



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

○ Vyšetření k průkazu známek infekce:

- **virem HIV 1 a 2:** stanovení protilátek a antigenu p24 a nově přímá detekce virové RNA
 - **virem HBV:** stanovení povrchového antigenu a nově přímá detekce virové DNA
 - **virem HCV:** stanovení protilátky a nově přímá detekce virové RNA
 - **syfilis:** stanovení specifické anti-treponemové protilátky
-
- nově vyš. **anti-HBc protilátek** – u každého dárce, u kterého dosud nebyly vyšetřeny

při každém odběru



SCREENING INFEKČNÍCH MARKERŮ - SEROLOGICKÉ METODY

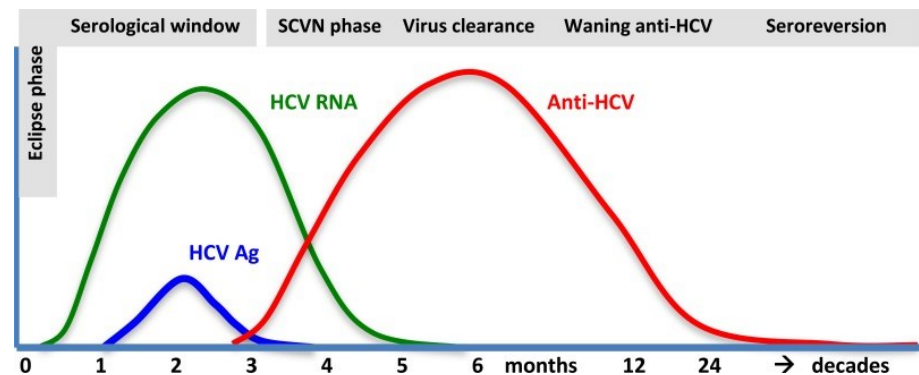
- **Serologické metody** - průkaz přítomnosti infekčního agens v krvi dárce je založen na průkazu specifických protilátek (nepřímý průkaz) nebo antigenů (přímý průkaz)
 - **Imunochemické metody** - založeny na reakci antigenních determinant s vazebným místem protilátky.
 - U imunochemických metod je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



OMEZENÍ SÉROLOGICKÝCH METOD

- Všechny screeningové laboratorní testy jsou zatíženy rizikem diagnostického okna
 - Diag. okno = doba od nákazy až do okamžiku, kdy test dokáže infekci spolehlivě detekovat
- 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) - PCR



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



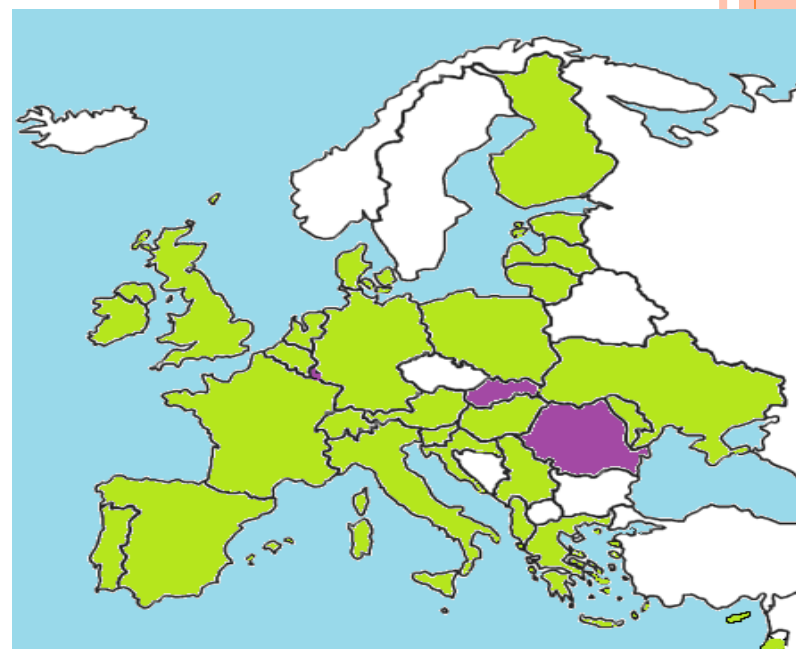
PCR

- **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 bude povinné od 1.7.2024 (ve většině evropských zemí se provádí):
 - HIV-RNA
 - HCV-RNA
 - HBV-DNA
- Dle epidemiolog. situace (příp. dle požadavků zpracovatele plazmy):
 - WNV - RNA (sezonně)
 - HAV – RNA
 - Parvovirus B19
 - HTLV I/II - RNA (zámoří)



Legend for NAT screening requirements:

- Light green box: NAT povinně
- Purple box: NAT doporučeno
- White box: NAT neprovádí se/není doporučeno





VÝZNAM NAT

- Zkrácení diagnostického okna
- Je důležité, abychom byli schopni identifikovat dárce, kteří se nacházejí ve velmi časných fázích infekce HCV, HIV nebo HBV. 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



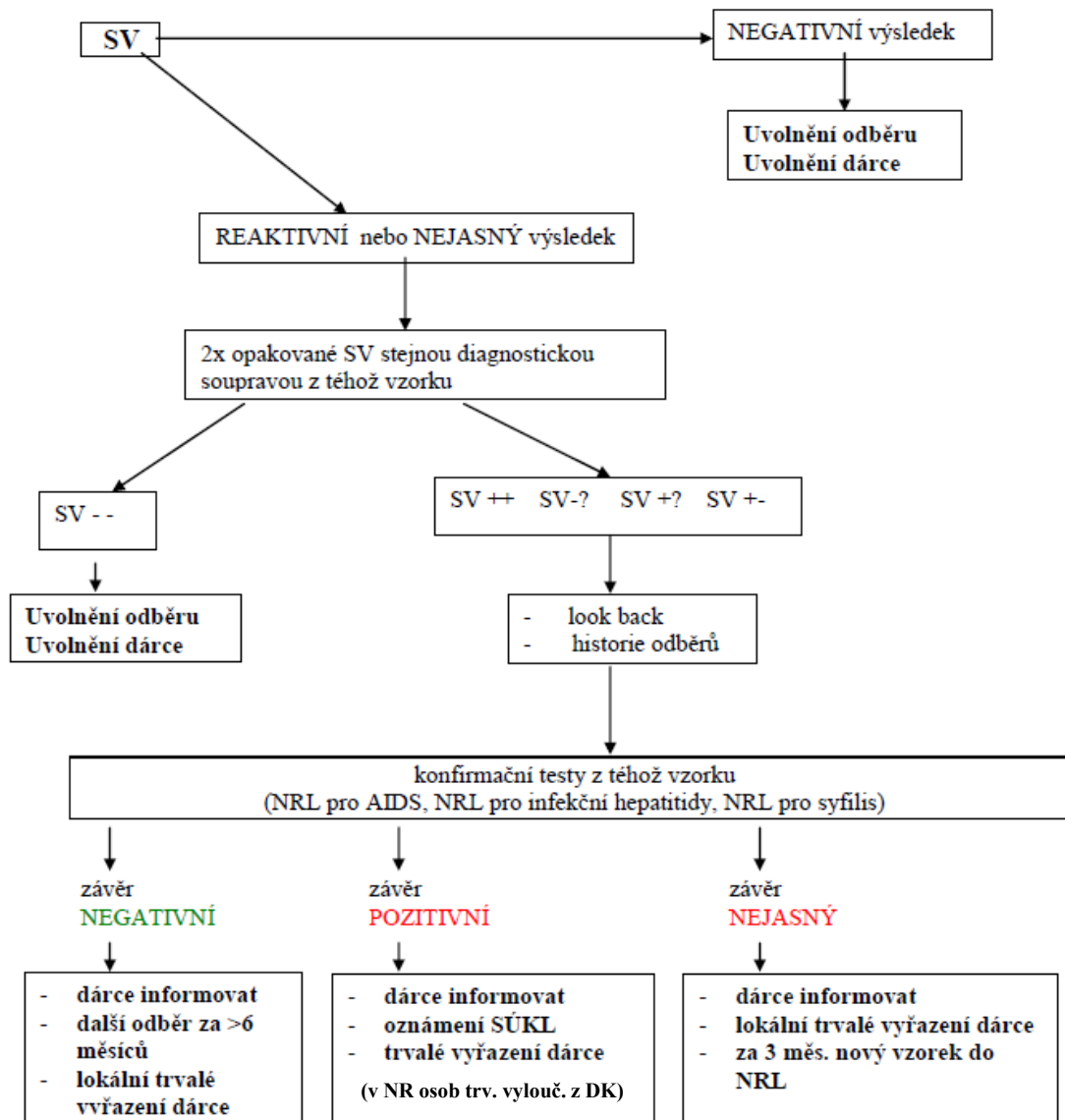
SCREENING INFEKČNÍCH MARKERŮ

- 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 (K)**. V případě nálezu Kell positivity se vyšetřuje i antigen **Cellano (k)**.



STANOVENÍ ABO

○ **Noví dárci:**

- 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 vaku odběrové soupravy a/nebo segment hadičky spojené s transfuzní soupravou / transfuzním přípravkem.)

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

○ **Opakování dárci:**

- 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 dárci:**

- 2 vyšetření, ze dvou nezávislých vzorků
- Diagnostická séra: anti-D třídy IgM s 2 různými klony + kontrola falešné positivity („Rh kontrola“)
- **Variantní/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 dárci:**

- 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, MNSs, Lutheran, 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)
- ***Diagnostické 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



DĚKUJI ZA POZORNOST

