru
- Nevyžadují se 2 různé klony diagnostických sér
- V případě nálezu Kell positivity (K+) se vyšetřuje i antigen Cellano (k).

Další antigenní systémy:

- především u dárců krevní skupiny 0 je vhodné určit fenotyp i v dalších antigenních systémech (např. Duffy, Kidd, Lutheran, MNSs, aj.)



SCREENING NEPRAVIDELNÝCH PROTILÁTEK PROTI ERYTROCYTŮM

- U každého odběru se provádí vyšetření přítomnosti nepravidelných protilátek přiměřeně citlivou metodou se zaměřením na záchyt klinicky významných protilátek, především anti-D.
- Metoda: **NAT** (nepřímý antiglobulinový test)
- ***Diagnosticke erythrocyty***: k vyšetření se mohou použít diagnostické erythrocyty ve směsi.

Identifikace nepravidelných protilátek proti erythrocytům:

- V případě pozitivního výsledku screeningového vyšetření nepravidelných protilátek proti erythrocytům je vhodné provést identifikaci protilátky(-ek).
- Použití transfuzního přípravku erythrocytů v případě zjištění nepravidelných protilátek proti erythrocytům záleží na klinickém významu zjištěné protilátky

