

Imunohematologie

Obecná imunohematologie

- Nauka o antigenech, protilátkách, imunitních reakcích v souvislosti s přípravou a podáním transfuze a u některých jiných klinických stavů
- Imunologie aplikovaná na krevní buňky (erytrocyty, granulocyty, lymfocyty, trombocyty)
- Řeší specifickou imunohematologickou problematiku (hemolytické onemocnění novorozence, hemolytické anemie, transplantace, potransfuzní reakce)

Imunita

- Obecná definice: odolnost proti nemocem, antigenům
- Zajišťuje ji systém buněk, tkání a molekul, tzv. imunitní systém
- Dva typy: *imunita přirozená* (iniciální protekce proti antigenům) a *získaná* (pomalejší, ale specifická a více efektivní obrana)

Přirozená/ nespecifická/ naivní

- Stále přítomná u hostitele, okamžitá a uniformní reakce, **brání vstupu antigenů** do organismu a rychle je eliminuje
 - Neporušený *epitel*, jeho enzymy a nepatogenní kožní flora
 - *Humorální* složky plazmatické = komplement, cytokiny, interferony
 - *Buňky* fagocyty, NK lymfocyty
 - Tyto mechanismy reagují s mikroby, ale ne s neinfekčními cizími substancemi

Získaná/ specifická/ adaptivní

- Stimulují ji antigeny, které pronikly do tkání
 - *Buňky* (lymfocyty) s receptory, kterými rozpoznávají specifické substance antigenů
 - Startuje rozpoznáním antigenu v lymfatických orgánech
 - Má dvě specializované funkce
 - *Humorální* složku = **protilátky** tvořené **B lymfocyty**, eliminují mikroby z **extracelulárních** tekutin
 - *Buněčnou* složku = **T lymfocyty**, CD4+ a CD8+ eliminují mikroby z **buněk**

Specifická imunita/ lymfocyty

- *Naivní* lymfocyty rozpoznávají antigeny
- *Efektorové* reagují s antigeny, žijí krátce
- *Paměťové* přežívají v klidu, po dalším kontaktu s původním antigenem navodí sekundární (anamnestickou) imunitní odpověď
- Exprimují specifické receptory pro antigeny
- Rozlišují se pomocí povrchových proteinů (CD znaky)

Vzájemná interakce mezi lymfocyty:

- Aktivované T_h stimulují B lymfocyty pomocí cytokinů → různé třídy protilátek
- Změny T_{reg} lymfocytů → dysbalance T x B lymfocytů

Imunohematologie = *protilátkový typ* specifické imunitní odpovědi

Protilátky /imunoglobuliny/ sekreční Ig

- glykoproteiny tvořené B lymfocyty
- na membráně B bb. jako antigenní receptory (BCR) nebo jako sekreční proteiny rozpuštěné v plazmě a v mukózních tekutinách
- neutralizují a eliminují antigeny z krve a z orgánů, brání jejich kolonizaci v organismu
- působí pouze extracelulárně
- rozeznávají jen *určité typy* antigenních molekul (sacharidy, složité chemické struktury s lipidy a proteiny)

Funkce Ig: rozpoznání Ag + sekrece

- 4 polypeptidové řetězce protilátky H₂L₂
- Každý obsahuje dva identické H a identické L řetězce
- Tvoří tvar písmene Y, vzájemně spojené
- Dva fragmenty Fab + jeden fragment Fc, mezi nimi flexibilní otočná oblast
- Variabilní část pro vazbu antigenu (epitopy, determinanty antigenu)
- Konstatní oblast pro jinou vazbu (komplement, fagocytoza)
- Lehké řetězce: kappa, lambda
- Těžké řetězce: rozlišení na izotypy IgM, IgD, IgG, IgA, IgE

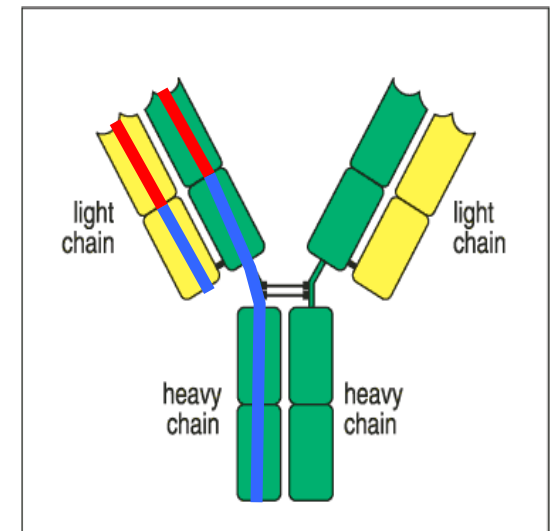


Fig 1.17 © 2001 Garland Science

Funkce Ig

- IgG, IgD, IgE monomery = 2 vazebná místa pro Ag
- Sekreční IgA dimer = čtyři místa pro Ag
- IgM pentamer (hexamer) = 10 (12) míst pro Ag
- Protilátka tak může vázat 2-10 epitopů antigenu
- Vznik imunních komplexů Ab+Ag
- Protilátková odpověď na antigeny: T-independentní nebo T-dependentní podle účasti T_h buněk

- **Afinita:** síla reakce mezi 1 antigenní determinantou a 1 vazebným místem protilátky
- **Avidita:** síla vazby mezi multivalentními protilátkami a antigeny s více determinantami
- **Specifita:** schopnost protilátky reagovat jen s určitou antigenní determinantou
- **Cross-reakce:** schopnost protilátky reagovat s více antigenními determinantami
- **Klinický význam** protilátek (hemolýza) pro HTR, HON, HA
 - AB0,Rh,Kell,Duffy,Kidd,Ss,Vel – vždy významné/ antigen-negativní transfuze
 - M,N,P1,Le,A1,Lutheran- důležité při reaktivitě při 37°C/ kompatibilní transfuze
- O vlastnostech a významu protilátky rozhodne: specificita, Ag:Ab ratio, avidita, reakční teplota, lytická kapacita, typ Ig,
dále vlastnosti monocytů, solubilní antigeny u příjemce

Typy protilátek

- *Polyklonální*: odvozené z různých buněčných linií
- *Monoklonální*: identické protilátky produkované jedním typem B bb., všechny klony mají jednu společnou buňku, rozeznávají jeden určitý epitop, stejný alotyp, idiotyp
- Použití diagnostické (v imunohematologii při sérologickém vyšetření krevních skupin) i léčebné

Antigeny

- Cizí substance navozující imunitní odpověď
- Cizí oblasti = **antigenní determinanty (epitopy)**
- Jeden antigen může mít více různých epitopů
- Ne všechny oblasti antigenu jsou **imunodominantní**

- Antigeny v imunohematologii = **krevní skupiny** a **histokompatibilní antigeny** (transplantační) na různých krevních buňkách

Antigeny

- Různé buněčné funkce
- Antigeny krevních skupin erytrocytů
 - zajišťují transport vody, urey, iontů
 - jsou receptory pro mikroorganizmy
 - mají adhezivní funkce
 - jsou enzymaticky aktivní
 - udržují morfologické a strukturální vlastnosti erytrocytů

Antigeny

- Obvykle velké molekuly a složené sloučeniny (proteiny, polysacharidy, lipidy)
- Větší molekuly a jejich komplexy = lepší imunogeny
- Imunogenicita závisí na stupni cizorodosti, strukturální stabilitě molekuly, dostatečném počtu Ag determinant, době expozice Ag, způsobu podání
- Hapten = malá molekula neimunogenní, spojuje se s větším nosičem (plazmatické proteiny)

Komplement

- Aktivace komplementu při vazbě mikrobů nebo *protilátek* na buňky
- 3 aktivační cesty: *klasická*
lektinová
alternativní
- Odlišné mechanismy a průběh aktivace
- Při aktivaci protilátkami: *1 molekula IgM* stačí pro vazbu C1q, ale pro stejnou vazbu musí být *2 molekuly IgG*

Působení komplementu na erytrocyty

- Velké množství = intravaskulární typ hemolýzy (destrukce při vzniku MAC+ vazoaktivních peptidů a/nebo při nedostačujícím fagocytárním systému): **lýza erytrocytů**
- Malé množství = hemolýza extravaskulárně (destrukce přes F_c komplementový receptor makrofágů): **fagocytóza erytrocytů**

např. akutní HTR, CAD.....i.v.lýza

např. pozdní HTR, HON, WAIHAfagocytóza

Hemolýza

Zkrácené přežívání erys na méně než 100-120 dní

Kompenzovaná x manifestní HA

Vrozené x získané HA

- Intravaskulární hemolýza
 - Destrukce erys v intravaskulárním prostoru
 - Uvolnění volného Hb do krve
 - Hemoglobinemie, hemoglobinurie
 - Pokles sérového haploglobinu
 - Vyšší LD

Hemolýza

- Extravaskulární hemolýza
 - Destrukce v buňkách RES
 - Vyšší sérový bilirubin /nepřímý
 - Degradční produkty bilirubiny v moči a stolici
 - Vyšší LD
- Klinický význam rozlišení typu hemolýzy: upřesnění typu HA (PCH, WAIHA), terapeutický

Komplementové inhibiční mechanismy

Regulace na úrovni:

- C1qC1 INH
- C3konvertáza.....DAF, C4BP, CR1
- C5 konvertáza.....CR1, H
- MAC.....CD59

Komplement v imunohematologii:

- Souvisí s krevními skupinami Chido/Rodgers (C4), Cromer (CD55-DAF)
- Destrukce transfundovaných erytrocytů
- Destrukce erytrocytů při HON
- Destrukce erytrocytů při HA
- Imunní komplexy cév, plaků u revmatických aj. autoimunitních onemocnění

Autoimunita

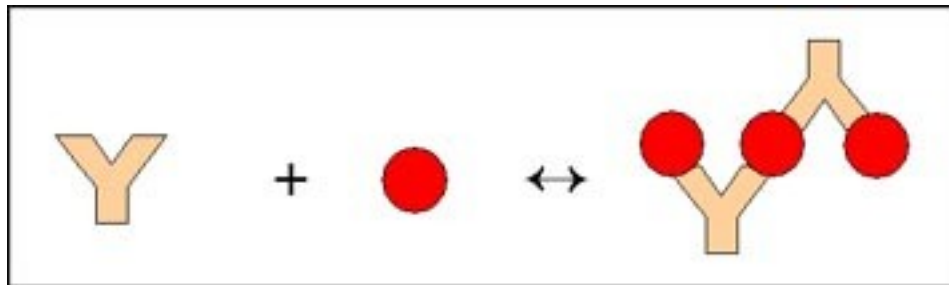
- Reakce imunitních buněk s vlastními antigeny při **selhání fyziologické regulace**
- Vznik autoprotilátek nebo cytotoxická aktivace T bb. včetně cytokinové aktivace B bb. vede k poškození tkání
- Dědičná dispozice (MHC geny i non-HLA geny) + spouštěcí faktory z okolí (infekce, záněty)
- U 1-2% jedinců manifestní porucha autoimunity
- V imunohematologii nálezy u AIHA, po transplantacích, po léčích apod.

Imunohematologická vyšetření

Cíl: detekce imunních komplexů Ag+Ab

- Hemaglutinační reakce = aglutinace (antigen = partikule ery, trc, leu)
- Vzácně jiné metody (ELISA, imunofluorescence, FCM, dnes častěji chipy, PCR...)
- Rutinní použití pro stanovení antigenů, vyšetření protilátek, předtransfuzní testy
- Různé provedení metody - testy sklíčkové, zkumavkové, pevná fáze, **sloupcová aglutinace v gelu**
- Testy při teplotě 20-23°C (PT), 4°C, **37°C** dle cíle vyšetření

Přímá aglutinace



Titr / prozona - aglutinace kvantitativní

Patient	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Pos.	Neg.	Titer
1	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	●	○	64
2	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	●	○	8
3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	○	512
4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	<2
5	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	●	○	32
6	○	○	●	●	●	●	●	○	○	○	●	○	128
7	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	●	○	32
8	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	4

Reakce-spojení Ag x Ab

Slabé non-kovalentní vazby

Reverzibilní za určitých podmínek

- *Typy chemických vazeb*
 - Hydrofobní (proteinové Ag)
 - Vodíkové (sacharidové Ag)
 - Elektrostatické-polarizované
 - Van der Waalsovy síly

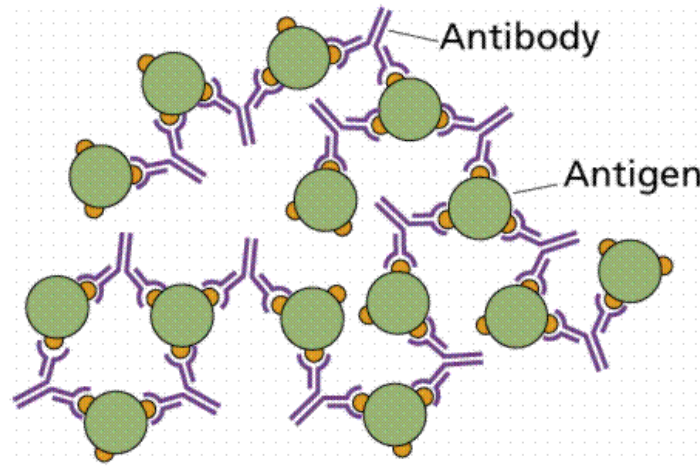
Aglutinace přímá/ solný test

- 1.fáze **senzibilizační**
- 2. fáze **aglutinační**

1. fáze *Vytvoření slabé vazby mezi Ag a Ab*

- Hlavně pro IgM
- Podle typu Ig závisí na teplotě (klinický význam 37°C, při vyšší teplotě disociace molekul Ab z vazby, při nižší teplotě prodloužení inkubace)
- Iontová síla prostředí (obsah iontů Na a Cl = izotonický roztok PBS, neutralizující efekt. Při použití LISS rychlejší vznik imunních komplexů)

- pH prostředí (přijatelné cca 7. Pro některé Ab individuální. PBS zajišťuje alkalizaci. V nižším pH disociace Ab)
- Počet antigenních míst/densita (nadbytek Ag x nadbytek Ab), poměr sérum/erys (snížení vede k vyšší senzitivě testu)



- 2.fáze **Aglutinace**

Vytvoření *pevného spojení mezi Ag a Ab*

- Vznik pevných vazeb mezi senzibilizovanými erys (navázané protilátky přemostí a vzájemně spojí erythrocyty)
- *Při:* změně vzdálenosti mezi erys (zeta potenciál) pomocí centrifugace, proteolytických fermentů, koloidů, polymerů, additiv testů, chemických úprav diagnostických protilátek

Aglutinace nepřímá

- Zásadní význam v imunohematologii
- Hlavně pro IgG, nereagující přímou aglutinací
- Detekuje i jiné typy protilátek podle použitého AGH

- Nepřímá aglutinace v situaci, kdy je **nutné vizualizovat** vzniklé imunní komplexy (u senzibilizující protilátky):
 - úprava erytrocytů pomocí **enzymů**
 - použití testu s **AGH** (antiglobulin human)

Nepřímá aglutinace

Enzymové testy:

Bromelin, ficin, papain, trypsin

- štěpí chemické vazby některých sloučenin na membráně erytrocytů (deriváty kyseliny neuraminové) – snižují elektronegativní pole kolem erys
 - odkrývá antigenní místa a membránové antigeny se tak stávají dostupnější pro protilátky
 - vzájemně erytrocyty přibližují, umožňují tím navázání protilátky
 - v prostředí s enzymem získává protilátka spontánně vyšší schopnost aglutinovat erys (autoaglutinace)
 - nevýhoda: mohou se demaskovat nežádoucí antigeny (kryptantigeny + nespecické reakce), obtížná standardizace enzymových testů
- **Jednofázový test** (přidání enzymu do reakce) x **dvoufázový test** (enzymované erys)

Nepřímá aglutinace

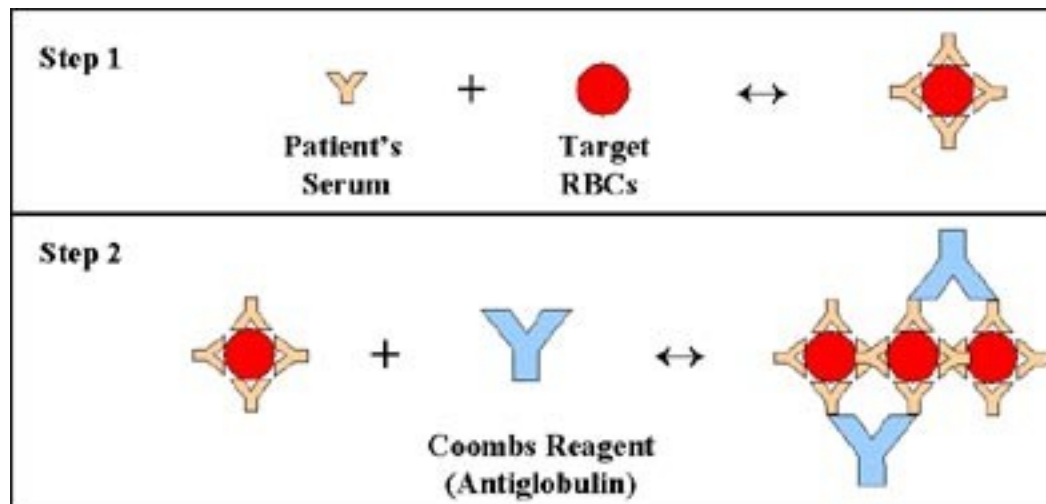
AGH testy/povinné vyšetření:

- Pro vyšetření protilátek v séru i navázaných na erys, zkoušku kompatibility, vyšetření některých krevních skupin
- Používá **protilátku proti lidským proteinům (AGH)**
- Detekce cca 150 molekul Ab u vysoce senzitivních technik
- Různé techniky provedení, modifikace testů se zkrácením doby inkubace v LISS, užití PEG

AGH

Antiglobulinum humanum

- Detekuje lidské proteiny, protilátky a komplement
- AGH aglutinuje erythrocyty senzibilizované protilátkou
- Erythrocyty bez protilátky s AGH nereagují



AGH reagencie/séra

Polyspecifické AGH (-IgG, -C3d):

- Zásadní důležitost: detekuje IgG protilátky a chladové protilátky (aktivující komplement)
- Detekuje všechny klinicky významné protilátky

Monospecifická AGH:

Anti-IgG AGH: nemá antikomplementární aktivitu

- Protilátka proti gamma těžkému řetězci Ig
- Někdy preferovaná před polyspecifickým AGH

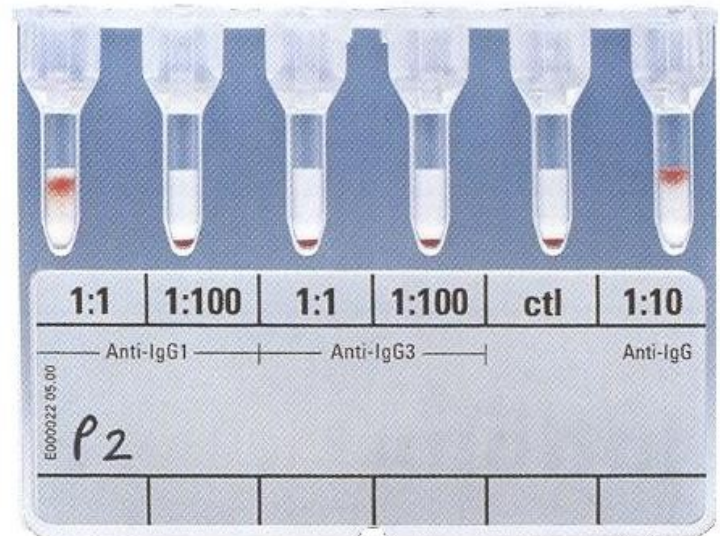
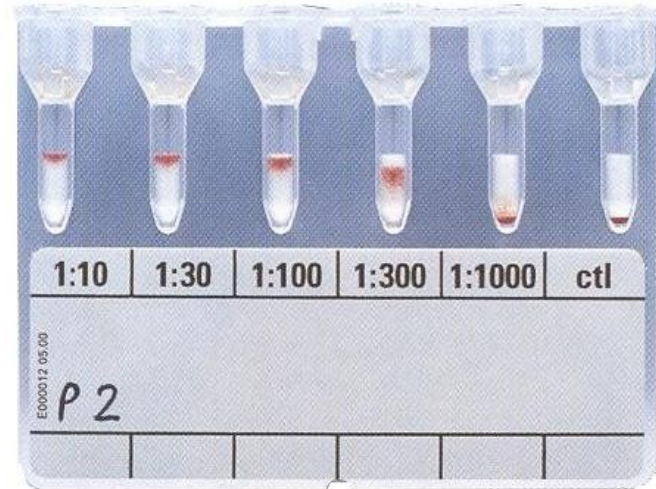
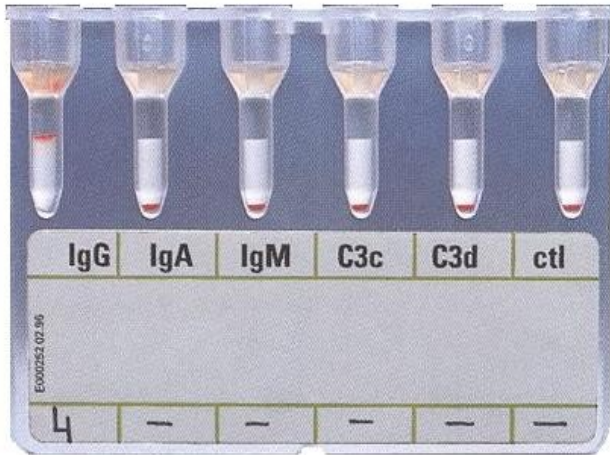
Anti-C sérum (anti-C 3b,c,d):

- Chybí aktivita proti lidské protilátce
- Reaguje s C3 složkou komplementu na erytrocytech
- Detekce některých chladových a tepelných protilátek

Dva typy AGH testů:

1. **Přímý AGH test (PAT)** pro detekci protilátek na erys při in vivo senzibilizaci
2. **Nepřímý AGH test (NAT)** pro detekci protilátek v séru po in vitro inkubaci séra obsahujícího protilátku s erys

AGH diagnostika



Co ovlivní AGH test?

- Teplota prostředí
- Iontová síla prostředí
- Poměr séra/erytrocytů
- Doba inkubace
- Variabilní senzitivita testu (slabý test při cca 200 molekulách navázané protilátky)

Nevýhody AGH testů souvisí s promýváním erytrocytů

Výsledky falešně pozitivní

Spontánní aglutinace, autoprotilátky, kryptantigeny, hypercentrifugace, silikonové zkumavky, volumexpandery, kontaminovaný materiál aj.

Výsledky falešně negativní

Chyba promytí s neutralizací přidaného AGH volnými protilátkami, časové prodlení, nedodržení teploty, kvalita AGH, podcentrifugování, prozora, technické chyby

Povinná kontrola negativního výsledku AGH testu přidáním erytrocytů s navázanou slabou protilátkou - vznikne aglutinace

Jiné metodiky v imunohematologii

- *Precipitace*

Reakce solubilního Ag + solubilní Ab = nerozpustné komplexy (zkumavky, agarový gel)

- *Hemolýza*

Porušení membrány ery + uvolnění Hb z buňky (vyžaduje komplement)

- *Inhibice aglutinace*

Průkaz solubilního Ag nebo Ab inhibicí proběhlé aglutinace (vyučovatelství ABH substancí ve slinách, inaktivace AHG séra balastními Ig)

Flowcytometrie

Měření imunofluorescence buněčné suspenze

Individuálně prováděné vyšetření

Určení slabě exprimovaných antigenů

Odlišení dvojí populace erytrocytů

Molekulárně genetické metody

Určení polymorfizmů krevních skupin při genotypizaci dárce/pacienta/plodu, pacienta po transfuzi apod.

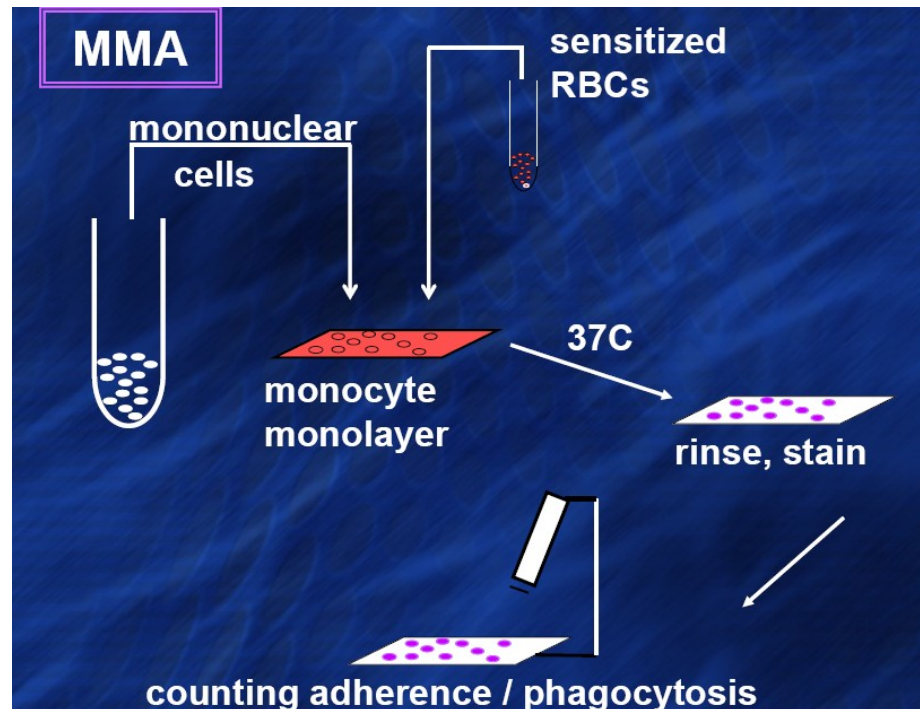
BloodChip

DNA microarray. Analýza signálů scannerem a automatická interpretace genotypů a fenotypů

Stanovení genotypů: 33 AB0, 87 RhD, 9 RHCE, 8 KEL, 4 JK, 4 Fy, 9 MNS, 2 DI, 2 DO, 2 CO

- *Funkční testy*

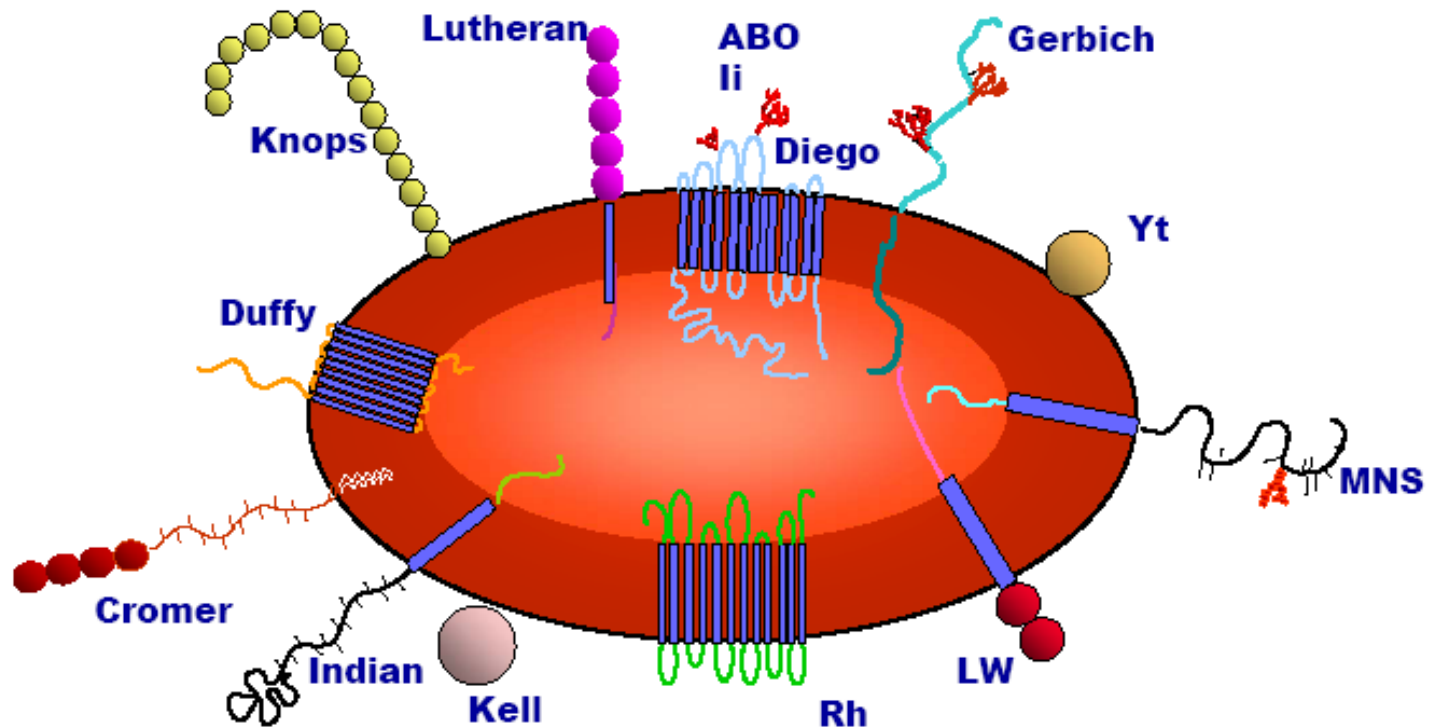
Buněčné testy pro predikci klinického významu protilátek proti erytrocytům. In vitro reakce senzibilizovaných erytrocytů s monocyty. Význam pro HTR, HON



Speciální testy v imunohematologii

- Eluční testy k disociaci protilátky z vazby na erys (eluce teplem, slabou kyselinou, mrazením-rozmrazením, chloroformem, UZV, eterem)
- Adsorpční testy k průkazu protilátky/autoprottilátky, k separaci protilátky ze směsi, k průkazu imunních komplexů a léků na erys, k potvrzení slabých antigenů
- Určení tříd Ig k disociaci aglutinátů tvořených IgM protilátkami
- Neutralizace (inhibice) protilátky překrývající jinou protilátku, solubilní substance Le, P₁, Chido
- Stanovení ABH Lewis substancí ve slinách
- Diluční techniky pro titraci
- Kombinace technik

Krevní skupiny erytrocytů



Krevní skupiny/skupinové systémy

- Krevní polymorfizmy odlišující jedince
- Membránové/povrchové antigeny erytrocytů
- Produkty jednoho genu nebo komplexu vzájemně souvisejících genů
- Bialelické systémy (alela mateřská a otcovská)
- Podléhají pravidlům mendeliánské dědičnosti
- Dnes cca 33 skupinových systémů s 360 antigeny

- Syntetizované většinou na erythrocytech, ale také naadsorbované z plazmy na buňky
- Zastoupení nejen na erys, ale i na buňkách jiných tkáních
- ABO histokompatibilní antigeny
- Antigeny proteinové nebo sacharidové (oligosacharidy-glykoproteiny-glykosfingolipidy-glykolipidy) s biologickými funkcemi
- Immunogeny/cizorodé = vznikají proti nim aloprotilátky

Rozdělení krevních skupin podle funkce

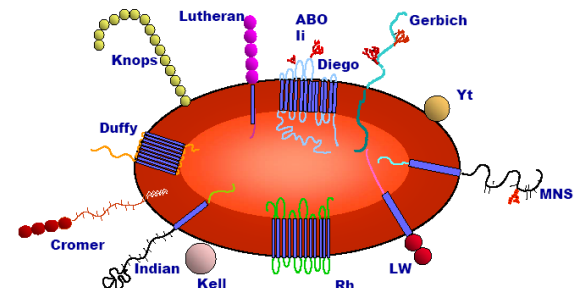
1. Strukturální skupiny

- Integrální membránové proteiny (traverzují x-krát membránou nebo mají intracelulární N-nebo C-zakončení)

2. Funkční skupiny

- Udržují integritu buňky
- Transportéry
- Aktivní enzymy
- Receptory pro ligandy, adhezivní funkce

Blood Groups on the RBC



JR Story

Slide courtesy of E. Sjöberg Wester

Terminologie

ISBT terminologie od r.1980, kontinuální up-date.

Numerické označení:

- Šestimístné číslo pro antigen (005001 Lu^a)
- První trojčíslí pro systém (005 Lutheran)
- Druhé trojčíslí identifikuje antigen (001Lu^a)

Alternativní označení (prakticky používané):

- LU:-1,2 odpovídá fenotyp Lu(a-b+)

Dědičnost krevních skupin

- Dominantní, recesivní, kodominantní alela
- Homozygotní jedinec: zdědil stejné alely v lokusu chromozomu (A/A , B/B, 0/0, K/K)
- Heterozygotní jedinec: zdědil různé alely v lokusu (A/0, B/0, A/B, K/k)
- Genotyp: genetická charakteristika jedince, určuje, jaké vzniknou antigeny
- Fenotyp: manifestní znaky, vyšetřené antigeny krevních skupin (dominantní znaky), nemusí souhlasit s genotypem

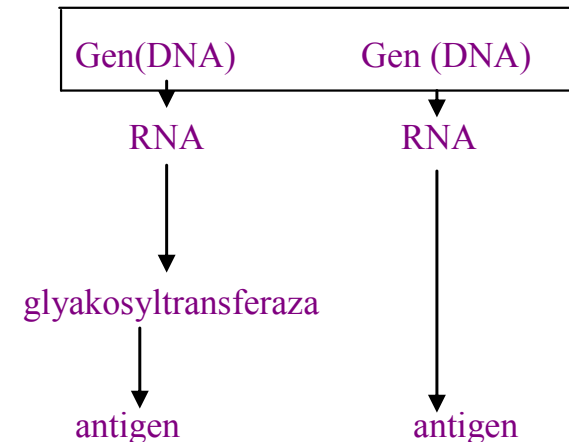
AB0 systém - dědičnost

Matka/ otec	00 0	AA,A0 A	BB,B0 B	AB AB
00 0	00	A0,00	B0,00	A0,B0
AA,A0 A	A0,00	AA,A0, 00	AB,A0, B0,00	AA,AB, A0,B0
BB,B0 B	B0,00	AB,A0, B0,00	BB,B0, 00	AB,BB, A0,B0
AB AB	A0,B0	AA,AB, A0,B0	AB,A0, BB,B0	AA,AB, BB

Molekulární biologie krevních skupin

- Určuje chemickou podstatu antigenů (bb. biochemie)
 - Určuje genetickou podstatu antigenů, detekci alel
1. Cukry glykosylující proteiny a lipidy
např. AB0 Le P H I Globo
 2. (Glyko) Proteiny
např. Lu Fy Rh Jk Di Co Kell Do JMH

Gen.....Antigen



AB0 systém

- nejvýznamnější systém krevních skupin
- histokompatibilní antigeny
- poznání od r.1900
- alela A a B (vyžaduje gen H)
- dva antigeny: A, B
- 4 fenotypy A = 6 genotypů A/A, A/0
B = B/B, B/0
AB = A/B
0 = 0/0

Základ všech AB0 skupin: H antigen

- Dva geny: FUT1(**gen H**) + FUT2 (gen Se)
- FUT1 na erytrocytech
- FUT2 v sekrečních epiteliálních buňkách
- FUT geny kódují **H-transferázu**, která připojuje fukózu k prekurzorové substanci na erytrocytu nebo k prekurzoru v sekretech a **vzniká antigen H (0)**

A,B antigeny

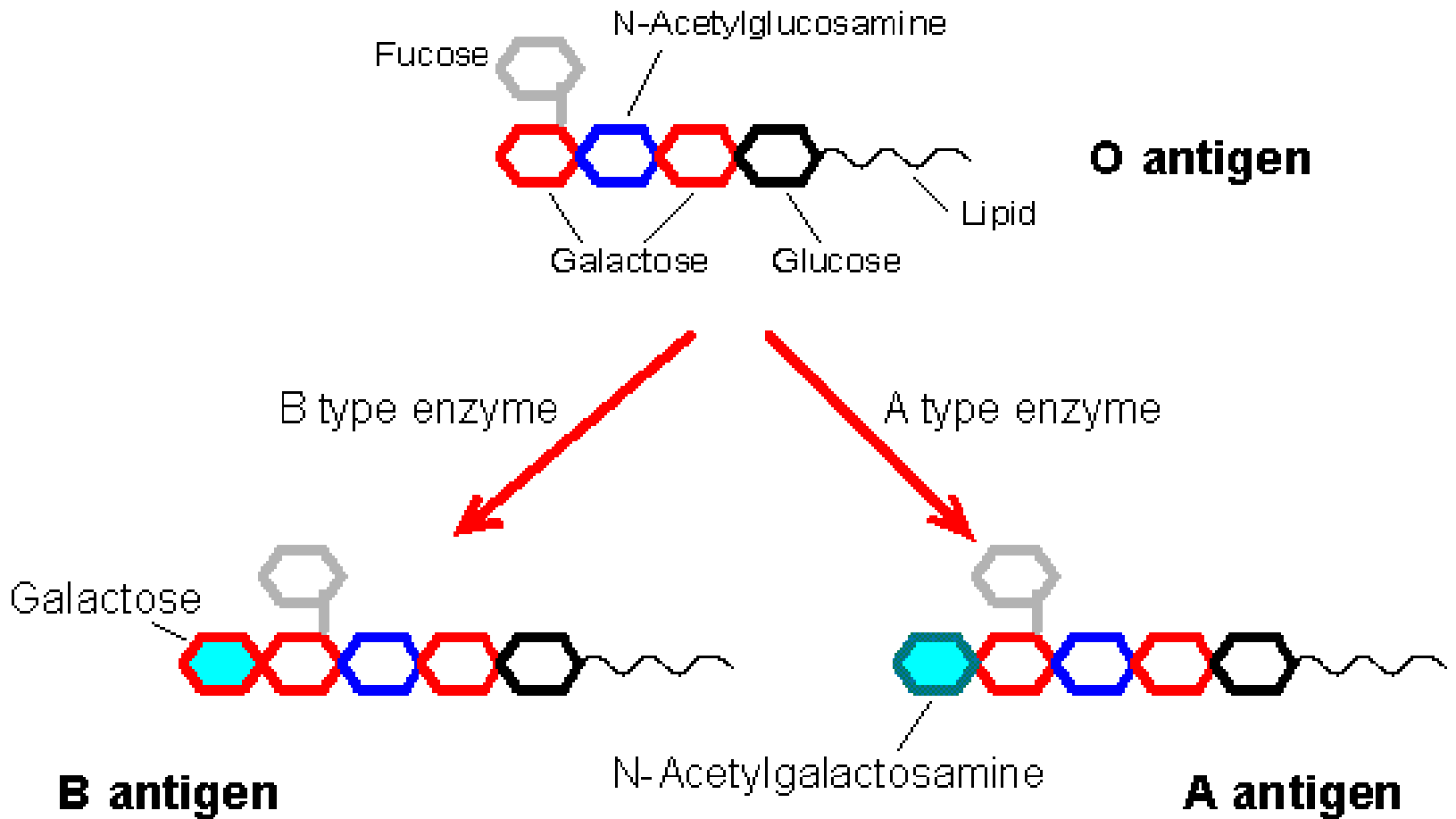
- 0 alela = neaktivní gen

Neprobíhá substituce oligosacharidů, exprimuje původní H antigen s fukózou

- A alela = A transferáza = transfer GalNAc
- B alela = B transferáza = transfer Gal

Připojením molekuly galaktozaminu nebo galaktózy k H antigenu vznikne skupinově specifický (A nebo B) antigen

- polymorfismy genů = různá aktivita transferáz = různě silné antigeny při vyšetření krevní skupiny



AB0 sekretorství / vylučovatelství

- ABH antigeny v solubilní formě v tělních tekutinách
- gen FUT2 (Se)
- 80% osob jsou sekretoři: podle AB0 skupiny na erys jsou v sekretech A, B nebo H antigen
- 20% osob nonsekretoři: v sekretech žádné ABH antigeny
- stanovení sekretorství: detekce ABH substancí ve slinách (inhibiční test)

Podskupiny A1 a A2: odlišnosti

Kvantitativní rozdíly

- A1 nejčastější podskupina
- A1(A1B) silná skupina, silná exprese A antigenu (více aktivní enzym)
- A2 (A2B) slabá skupina, slabá exprese A antigenu

Kvalitativní rozdíly

- A1 erythrocyty: antigen A + A1
- A2 erythrocyty: antigen A
- Vznik nepravidelných protilátek v rámci A podskupiny

Ostatní slabé A podskupiny

- změny-zeslabení A a B antigenu na erythrocytech
- také změny antigenů v sekretech
- příčina: genové mutace provázené změnou fenotypu
např. $A_3, A_x, A_m, A_{el}, A_{end}$ / B_3, B_x, B_m, B_{el}
- příčina: vzácné alely
- problémy při určení AB0 antigenů skupiny
- nález nepravidelných AB0 protilátek (anti-A1, anti-H)

Získané změny antigenů

Získaný antigen B u osob skupiny A

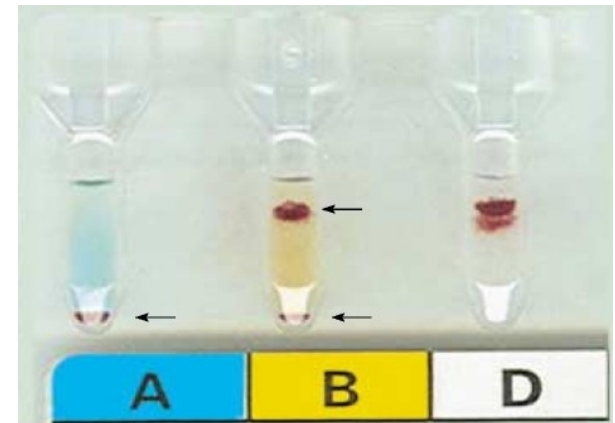
- slabší reakce získaného antigenu B

Zeslabení antigenů (obvykle A antigenu)

- leukemie, malignity

Chimérické antigeny (B/0)

- potransfuzní, potransplantační,
F-M krvácení, genetická chiméra

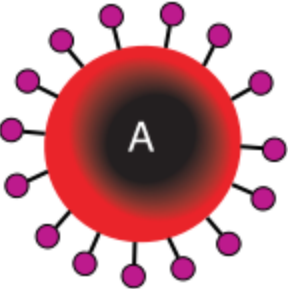
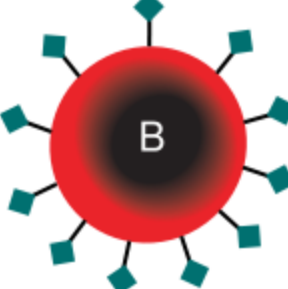
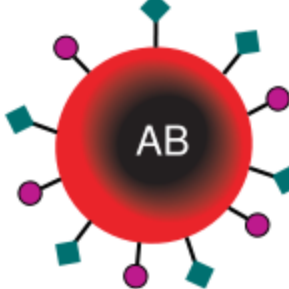
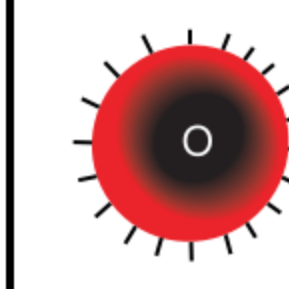


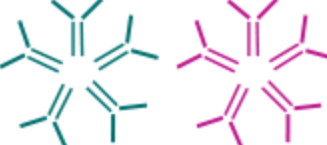





H - deficitní fenotypy

- homozygotní forma inaktivního genu FUT1 (h/h)
- nevzniká H transferáza a H antigen, i přes funkční A a B transferázy chybí prekurzor pro A a B antigeny
- chybí reakce s anti-H dg.sérem
- fenotypově skupina 0 (ale nesoulad přední x zadní řady)
 - nonsekretoři/ typ Bombay mají v séru kromě anti-A a anti-B tepelnou a klinicky významnou anti-H
 - sekretoři/ dříve paraBombay
- velký problém se zajištěním transfuze (rodina, autotransfuze, registry dárců krve)

AB0 protilátky

- odlišují AB0 systém od všech ostatních skupin
- pravidelné protilátky odpovídají AB0 antigenům
- přirozené protilátky následkem „imunizace“ A,B substancemi z okolí
- dvě protilátky: anti-A a anti-B, u osob 0 také anti-A,B
- vzácně jiný nálezn: novorozenci, slabé skupiny, nemoci
- od 4. měsíce věku dostatečný titr Abs, stacionární během života, změny při imunizujících stavech v těhotenství, po transfuzích
- AB0 protilátky IgM, ale i IgG nebo IgA

	A	B	AB	O
				
	 Anti-B	 Anti-A	O	 Anti-A a Anti-B
	 A antigen	 B antigen	 A B antigen	O antigen

Laboratorní vyšetření: ABO antigeny na erytrocytech

- dg.sérum anti-A, anti-B (anti-A,B)
- monoklonální séra pro solný test/teplota laboratoře
- polyklonální séra (-A,-B,-AB)
- metoda zkumavková, sloupcová aglutinace, pevná fáze, sklíčková
- rostlinné lektiny (monoklonální séra) pro odlišení A1 podskupiny
- rutinně prováděná kontroly kvality reagensů (s ery A1,B)

Laboratorní vyšetření - pravidelné AB0 protilátky v séru

- detekce pomocí dg.erytrocytů A₁,B (ery 0 nebo autoctl.)
- solný test pro přímou aglutinaci/ teplota laboratoře s inkubací
- zřetelné aglutinace
- do 4. měsíce věku se nevyšetřují (chybí, mateřské Ig)

	0 (anti-A,B v séru)	A (anti-B v séru)	B (anti-A v séru)	AB(žádné protilátky)
Dg.ery 0	0	0	0	0
Dg.ery A1	+	0	+	0
Dg.ery B	+	+	0	0

AB0 diskrepance

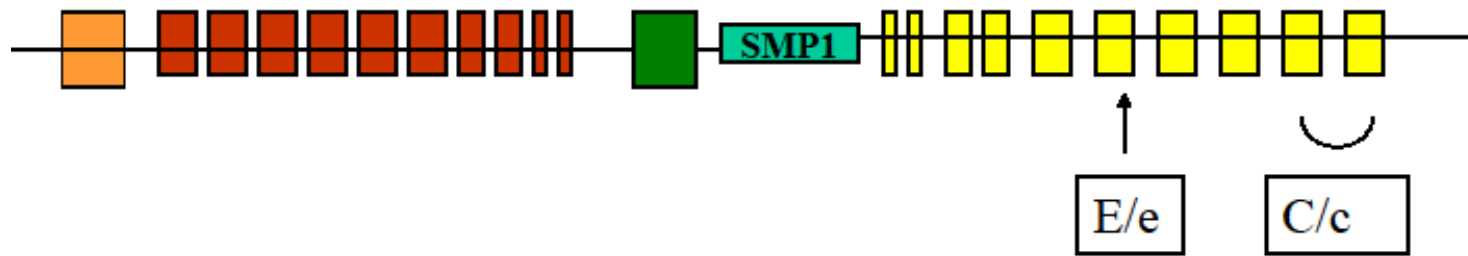
- Jsou při vyšetření antigenů nebo protilátek
- Diskrepance je nutné vyřešit před uzavřením výsledku
 - Opakovat vyšetření, provést vyšetření z nového vzorku, použít jiné reagensie spolu s kontrolami, jiné reakční teploty, promytí erytrocytů, eluční techniky apod. dle typu problému
- Pokud není stanovena skupina – univerzální režim: podávat 0 erytrocyty, AB plazmu

- Princip sérologického vyšetření ostatních krevních skupin je stejný: Antigeny na vyšetřovaných erythrocytech detekujeme pomocí specifických diagnostických protilátek (dg. sér) v testu a technikou, které umožňují jejich průkaz. Je to naprosto dostačující pro běžné diagnostikování.
- Kromě AB0 nejsou v jiné skupině pravidelné protilátky (proto dvojí potvrzení antigenu).
- Genetické vyšetření umožní precizní diagnostikování skupinových antigenů, je zvláště přínosné u variantních antigenů, u transplantovaných a transfundovaných jedinců.

Rh systém

- dva související geny *RHCE* a *RHD*
- *RHD* gen kóduje RhD protein (D+, negativní fenotyp D-)
- *RHCE* gen kóduje RhCcEe protein (kombinace antigenů Ce,ce,cE,CE)
- *RHAG* gen je nutný pro Rh aktivitu: tetramerické komplexy Rh glykoproteinu s Rh proteiny
- každý gen 10 exonů, charakteristické uspořádání

Organisation of genes encoding RhD and CcEe



10 exons encoding the D protein plus 2 Rh boxes

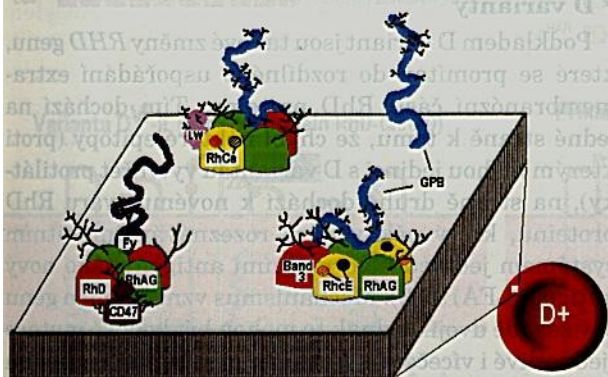
10 exons encoding the CcEe protein

- D antigen chybí při
 - delecí celého genu (naše populace)
 - hybridním genu
 - inaktivním RHD pseudogenu
- mutace genu, rekombinace mezi genovými oblastmi vedou ke vzniku vzácných D alel
- změn v genu se manifestují jako **změny ve fenotypu (variantní D antigeny)**

to krvínek i inkem inkompletní (IgG) anti-RhD protilátek.

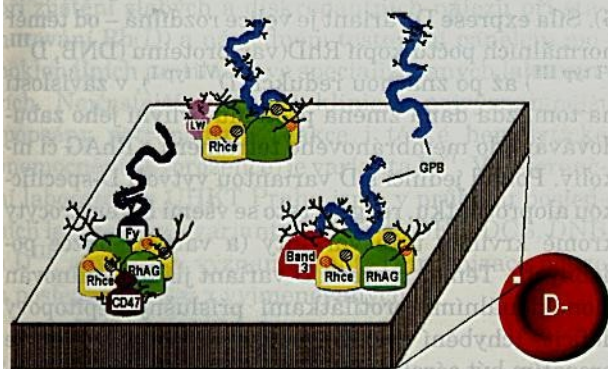
• Rh_{null} a Rh_{mod} fenotypy

Na krvinkách těchto fenotypů nejsou prokazovány žádné Rh antigeny (Rh_{null}), nebo jsou velice zeslabené a prokazatelné jen nejcitlivějšími metodami (Rh_{mod}). Podle způsobu dědičnosti byly rozeznávány dva typy Rh_{null}: amorfní (heterozygotní potomci těchto jedinců – přenašeči amorfní alely, ač sérologicky vypadali jako homozygoti, přenašeli své Rh antigeny jen na 50 % potomků) a regulátorový typ (zde v potomstvu přenašečů regulátorové alely byly děděny Rh antigeny normálním způsobem). Metody molekulární biologie od-



RhD+ (D+ C+ c+ E+ e+)

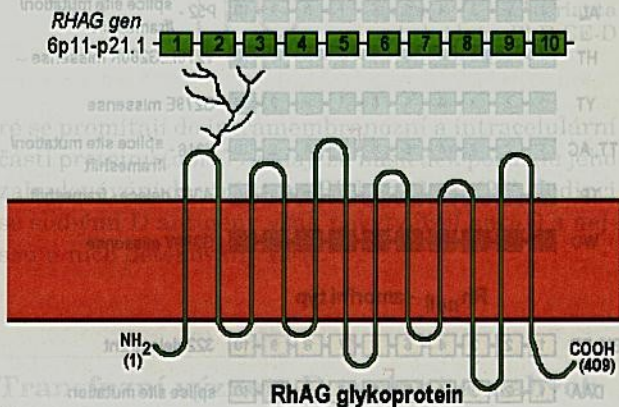
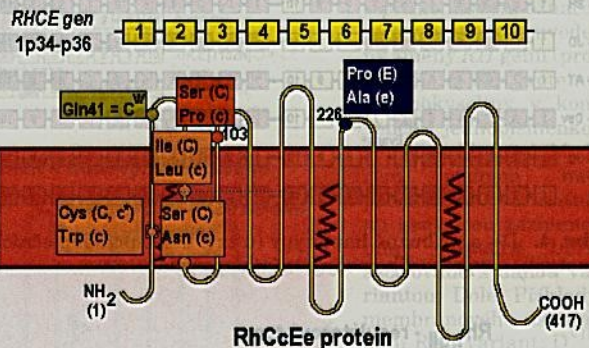
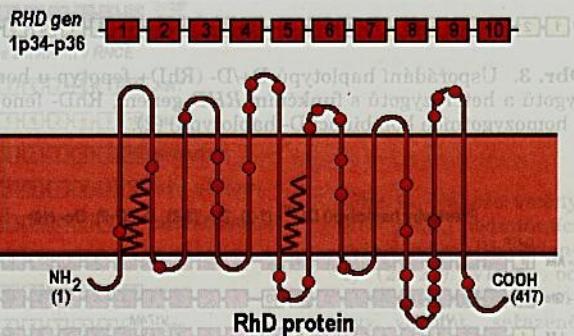
RHD-RHCE/RHD-RHCE



RhD- (D- C- c+ E- e+)

RHCE/RHCE

Obr. 1. Membránové uspořádání struktur Rh komplexu na RhD+ (D+ C+ c+ E+ e+) krvinkách (nahoře) a na RhD- (D- C- c+ E- e+) krvinkách (dole).



Obr. 2. Schéma uspořádání RHD, RHCE a RHAG genů a předpokládaná dvourozměrná struktura proteinů RhD, RhCcEe a glykoproteinu RhAG v membráně erythrocytu. Na RhD proteinu zvýrazněny aminokyselinové substituce, odlišné od RhCcEe. Na RhCcEe proteinu zvýrazněny aminokyseliny, zodpovědné za expresi alelických antigenů C/c a E/e a C' antigeny. Zuhotě žlutě zvýrazněný předpokládaný místo palmitinové modifikace.

Rh antigeny

- antigeny D,C,c,E,e
- lokalizované na RhD a RhCE proteinu
- výskyt dle typu populace (D+ cca u 85% Evropanů, 90% Afričanů)
- vysoce imunogenní proteiny (složité molekuly)
- několik desítek tisíc kopií na erytrocytu dle genotypu

- sérologické rozeznání pomocí dg. sér anti-D,-C,-c,-E,-e
- 3 páry alel umožňují vznik 8 haplotypů a 36 genotypů
- zygocii D/D a D/d nelze sérologicky odlišit

Antigeny	Fenotyp	Genotyp
D+C+c-E-e+	DCe/DCe R ₁ R ₁	DCe/DCe R ₁ R ₁ DCe/dCe R ₁ r'
D+C- c+E+e+	DcE/dce R ₂ r	DcE/dce R ₂ r DcE/Dce R ₂ R ₀ Dce/dcE R ₀ r''

Rh nomenklatura

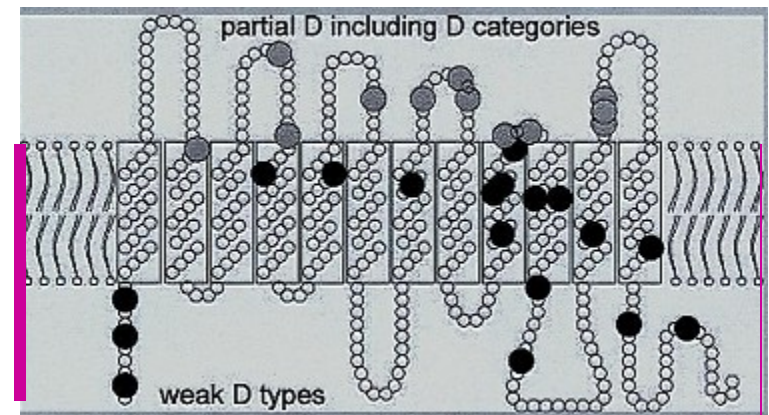
- Písmenová: D,C,E,c,e, f,C^w,C^x,Hr₀,Hr,Har,hr^S...
- Fisherova + Wienerova: DCE = R₁
DcE = R₂
Dce = R₀
DCE = R_z
dce = r
dCe = r'
dcE = r''
dCE = r^Y

Abnormální typy Rh antigenů

- u cca 1 % osob
- D-- : chybí antigeny RhCcEe proteinu
- Rh_{null}: chybí všechny Rh antigeny
- Rh_{mod}: změna exprese, zeslabené Rh antigeny
- Variantní D antigeny:
 - Weak D: kvantitativní změna antigenu
 - Parciální D: kvalitativní změna v mozaice antigenu

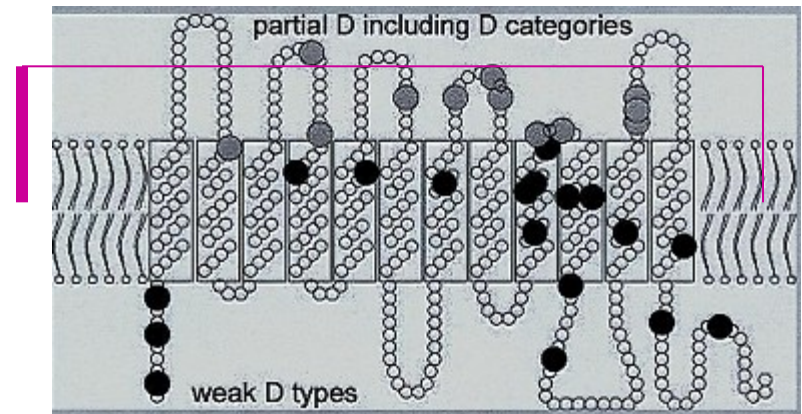
Weak D, D^w

- Původní terminologie „D^u“, slabě exprimovaný antigen
- Všechny D epitopy, žádná změna AMK v extramembranozní části RhD proteinu, mutace postihují intramembranozní a intracelulární část proteinu
- Nebývá riziko imunizace D antigenem
- Příjemci: RhD+ transfuze
- Těhotné: anti-D profylaxe ne



Parciální (variantní) D, D^{var}

- Chybí jedna nebo více částí/epitopů D antigenu (změna v extramembranózní části RhD proteinu)
 - některé epitopy chybí, zbývající slabě vyjádřené
 - antigen je složený z jiných epitopů = **nový tvar proteinu**
- Problém: vznik alo-anti-D po transfuzi nezmáného D epitopu
- Příjemci: RhD- transfuze
- Těhotné: anti-D profylaxe ano



Vyšetření RhD

- rutinní vyšetření D antigenu v rámci krevní skupiny
- dříve polyklonální IgG protilátky, dnes převažují monoklonální protilátky
- různé typy diagnostik anti-D: IgM, blend IgM/IgG, IgG
- duplicitně provedené vyšetření dvěma dg. séry s odlišnými klony (detekce jiných epitopů)
- validace testu - použití kontrolního séra (Rh ctl) pro odlišení falešně pozitivních výsledků u některých stavů

Cíl vyšetření D antigenu:

Dárce krve/event. novorozenec:

- zachytit **všechny** typy D antigenu
- 2 různá séra pro aglutinační test
- **došetření slabých** antigenů pomocí dg. sér v NAT

Příjemce/těhotná:

- ideální, ale nereálné: parciální D=RhD neg, weak D=RhD poz
- 2 dg.séra **bez detekce DVI** varianty
- **nedošetřovat slabé** antigeny

Sledovat **diskrepance** při použití různých diagnostik

Došetření sérologické, molekulárně genetickými metodami.

C,c,E,e antigeny

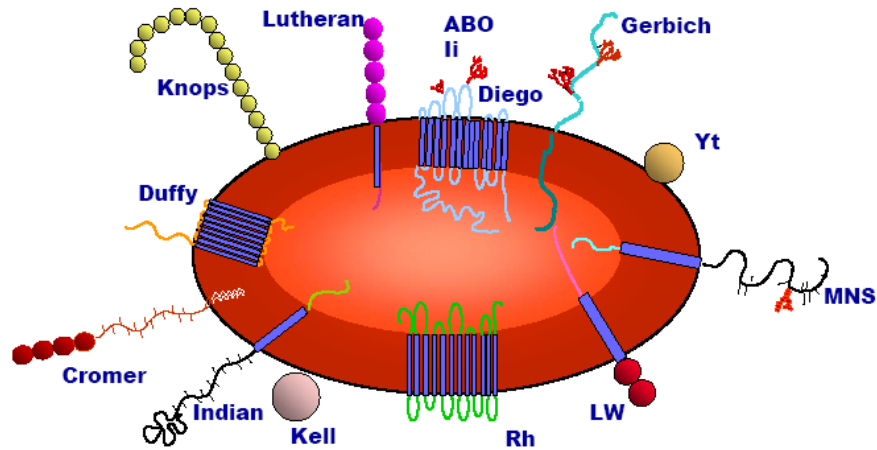
- produkty alely RHCE
- frekvence: C 68%, c 81%, E 29%, e 98%
- substituce aminokyselin v RhCcEe proteinu vede ke vzniku slabých a variantních antigenů
- složené antigeny ce, Ce, CE, cE, antigen G
- antigeny méně časté C^w, C^x

Rh protilátky

- klinicky významné, imunní - vedou k destrukci erys
- IgG
- neaktivují komplement, vedou k extravaskulární hemolýze
- placenta pro ně má receptory
- klinické souvislosti: HON, HTR
- anti-D, -E, -c, -C, -e, -Cw
- anti-Rh tepelné autoprottilátky u AIHA
- profylaktické použití anti-D u HON
- průkaz v testech při 37°C
- zvýšená reaktivita v enzymovém testu, efekt dávky

Ostatní krevní skupiny

Blood Groups on the RBC



JR Story

Slide courtesy of E. Sjöberg Wester

Ii

- antigen i je prekurzorem antigenu I
- i fenotyp dominuje u novorozenců
- I fenotyp u dospělých
- antigeny podobné systému AB0 jsou přítomné na erys i v sekretech
- protilátka anti-I u CAD (průkaz pomocí erys_{cord})

Lewis /Le

- souvisí s AB0 a H/h systémem
- spolupůsobením genu *Le* a *Se* vzniká antigen Le^a
- další vliv *Le* genu na antigen $Le^a =$ antigen Le^b
- glykolipidy, syntéza neprobíhá na erytrocytech, na erys se navazují z plazmy, jsou obsaženy v sekretech
- základní antigeny Le^a , Le^b
- fenotypy

$Le(a+b-)$ u ABH nonsekretorů

$Le(a-b+)$ u ABH sekretorů

$Le(a-b-)$ homozygot pro gen Lewis nesyntetizuje antigeny

Lewis - protilátky

- přirozené protilátky, bez imunizačního podnětu u jedinců Le(a-b-)
- anti-Le^a, anti-Le^b
- IgM izotypy – lab. průkaz v chladových testech
- nebývají aktivní při 37°C (vzácně hemolýza)
- asociace s orgánovými transplantacemi

Kell.

Kel, Cellano

- glykoproteinové antigeny
- silné imunogeny
- přibližně 25 antigenů v systému
- antitické alely K/k , Kp^a/Kp^b , Js^a/Js^b
- časté numerické označení antigenů (K1, K2..)
- 90% jedinců nemá K (Kel), 1% nemá antigen k (Cellano)
- vzácný fenotyp K_0 nemá žádné antigeny Kell systému

Kell - protilátky

- imunní protilátky
- IgG typ
- klinicky významné
- v etiologii HON (navíc suprese erythropoezy), HTR
- častá anti-K, vzácně anti-k
- unikátní anti-K_u reaguje se všemi erytrocyty s výjimkou K_o fenotypu

Kidd /Jk

- glykoproteinové antigeny
- alely *JKA*, *JKB* , ostatní vzácné
- nulový fenotyp Jk(a-b-) u Polynézanů

Funkce:

- transport urey
- udržení osmotické stability a deformovatelnosti ery

Kidd - protilátky

- málo časté
- nebezpečné, podléhají rychlé fagocytoze - přehlédnutelné - rychlá sekundární anamnestická odpověď, akutní potransfuzní reakce typu HTR
- imunní IgG typ, hemolyzující účinek při aktivaci komplementu
- efekt dávky u homozygotní exprese
- zesílené reakce v enzymových testech
- vzácně u HON

Duffy /Fy

- glykoproteinové antigeny
- alely Fy^a , Fy^b , alela Fy u Afričanů

Funkce

- receptor pro *Plasmodium knowlesi* = úloha v zánětu a při malarické infekci
- fenotyp $Fy(a-b-)$ protektivní pro malarii
- destruatelné proteolytickými enzymy – pozor v laboratorních testech při použití enzymů

Duffy - protilátky

- relativně častá anti-Fy^a
- méně častá anti-Fy^b
- anti-Fy³ pravidelně u null formy
- imunní IgG typ
- HON vzácně, někdy HTR

Lutheran /Lu

- glykoproteinové antigeny
- Gen *LU*
- přes 20 alel, většina vysokofrekventních
- po narození slabé Ag, postupně zesilují (nebývá HON)

Funkce: buněčná adheze, erytropoeza

Lutheran - protilátky

- málo časté
- většinou IgM, v chladových testech
- někdy IgG v testech při 37°C
- často v kombinaci s HLA protilátkami
- efekt dávky u homozygotní exprese
- považované za klinicky nerelevantní

MNS

- Glykoforiny transmembránové
- *GPA* gen = MN antigeny
- *GPB* gen = Ss antigeny
- antigeny obsahují kyselinu sialovou- tvoří negativní povrchový náboj erytrocytů

Funkce:

- receptor pro komplement, cytokiny, bct, viry

MNS - protilátky

- většinou přirozené protilátky
- -M,-N bez klinického významu
- efekt dávky u homozygotní exprese
- -S,-s vzácně HON a HTR při aktivitě v NAT
- anti-N-like u dialyzovaných pacientů
- raritní anti-U u jedinců S-s-U-

P systém

- oligosacharidové antigeny
- P_1 , P a P^k
- raritní fenotyp p

Funkce:

- P antigen je buněčný receptor pro bakterie (na erys pro parvovirus B19)

P systém protilátky

- častá anti-P₁ jako přirozená chladová protilátka
- nebývá HON, HTR
- anti-P, -P^k, -p jsou vzácné
- anti-PP₁P^k u raritního fenotypu p
- anti-P jako IgG autoprottilátka u dětského typu AIHA (Paroxysmální chladová hemoglobinurie) má charakter bifázického hemolyzinu
- výskyt v komplexu s jinými protilátkami (-IP₁, -IP)

Chido/Rodgers

- nejsou pravé antigeny
- dvě formy jsou součástí C4A a C4B složky komplementu
- přítomné v plazmě, odtud se navazují na erytrocyty a makrofágy

Funkce proteinů

- patří ke klasické aktivaci C
- protilátky imunního typu, alergické potravní reakce

Colton /Co

- gen *AQP*
- *AQP1* a *AQP3* exprimované na erythrocytech.
- 11 antigenů, časté antigeny Co^a, Co^b

Funkce

- zajišťují transport molekul vody membránou erys podle osmotického gradientu

Tkáňová distribuce

- většina tkání včetně erys

Protilátky IgG imunní, HTR, HON

Cromer /Cr

- součást DAF(CD55) = komplementregulační protein

Funkce

- regulace komplementu, chrání tkáň inhibicí C3 a C5 aktivovaných složek komplementu
- deficientní DAF u PNH

Diego /Di

- hlavní integrální protein membrány
- absence je spojena se sferocytózou a hemolýzou
- nese AB0 antigeny

Funkce

- udržuje strukturu a stabilitu buňky
- účast při vzniku senescentních Ag na starých erys
- adheze parazitů (malárie) na erys
- zajištění flexibility a tvaru buňky, transportu iontů

Protilátky imunní, IgG, HTR

Dombrock /Do

- glykoproteinové antigeny
- neznámá funkce, ztráta antigenu u PNH

Protilátky:

- obvykle ve směsi jiných protilátek
- imunní IgG, neaktivují komplement

Gerbich /Ge

- Glykoproteinové antigeny

Funkce

- udržují integritu buňkyn a negativní povrchový náboj erys

Asociace s nemocemi

- udržují tvar erys a zajišťují deformovatelnost erys, absence může vést k eliptocytoze nebo abnormálnímu tvaru erys

Protilátky imunní, také autoprotiátky v rámci AIHA

Ostatní skupiny

Vysokofrekventní antigeny

Incidence více než 99%

- Vel, Lan, JMH, Sd^a, At^a
- Obtížně identifikovatelné / referenční pracoviště
- Téměř nelze najít kompatibilní erytrocyty pro imunizované

Nízkofrekventní antigeny

méně než 1%

- Chr^a, By, Bi, JONES, HJK, SARA
- Vzácně imunizace transfuzemi, většina dárců antigen nemá

HLA I. třídy na erytrocytech

- Bg antigeny na zralých erytrocytech
- Bg^a = HLA-B7
- Bg^b = HLA-B17
- Bg^c = HLA-A28 (cross A2)
- Exprese jen u malé části populace
- Protilátky proti nim vzácně vedou k HTR

Registry dárců krve

- Národní registr dárců vzácných krevních skupin
- Mezinárodní registry dárců vzácných krevních skupin
- Referenční laboratoře

