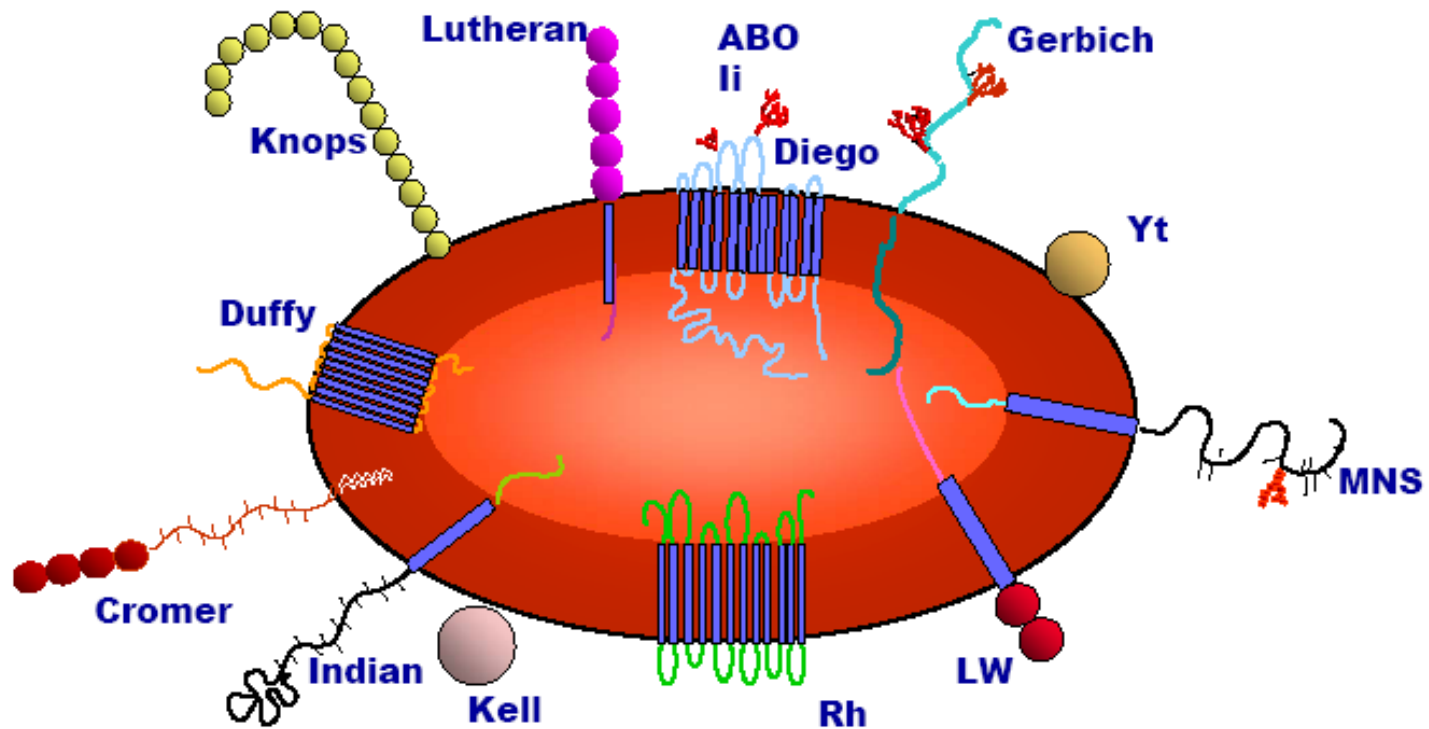


Krevní skupiny erytrocytů

Blood Groups on the RBC



Krevní skupiny /skupinové systémy

- Krevní polymorfizmy
- Antigeny na povrchu membrány erytrocytů
- Produkty jednoho genu nebo komplexu vzájemně souvisejících genů
- Bialelické systémy
- Podléhají pravidlům mendeliánské dědičnosti
- Dnes 26 skupinových systémů s 270 antigeny

Krevní skupiny

- Syntéza:
 - přímo na erytrocytech (nerozpustná forma)
 - v plazmě nebo tělních tekutinách (rozpustná forma)
 - adsorpce z plazmy nejen na erytrocyty, ale také na jiné buňky (nejen krevní, ale i ostatní tkáňové)
- Některé skupiny jsou histokompatibilní (ABO)
- Sloučeniny proteinové nebo sacharidové s biologickými funkcemi
- Detekovatelné různými metodami / serologicky, precizně DNA analýzou
- Aloantigeny, vznikají proti nim protilátky

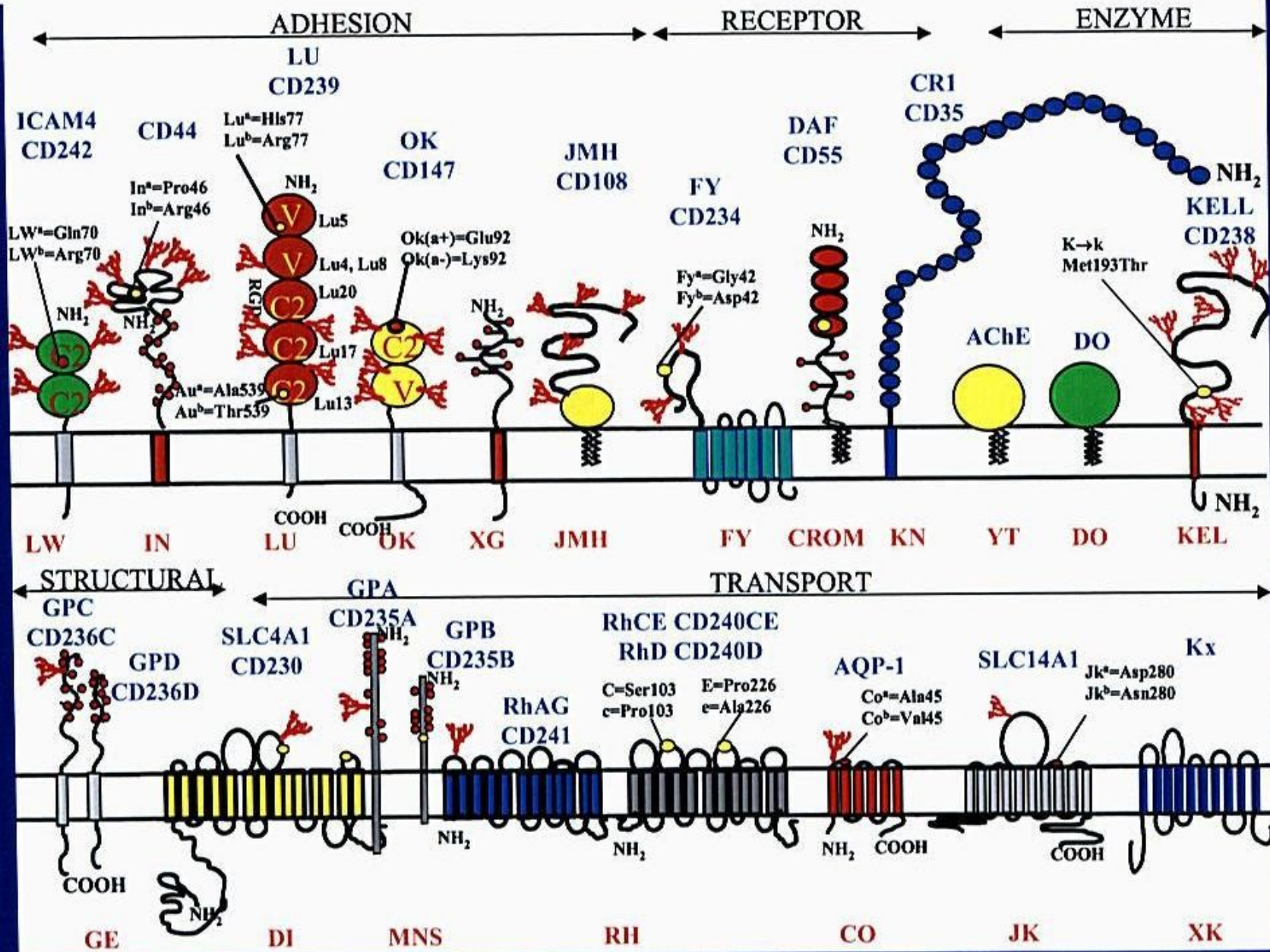
Rozdělení krevních skupin podle funkce v erytrocytu

1. Strukturální skupiny

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

2. Funkční skupiny

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



Terminologie

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

Numerické označení:

- Šestimístné číslo pro antigen (**005001** Lu^a)
- První trojčíslí pro systém (**005** Lutheran)
- Druhé trojčíslí identifikuje antigen (**001**Lu^a)
- Systému odpovídá abecední symbol (**LU**, např. LU 1)
- V genotypu oddělení místem nebo * (**LU 1**, **LU*1**)
- Ve fenotypu znaménko + a – pro přítomnost nebo nepřítomnost antigenu (**LU:-1,2**)

Alternativní označení (běžně používané):

- LU:-1,2 odpovídá fenotyp $\text{Lu}(a-b+)$
- LU:-1.-2 odpovídá Lu_{null} nebo $\text{Lu}(a-b-)$
- DO:1,2,3,4,5 odpovídá $\text{Do}(a+b+)$ $\text{Gy}(a+)$ $\text{Hy}+$ $\text{Jo}(a+)$

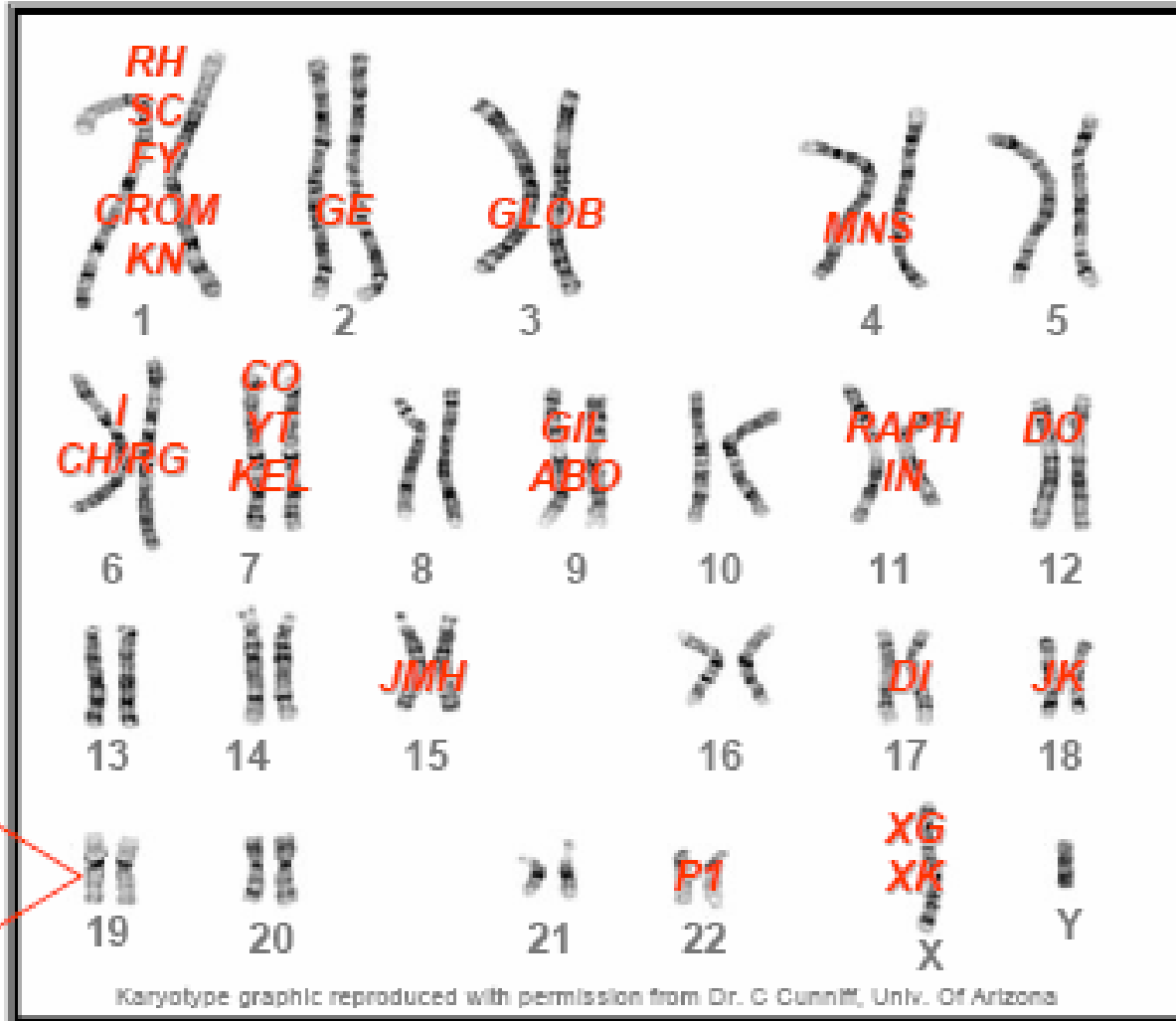
Table of examples of phenotype designations

Numerical terminology	Alternative terminology
ABO:- 1,- 2,- 3	O
ABO:1,- 2,3,4	A ₁
ABO:1,- 2,3,- 4	A ₂
MNS:1,2,- 3,4,5,- 6,7	M+ N+ S- s+ U+ He- Mi(a+) (in ISBT order) Symbols such as Mi.III or GP.Mur, En(a-), M ^k are all acceptable
P:1	P1+ or P ₁
P:-1	P1- or P ₂ (if shown to be GLOB:1)
RH:1,2,- 3,4,5,- 8,- 32,33,- 36	D+ C+ E- c+ e+ C ^{w-} Rh:-32,33 Be(a-) (in ISBT order) The order D C c E e would be an acceptable alternative. Probable genotypes as phenotypes (e.g. R ₁ R ₂ or DCE/dCE; R ₁ r C ^{w+} or DCE/dce C ^{w+}) are acceptable, providing it is made clear that they are only probable genotypes based on haplotype frequencies. Null and mod phenotypes: Rh _{null} ; Rh _{mod} .
LU:- 1,2,3,4	Lu(a- b+) Lu:3,4. Null phenotype: Lu _{null} or Lu(a- b-)
KEL:- 1,2,- 3,4,5,- 6,7,11,12,13,- 17,- 21	K- k+ Kp(a- b+c-) Ku+ Js(a- b+) K:11,12,13,-17 Null and mod phenotypes: K ₀ or Kell _{null} ; K _{mod} .
FY:1,2,3	Fy(a+b+) Fy:3
FY:- 1,- 2,- 3	Fy(a- b-) Fy:-3 Fy ^x may be used as a phenotype
DI:1,2,- 3,4,- 5,- 6,- 7	Di(a+b+) Wr(a- b+) Wd(a-) Rb(a-) WARR-
DO:1,2,3,4,5	Do(a+b+) Gy(a+) Hy+ Jo(a+)

Dědičnost krevních skupin

- Dědičné znaky jsou řízeny určitými oblastmi chromozomů (geny)
- Geny se vyskytují v párech (gen mateřský/otcovský)
- Varianty genu na molekulární úrovni = alely
- Obvykle dvě alely pro určitý gen (bialelismus), může být i více alel v genu (genový polymorfismus)
- Každý gen kóduje vznik specifického *proteinu* (antigenu), který je typický uspořádáním aminokyselin
- Genotyp = genetická charakteristika jedince, určuje, jaké antigeny mají vznikat (dominantní i recesivní znaky)
- Fenotyp = manifestní znaky (dominantní znaky)

Blood Groups Are Inherited As The Products of Genes



LE
OK
LW
LU
H

JK Storry

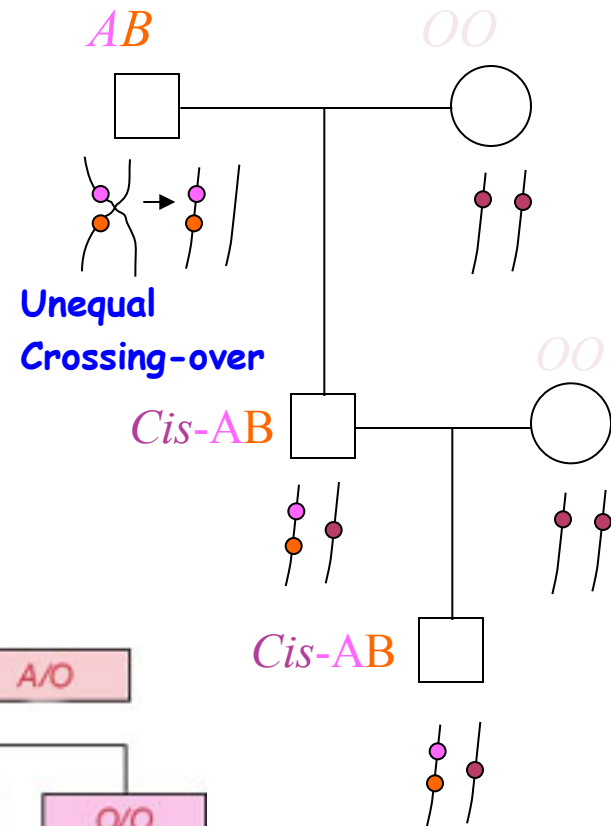
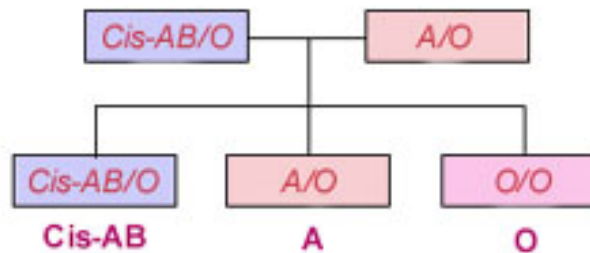
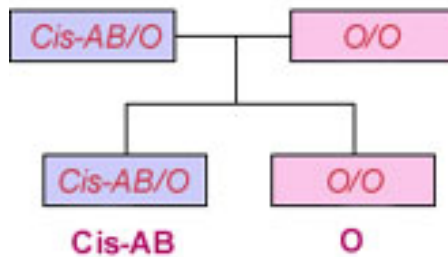
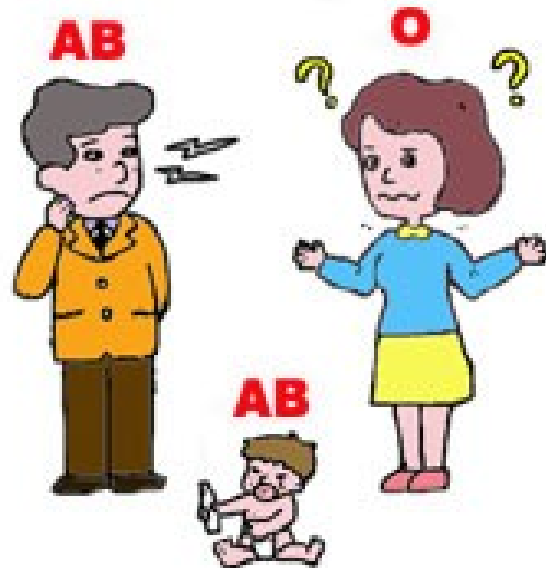
Dědičnost krevních skupin

- Většinou bialelické systémy
- Alela zajišťuje konkrétní fenotypový projev genu
- Alela dominantní/ recesivní/ kodominantní
- Homozygotní jedinec: shodné alely v genu (A/A , B/B, 0/0)
- Heterozygotní jedinec: různé alely v daném lokusu (A/0, B/0, A/B)

AB0 systém - dědičnost

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

Cis-AB

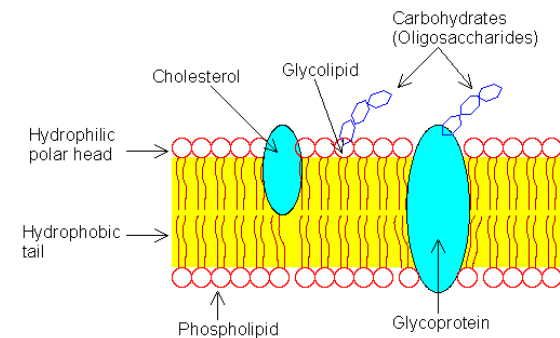


Fenotyp a souvislost s laboratorním vyšetřením

- Větší množství antigenu (efekt dávky) u některých homozygotů proti heterozygotům
- Různá síla aglutinační reakce při serologickém vyšetření (silnější reakce u homozygotních typů)
- U některých krevních skupin: Rh, Duffy, MNSs, Kidd

AB0 systém

- nejvýznamnější skupinový systém
- rozpoznání r.1900/Landsteiner
- AB0 gen na 9. chromozomu → alela A a/nebo B a/nebo žádná z nich u krevní skupiny 0
- Produkt genu: antigeny A a/nbo B (jejich průkaz definuje AB0 skupinu)
- Skupina 0 (chybí geny A,B) → antigen H
- Specifické glykoproteiny nebo glykolipidy
- 4 fenotypy A ,B,AB,0



The agglutination of IgM is stronger due to the relatively large size of the IgM antibody, but the nature of the bodily reaction as a result of agglutination with IgG can be more dramatic.^[7]

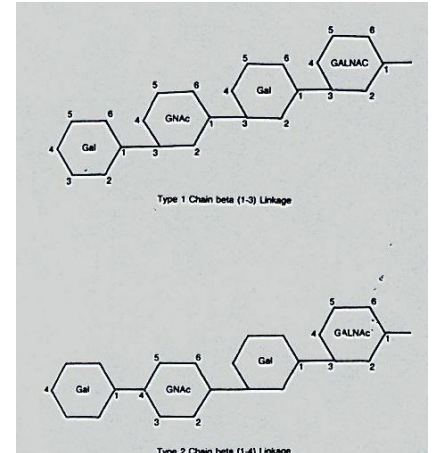
Distribution of ABO and Rh Blood types (averages for each population)

Population	O+	O-	A+	A-	B+	B-	AB+	AB-
Native South Americans ^[8]	100%		-		-		-	
Ireland ^[8]	52%		35%		10%		3%	
Hong Kong ^[9]	40%		26%		27%		7%	
Vietnam ^[8]	45.0%		21.4%		29.1%		4.5%	
Indigenous Australians ^[8]	44.4%		55.6%		-		-	
Germany ^[8]	42.8%		41.9%		11.0%		4.2%	
Bengal ^[8]	22.0%		24.0%		38.2%		15.7%	
Sami people ^[8]	18.2%		54.6%		4.8%		12.4%	
New Zealand ^[10]	38.4%	9.3%	31.8%	6.4%	8.8%	1.6%	3.2%	0.6%
Australia	40%	9%	31%	7%	8%	2%	2%	1%
Finland ^[11]	27%	4%	38%	6%	15%	2%	7%	1%
Sweden	32%	6%	37%	7%	10%	2%	5%	1%
Denmark ^[12]	35%	6%	37%	7%	8%	2%	4%	1%
France	36%	6%	37%	7%	9%	1%	3%	1%
South Korea ^[13]	27.4%	0.1%	34.4%	0.1%	26.8%	0.1%	11.2%	0.05%
United Kingdom ^[14]	37%	7%	35%	7%	8%	2%	3%	1%
United States ^[15]	38%	7%	34%	6%	9%	2%	3%	1%

Other human blood group systems

H antigen = základ pro ostatní AB0 antigeny

- gen – enzym – antigen
- součinnost genů FUT1(H) na erythrocytech a FUT2 (Se) v sekrečních epiteliích
- geny kódují **H-transferázu**, která připojuje fukózu ke galaktóze prekursorové substance a vzniká **H antigen**
- H antigen *je nepřímý produkt genu*, glykanové jednotky antigenu obsahují **fukózu**



H antigen

Tkáňová distribuce

- FUT1 v erytroidních tkáních, endotelu, sensorických nervech
- FUT2 v sekretech exokrinních, v epitelích
- často aberantní exprese v maligních bb.

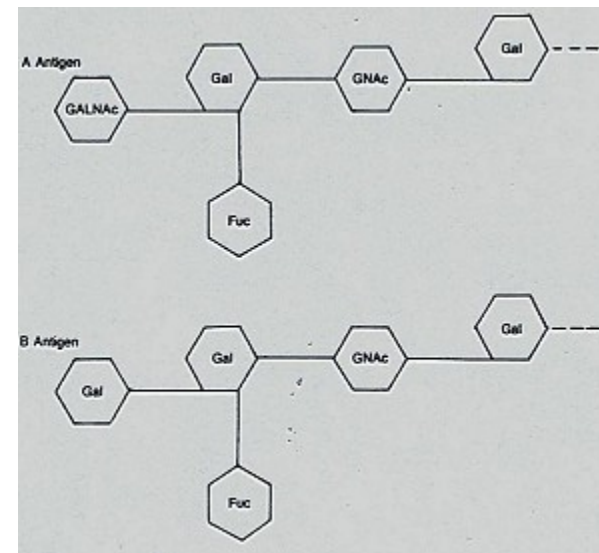
Funkce

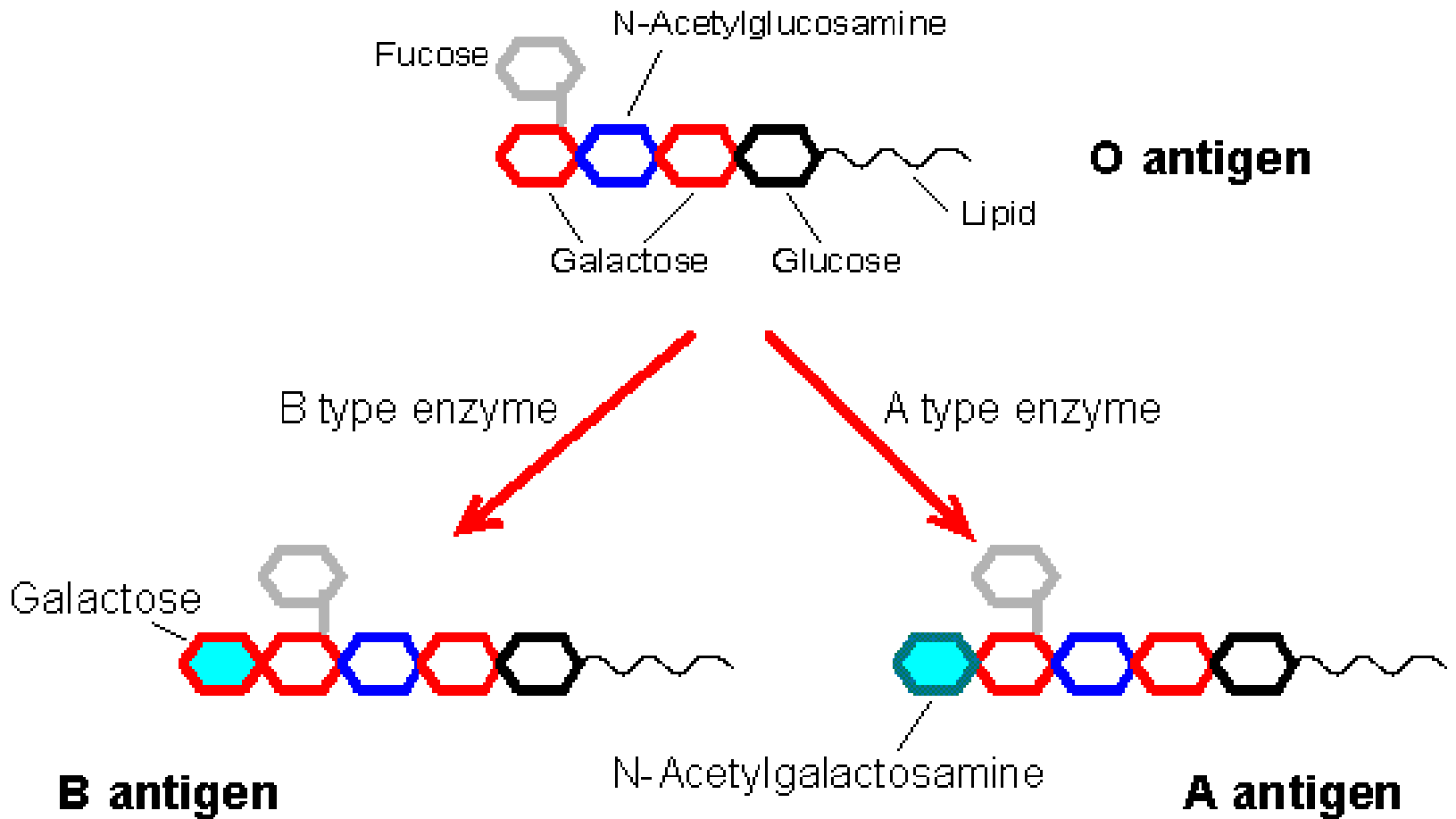
- substrát pro A a B antigeny
- prekurzor Lewis antigenu
- uplatnění v adhezi bb., receptor pro mikroorganismy

Biosyntéza A, B antigenů

Probíhá stejným způsobem, tj. připojením sacharidů specifických pro A nebo B krevní skupinu k H antigenu. Vzniká tím specifický polysacharid A, B nebo AB.

- A alela = **A transferaza** = transfer **GalNAc** na Gal akceptor
- B alela = **B transferaza** = transfer **Gal** na Gal akceptor
- 0 alela = **neaktivní** = neprobíhá substituce oligosacharidů, má H antigen





AB0 sekretorství (vylučovatelství)

- solubilní ABH antigeny/glykoproteiny v tělních tekutinách
- vyžadují gen FUT2(Se)
- Jedinec - nonsekretor se/se nevylučuje ABH antigeny
- 80% osob jsou sekretoři: podle AB0 skupiny mají stejné antigeny v sekretech (A+H, B+H nebo H)
- 20% osob jsou nonsekretoři: v sekretech nemají H ani A nebo B antigeny
- stanovení sekretorství: detekce **ABH substancí** (= rozpustné antigeny) ve slinách nebo geneticky

A skupina: Podskupiny A1 a A2

Kvantitativní rozdíly

- A1 nejfrekventovanější
- A1(A1B) silná exprese A antigenu (více aktivní enzym)
 - Počet Ag míst/ery pro A1: $8-12 \times 10^5$
pro A2: $1-4 \times 10^5$

Kvalitativní rozdíly

- A1 ery obsahují antigen A + A1
 - A2 ery obsahují pouze antigen A
- ⇒ Vznik anti-A1 protilátky u osob A₂ nebo A₂B

Slabé skupiny

- fenotypové změny- zeslabení A a B antigenu
- také změny antigenů v sekretech
- příčina: genové mutace, vzácné alely provázené změnou fenotypu

např. $A_3, A_x, A_m, A_{el}, A_{end}$ / B_3, B_x, B_m, B_{el}

- způsobují problémy při určení skupiny
- provází je nález nepravidelných AB0 protilátek

Získané změny antigenů

Získaný antigen B u osob skupiny A (vzácně naopak):

- slabší reakce získaného antigenu B
- provází onemocnění GIT – deacetylace A sacharidu pomocí bakteriálních enzymů – zůstává sacharid podobný B antigenu – cross reakce s dg. sérem anti-B

Zeslabení antigenů (obvykle A antigen)

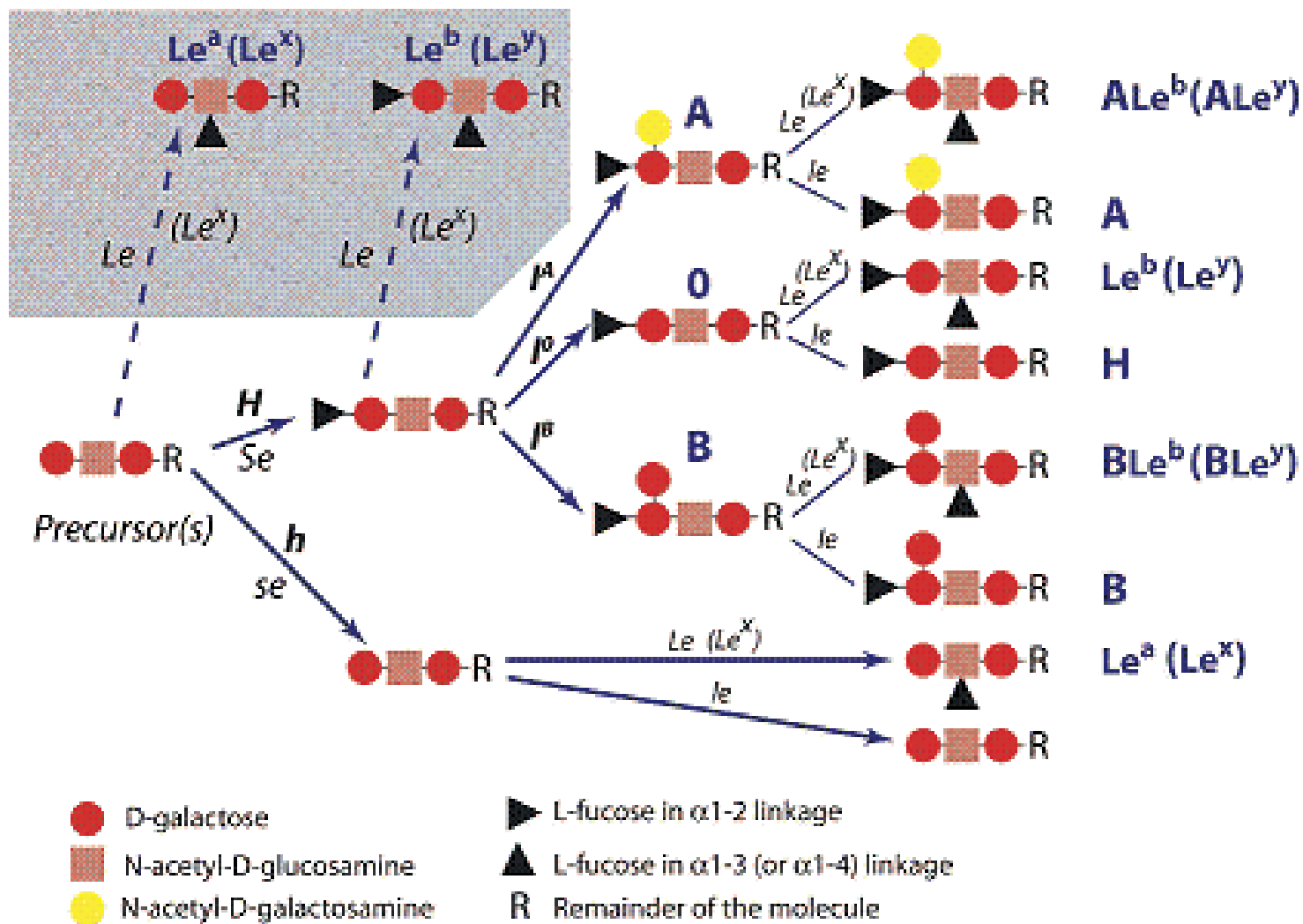
- leukemie (inaktivace A,B transferaz nebo inaktivace H transferazy se sekund. zeslabením A,B), malignity (neutralizace dg.séra solubilními A,B substancemi)

Chimérické antigeny

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

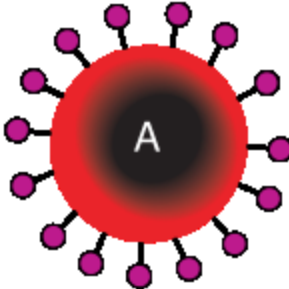
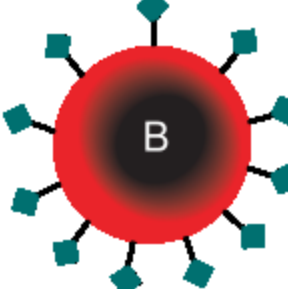
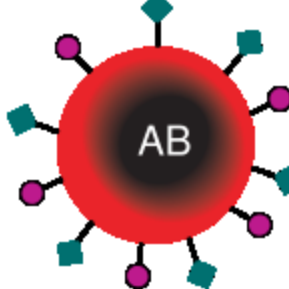
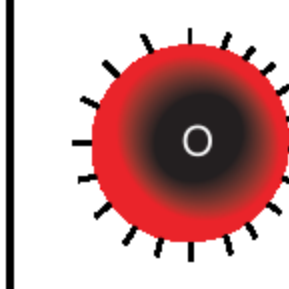
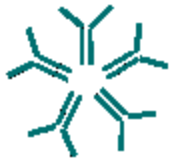

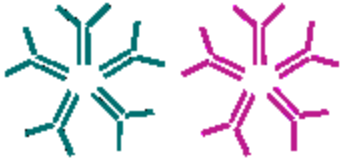



H - deficitní fenotypy

- homozygotní forma inaktivního FUT1 genu pro syntézu H antigenu (h/h)
- nevzniká H transferáza a H antigen, chybí prekurzor pro A a B antigeny
- fenotypově skupina 0, které chybí také antigen H a má proto navíc přirozenou protilátku anti-H
- dva typy tohoto hh fenotypu:
 - nonsekretoři/**typ Bombay** (nemají antigeny H,A,B Ag na erys ani v sekretech + pravidelně mají v séru kromě anti-A a anti-B tepelnou a klinicky významnou anti-H)
 - sekretoři/**typ paraBombay** (mají H a A,B Ag v sekretech, ale ne na erys + mohou mít v séru nevýznamnou protilátku anti-HI)



AB0 protilátky

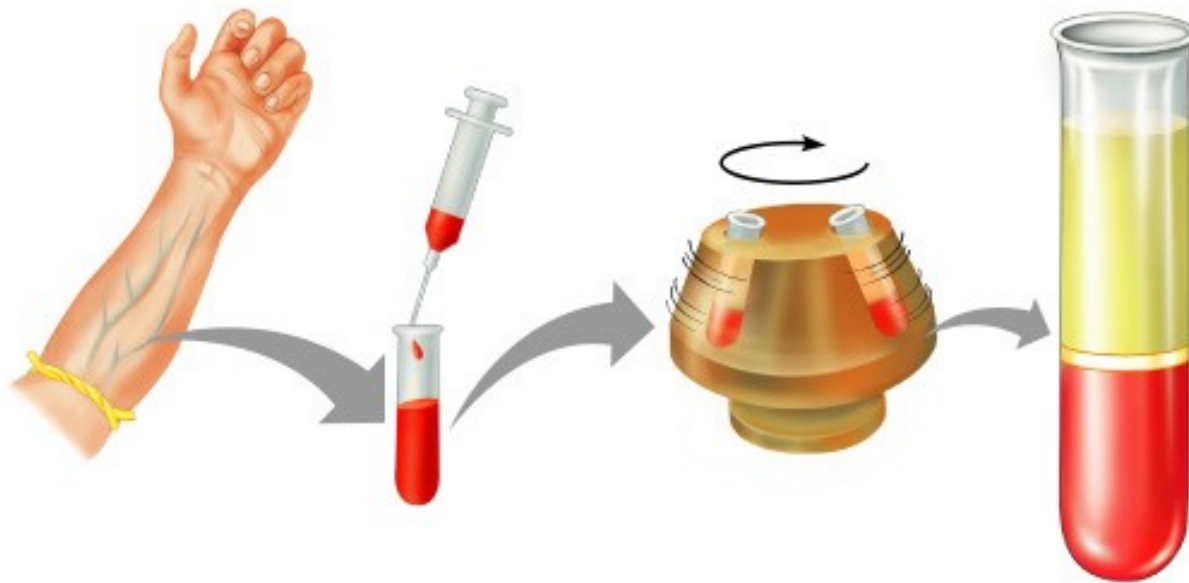
- odlišují AB0 systém od všech ostatních skupin – jsou to **pravidelné protilátky a odpovídají** AB0 antigenům
- „přirozené“ protilátky v důsledku „imunizace“ mikrobiálními substancemi podobnými A,B antigenům
- AB0 protilátky IgM, ale i IgG nebo IgA
- dvě protilátky: anti-A a anti-B/ u osob 0 také anti-A,B
- od 3.měsíce věku dostatečný titr, stacionární během života, změny při imunizujících stavech v těhotenství,
- vzácně jiný nález: novorozenci, slabé skupiny, nemoci
- transfuzích

	Group A	Group B	Group AB	Group O
Red blood cell type	 <p>A</p>	 <p>B</p>	 <p>AB</p>	 <p>O</p>
Antibodies present	 <p>Anti-B</p>	 <p>Anti-A</p>	<p>None</p>	 <p>Anti-A and Anti-B</p>
Antigens present	 <p>A antigen</p>	 <p>B antigen</p>	 <p>A and B antigens</p>	<p>No antigens</p>

Slabé A podskupiny - serologie

Skupina	Anti-A sérum	Anti-AB sérum	Anti-A protilátka	Anti-A1 protilátka	Antigeny sliny sekret.
A ₃	mf	mf	ne	někdy	A H
A _{end}	mf	mf	ne	někdy	H
A _x	-/w	+	-/+	často	H (A _x)
A _m	-/w	-/+	ne	ne	A H
A _y	-	-	ne	ne	A H
A _{el}	-	-	někdy	ano	H

Laboratorní vyšetření AB0 skupiny



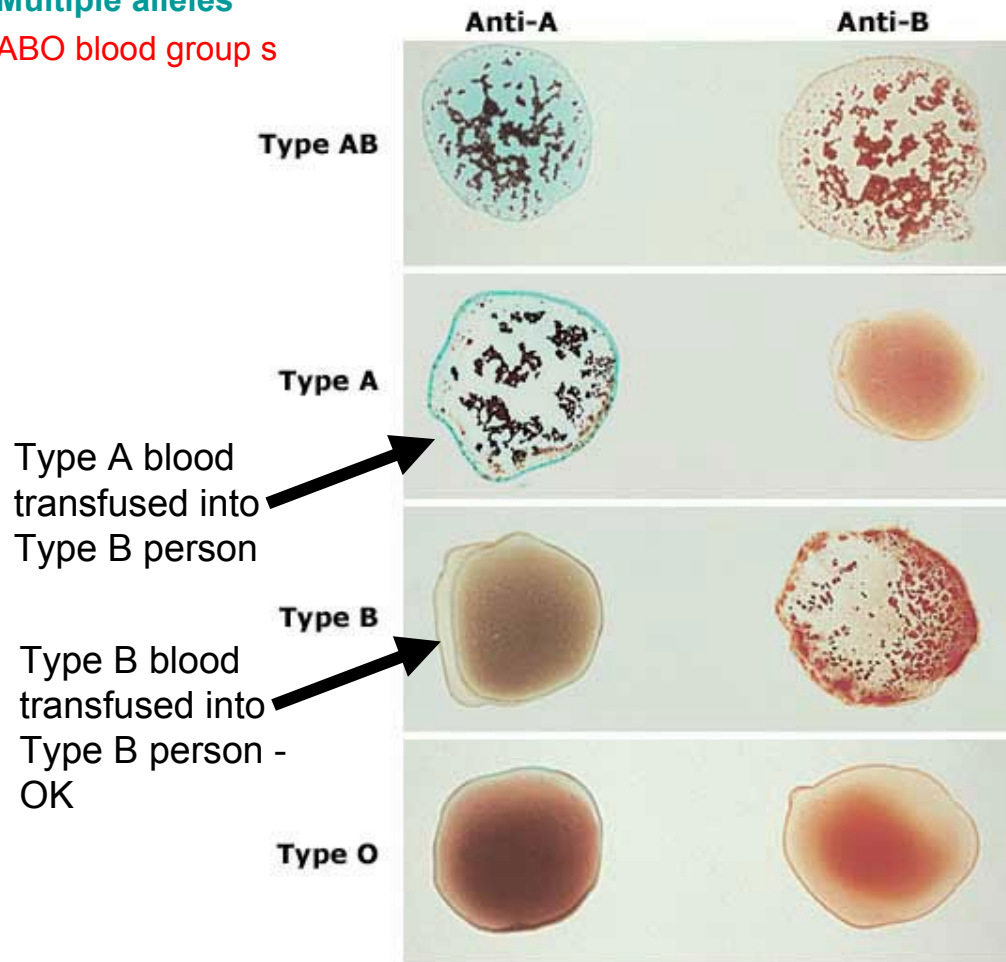
Průkaz A,B antigenu na erytrocytech

Průkaz anti-A, anti-B v plazmě/séru

1. Laboratorní vyšetření AB0 skupiny: AB(0) antigeny na erytrocytech

- dg.sérum anti-A, anti-B
- monoklonální séra pro přímý solný test /pokojevá T nebo polyklonální séra -A,-B,-A,B
- metoda zkumavková, sloupcová aglutinace, pevná fáze, na skle, mikrotitrační desce
- rostlinné lektiny (monoklonální séra) pro odlišení A1 podskupiny
- rutinně prováděná kontroly kvality reagensů (kontrola dg. sér a dg. erytrocytů) = při nesouhlasu v kontrole nelze uzavřít výsledek krevní skupiny

Multiple alleles
ABO blood groups



Type A blood transfused into Type B person

Type B blood transfused into Type B person - OK

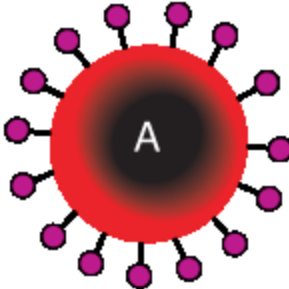
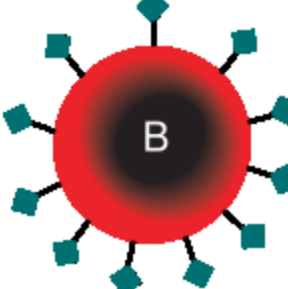
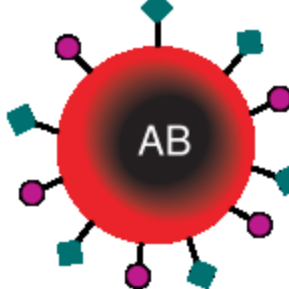
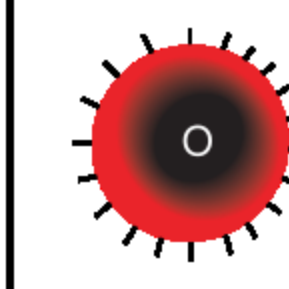
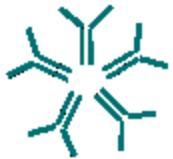

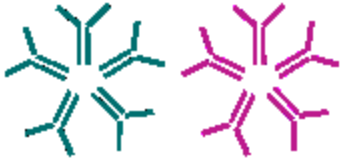



A medical problem - some blood transfusions produce lethal clumping of cells.

Don't worry about details yet...

2. Laboratorní vyšetření AB0 skupiny: pravidelné AB0 protilátky

- detekce pomocí dg.erytrocytů A₁,B (ery 0 nebo autoctl.)
- testy pro přímou aglutinaci / pokojová teplota s inkubací (doplňující testy pro 4°C event. 37°C)
- zřetelné makroskopické reakce
- 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

	Group A	Group B	Group AB	Group O
Red blood cell type	 <p>A</p>	 <p>B</p>	 <p>AB</p>	 <p>O</p>
Antibodies present	 <p>Anti-B</p>	 <p>Anti-A</p>	None	 <p>Anti-A and Anti-B</p>
Antigens present	 <p>A antigen</p>	 <p>B antigen</p>	 <p>A and B antigens</p>	No antigens

3. Nepravidelné AB0 protilátky

- anti-A1 u osob A2, anti-H u osob A1
- chladový typ /RT/4°C, vzácně anti-A1 při 37°C
- nebývá klinický význam, vedlejší nález při vyšetření KS

	anti-A1	anti-H
Ery 0	0	+
Ery A1	+	0
Ery A2	0	+
Ery B	+++	+++



A	B	AB	D	D	ctl
human/humain					
Code 097/b 000208 0403					
4	-	4	1	2	-

- Princip serologického vyšetření všech 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. U AB0 skupiny se prokazují také pravidelné AB0 protilátky.
- Genetické vyšetření umožní precizní diagnostikování skupinových antigenů, je zvláště přínosné u abnormálních forem antigenů, u transplantovaných a transfundovaných jedinců.

AB0 diskrepance

- Při vyšetření antigenů nebo protilátek
- Diskrepance je nutné vyřešit před uzavřením výsledku
- **Pokud nelze – podávat 0 erytrocyty, AB plazmu**
- Opakovat vyšetření, provést vyšetření z nového vzorku, použít jiné reagensie spolu s kontrolami, jiné reakční teploty, promytí erys apod. dle typu problému
- Validace testů – přední x zadní řada, kontroly dg.sér

Příčiny: Technické chyby. Abnormální sérové proteiny.

Abnormální antigeny. Polyaglutinabilita. Získané, zeslabené antigeny. Nadbytek substancí. Chimérismus.

Protilátky/autoprottilátky. Imunodeficity. Jiné příčiny.

Aberantní reakce při vyšetření AB0 skupiny

Pozitivní výsledek

Přední řada

Zadní řada

Získaný antigen B (A) Nemoci GIT (ca, obstrukce, infekty) Karcinom pankreatu	Abs přítomné v reagentech proti Ag pacienta
Rouleau Vyšší globulinemie Vyšší fibrinogen Wartonův rosol Přítomnost makromolekul	Genetická chiméra cis-AB
Polyaglutinabilita Mikrobiální T aktivace erys Nonmikrobiální Tn aj.	AB0 protilátky v séru pacienta Anti-A1 Anti-H
Autoaglutinace Silné chladové autoprotilátky	Rouleau Vyšší globulinemie Vyšší fibrinogen Wartonův rosol Přítomnost makromolekul
Senzibilizované erythrocyty Tepelné autoprotilátky Potransfuzní reakce	Aloprotilátky v séru pacienta proti Ag dg.erythrocytů
Netypické protilátky proti složkám reagentů	Chladové auto nebo aloprotilátky

Negativní výsledek

Přední řada

Zadní řada

Slabé A,B skupiny	Zeslabení nebo deficit protilátek Hypogamaglobulinemie Novorozenci, stáří Imunodeficitní stavy Imunosuprese Agamaglobulinémie
Nadbytek skupinově specif. Solubilních substancí Ca GIT Ca pankreatu Mukozní cysty ovaria	Genetická chiméra cis-AB
Zeslabení při nemoci Akutní leukemie	

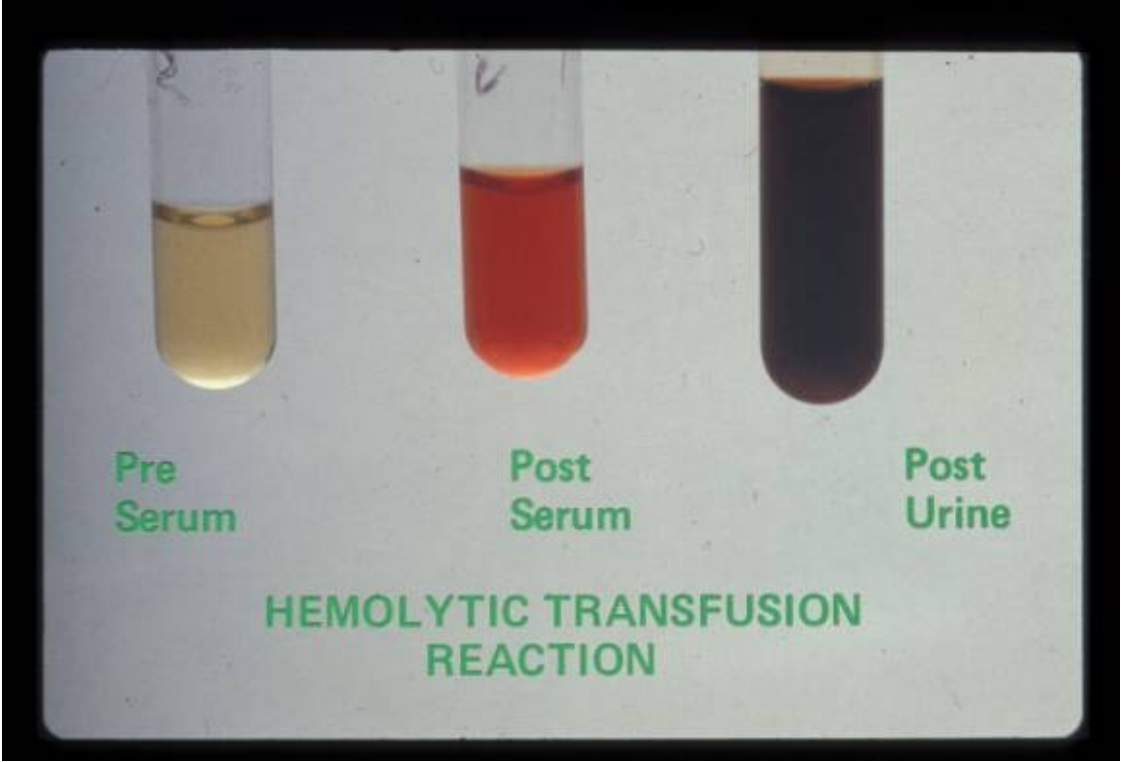
Klinické souvislosti

Asociace s nemocemi vzácně

- H antigen: pouze v souvislosti s hyperakutní rejekcí transplantovaného orgánu u osob typu Bombay a paraBombay, u kongenitální poruchy glykosylace (není dodána fukoza do Golgiho aparátu)

Asociace s transfuzí často

- AB0 inkompatibilní krev vede k HTR a jejím komplikacím
- velká (nové antigeny dárcovské dárce A/příjemce 0) nebo malá inkompatibilita (nové protilátky dárcovské příjemce A/dárce 0)
- **velká inkompatibilita je pro transfuzi nepřijatelná**



Pre
Serum

Post
Serum

Post
Urine

HEMOLYTIC TRANSFUSION
REACTION

Asociace s transplantacemi

- periferních hematopoetických kmenových bb.(PBSCT) nebo kostní dřeně (BMT)
- solidních orgánů (ledviny, srdce, játra vs. rohovka, kost)
- časně a pozdní hemolytické komplikace a rejekce graftu při velké a malé nebo oboustranné inkompatibilitě

Asociace s HON

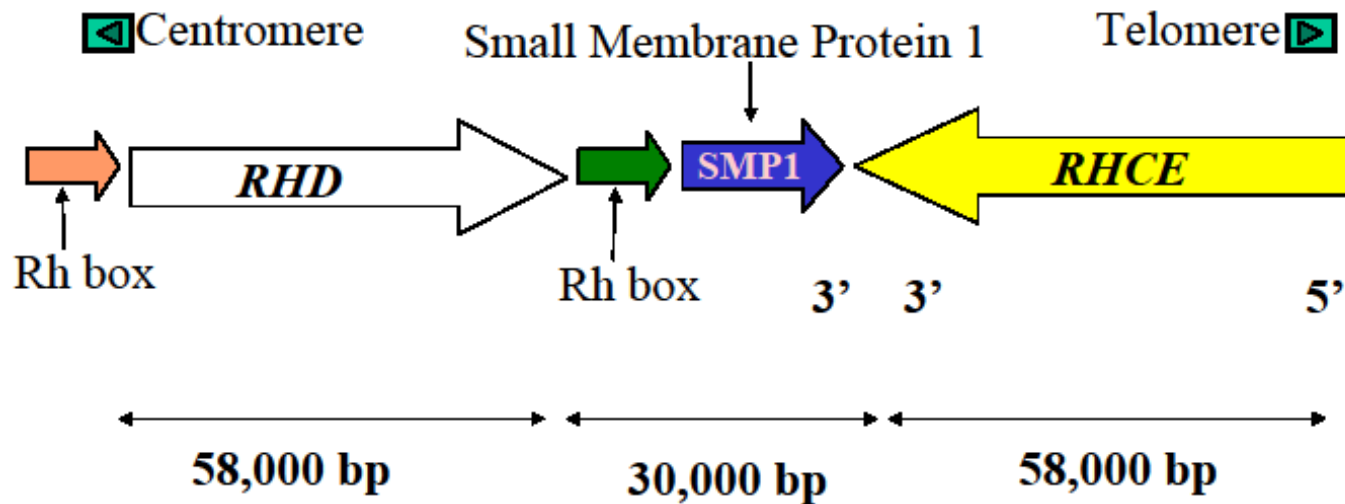
- Při AB0 typu neshody matky vs. plod (typicky matka 0)
- IgG protilátky v etiologii HON

Uplatnění ve forensní medicíně

Rh systém

- dva vzájemně spojené homologní geny RHCE a RHD na 1.chromozomu
- RHD gen kóduje RhD protein (antigen D. Nepřítomnost genu = chybí antigen 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
- opozitní orientace RhD a RHCE - Rh boxy – gen SMP1

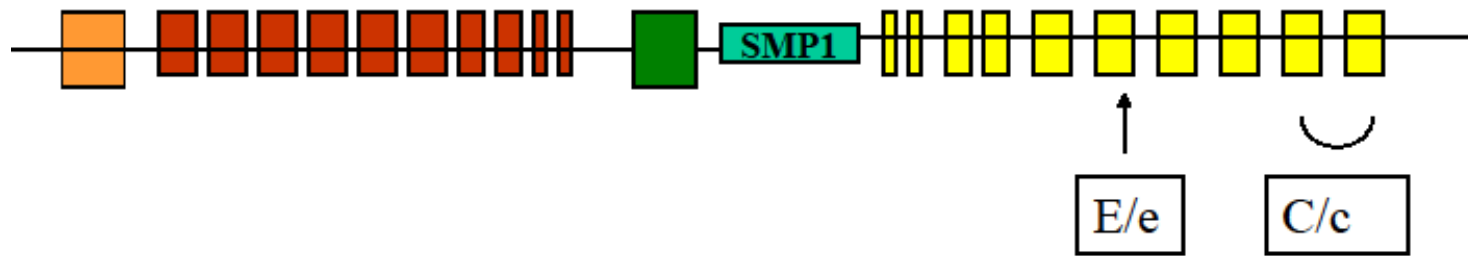
D and *CE*



Chromosome 1p34.1-1p36 (short arm). Opposing orientation.

Wagner and Flegel. ISBT Vienna 2000

Organisation of genes encoding RhD and CcEe



10 exons encoding the D protein plus 2 Rh boxes

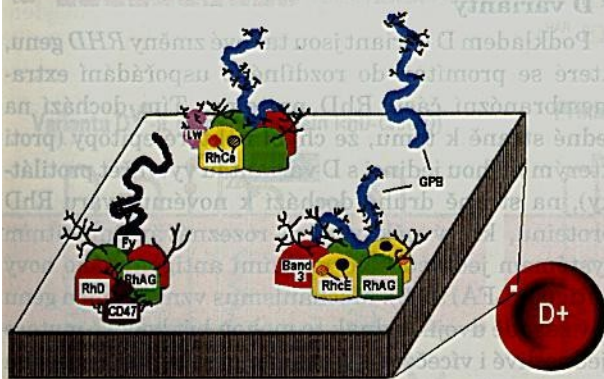
10 exons encoding the CcEe protein

RhCcEe zároveň mohou být způsobeny zesílené exprese D antigenu (u fenotypu D⁺/D⁺ je tak vysoký počet D antigenů, že dochází k aglutinaci těchto krvinek i účinkem inkompletních (IgG) anti-D protilátek.

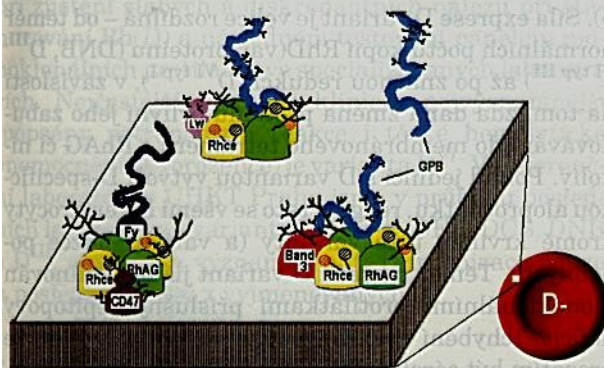
• **Rh_{null} a Rh_{mod} fenotypy**

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, přenášeli 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-

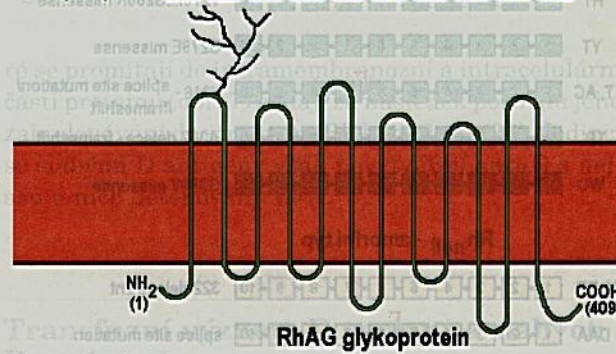
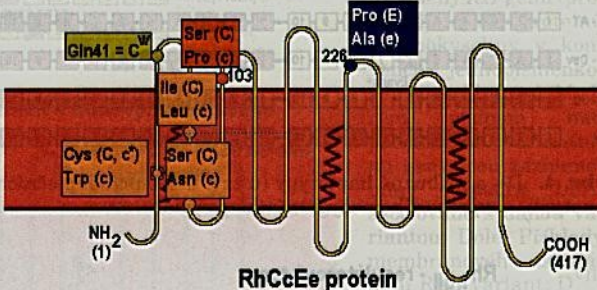
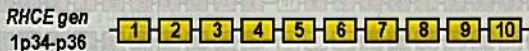
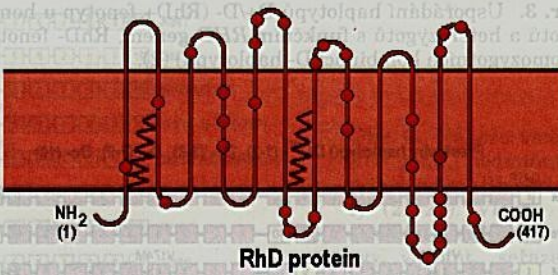
RhCcEe tetramery dvou Rn proteinů se dvěma RhAG glykoproteiny. Následně je omezena i exprese ostatních struktur Rh komplexu.



RhD⁺ (D⁺ C⁺ c⁺ E⁺ e⁺) RHD-RHCE/RHD-RHCE



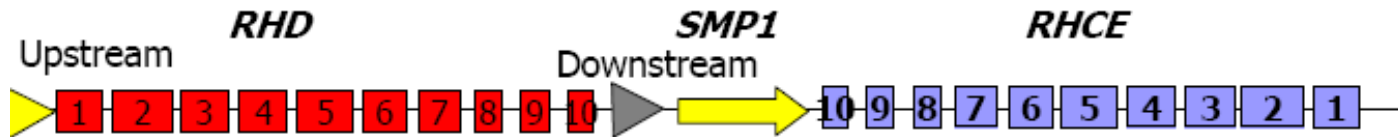
D-



Obr. 2. Schéma uspořádání RHD, RHCE a RHAG genů a předpokládaná dvourozměrná struktura proteinů RhD, RhCcEe, RhAG a RhAG glykoproteinů.

- D antigen je exprimován na membráně erytrocytu (RhD+)
- D antigen chybí na membráně erytrocytu (RhD-)
 - delece celého genu (naše populace)
 - mutace genu
 - hybridní gen
 - inaktivní RHD pseudogen
- D antigen je fenotypově odlišný - slabší (různé genetické změny-mutace, hybridní alely, rekombinace genu- vedou ke vzniku vzácných alel, navenek se projeví změnou RhD)

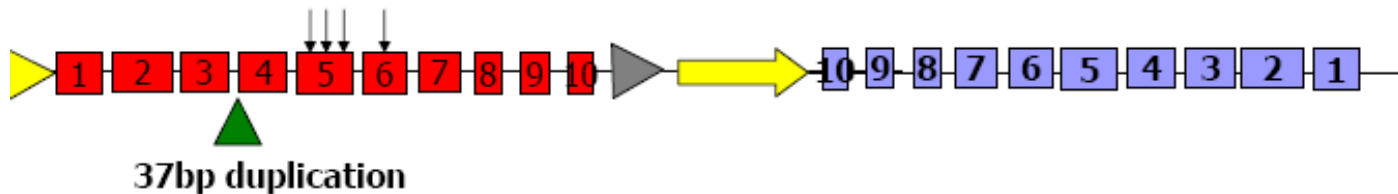
1. Rh D Pos genome



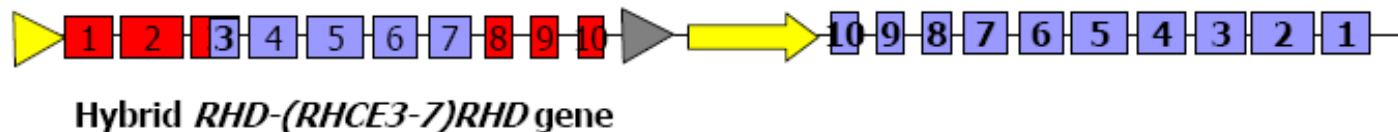
2. Rh D Neg genome (Caucasian)



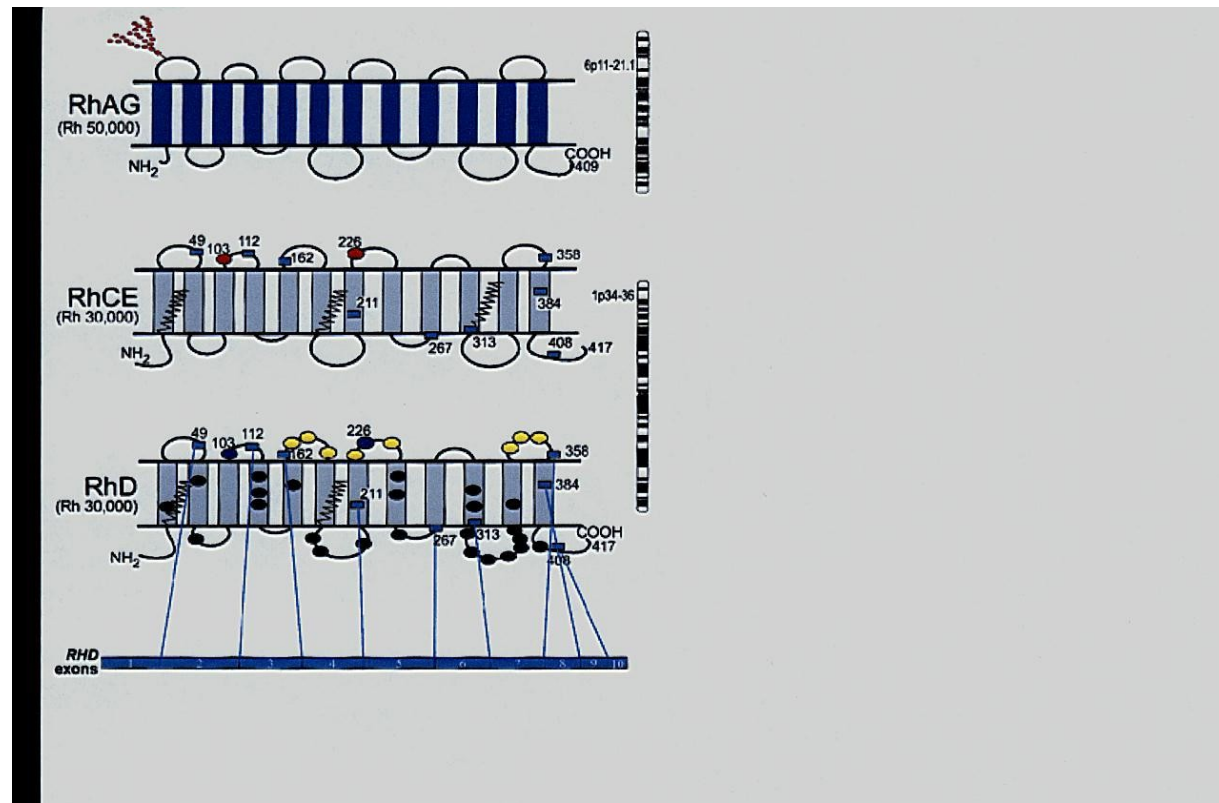
3. Rh D Neg genome (African) *RHD_ψ*



4. Rh D Neg genome (African) *r^S*



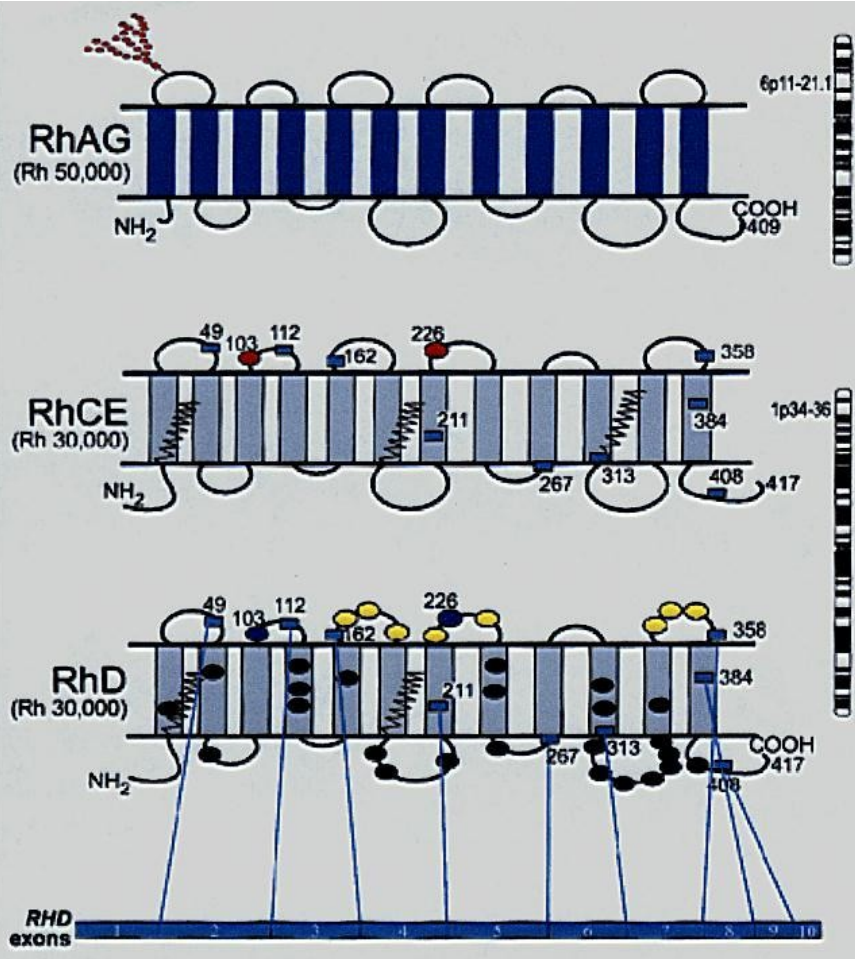
- Rh proteiny (antigeny) procházejí 12x membránou, každý vytváří 6 extracelulárních loopů, na kterých jsou umístěné Rh antigeny
- substituce několika aminokyselin Rh proteinu vzájemně odlišuje RhD a RhCcEe antigeny



Rh antigeny

- antigeny D,C,c,E,e (Cw)
- výskyt dle typu populace (D+ cca u 85% Evropanů, 90% Afričanů, u 100% Asiatů)
- jsou podobné, rozdíl mezi RhD a RhCE proteinem 30-35 AMK
- vysoce imunogenní proteiny
- záleží na tvaru molekuly a na interakci mezi jednotlivými extracelulárními loopy
- několik desítek tisíc kopií/ery, závisí na genotypu
- epitop = charakteristické uspořádání AMK řetězce

Ostatní Rh antigeny: high nebo low frequency antigens



Rh antigeny

- serologické rozeznání pomocí dg.sér anti-D,-C,-c,-E,-e
- zygocii D/D a D/d nelze serologicky odlišit (chybí anti-d)
- kombinace 3 párů alel Cc/Dd/Ee umožňuje vznik 8 haplotypů a 36 genotypů

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''

Funkce Rh antigenů:

- udržení integrity membrány erys (protein bandu 3)
- transport amoniaku
- kanál pro transport O_2/CO_2

Tkáňová distribuce:

- erytroidní tkáně, ledviny, játra, kůže, mozek, testes

Asociace s nemocemi:

- hemolýzy - HON, HTR
- nemoc štěpu proti hostiteli - GVHD
- hemolytická anemie u Rh deficient.syndromu (Rh_{null})

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

Most Common RH Phenotypes

Rh positive

DCe

DCce

Dce

DcEe

DcE

DCcEe

Rh negativ

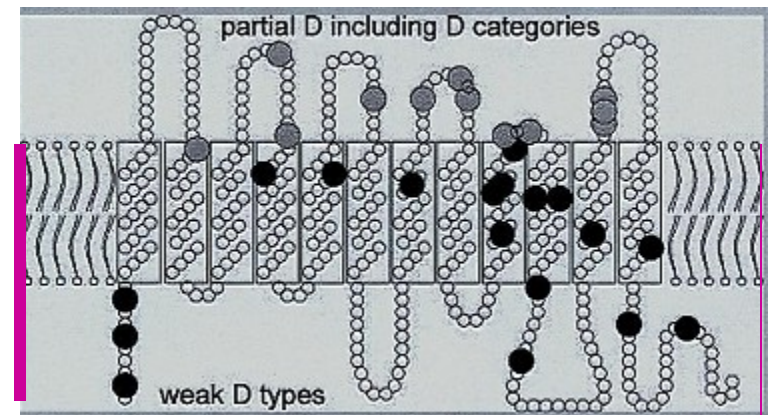
ce

Abnormální typy Rh antigenů

- u cca 1% všech RhD pozitivních osob
- D-- : chybí antigeny RhCcEe a zesiluje exprese RhD
- Rh_{null}: chybí úplně všechny Rh antigeny
- Rh_{mod}: změna exprese, zeslabení Rh antigenů
- **Variantní D antigeny:**
 - **Weak D**: kvantitativní změna antigenu
 - **Parciální D**: kvalitativní změna v mozaice antigenu

Weak D: slabý antigen, D^w

- původní terminologie „D^u“
- téměř žádná změna AMK v extramembranozní části RhD proteinu, mutace postihují intramembranozní a intracelulární část proteinu
- porucha zakomponování Rh proteinu do tetrameru Rh komplexu
- nedochází k anti-D imunizaci



Příčina D^w: Dědičnost

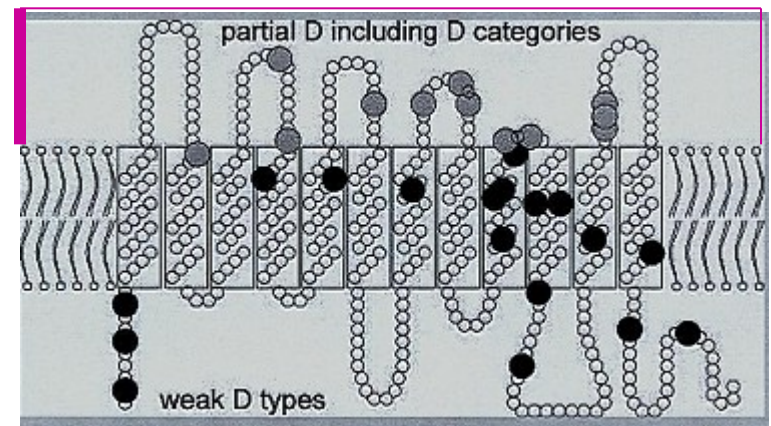
- zděděná zeslabená exprese D^w antigenu při
 - kompletním D antigenu, ale jeho menším počtu na erys
- pouze slabé aglutinace nebo chybějící aglutinace v přímém aglutinačním testu
- silné aglutinace v NAT s AGH
- netvoří se anti-D, je možné bezpečně transfundovat D pozitivní krev

Příčina D^w : Efekt pozice

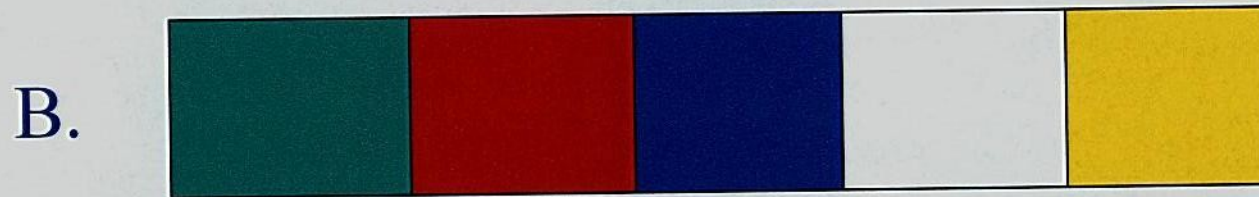
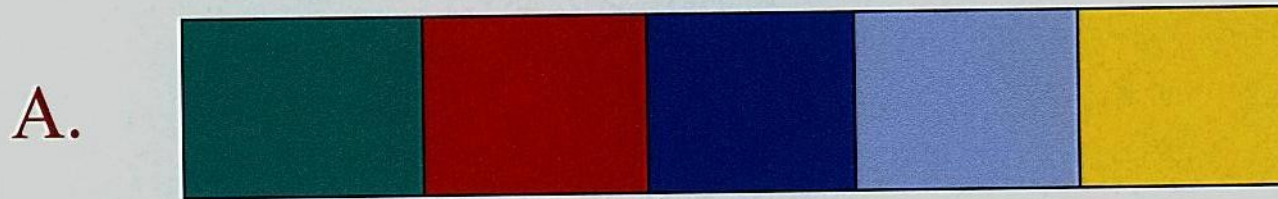
- interakce alely D a C u genotypu cDe/Cde
- C alela je v trans pozici k alele D
- netvoří se anti-D, je možné bezpečně transfundovat D pozitivní krev

Parciální D: varianty D, D^{var}

- Chybí jedna nebo více obvyklých částí (epitopů) D antigenu
- Mutace , rekombinace RHD genu
- Změna se projeví v extramembranozní části RhD proteinu
 - některé epitopy zcela chybí
 - antigen je složený z jiných epitopů = **nový tvar proteinu**
- Problém: vznik alo-anti-D, která reaguje se všemi RhD+ kromě vlastních ery
- Problém: diagnostický + tvoří se alo-anti-D po transfuzi D+



Partial D: Multiple epitopes make up D antigen. Each color represents a different epitope of the D antigen.



Patient B lacks one D epitope.

The difference between **Patient A** and **Patient B** is a single epitope of the D antigen. The problem is that **Patient B** can make an antibody to **Patient A** even though both appear to have the entire D antigen present on their red blood cell's using routine anti-D typing reagents..

Vyšetření RhD : Reagencie

- rutinní vyšetření D antigenu v rámci krevní skupiny
- dříve polyklonální protilátky, dnes monoklonální protilátky (dg.séra)
- výhody: silné reakce v přímém aglutinačním testu, nízký obsah proteinů - vhodné pro senzibilizované erys
- duplicitně provedené vyšetření dvěma odlišnými dg. séry (chybí přirozené protilátky)
- porovnávání shody výsledků u obou vyšetření
- validace testu - použití kontrolního séra (Ctl) + kontrola pozitivní (D+erys) a negativní (D- erys)

Cíl vyšetření D antigenu:

Dárce krve/event. novorozenec:

- zachytit **všechny** typy D antigenu
- 2 různá séra pro aglutinační test (různé anti-Dep klony)
- **došetření slabých** antigenů v NAT

Příjemce/těhotná:

- ideálně: parciální D=RhD neg, weak D= RhD poz
- **nedetekovat DVI** variantu
- **nedošetřovat slabé** antigeny v NAT

Serologicky běžně nelze rozlišit Dw/v, molekulárně genetické metody (PCR).

Falešně pozitivní výsledky:

- spontánní aglutinace vyšetřovaných erys se všemi dg. séry (oldiší Rh kontrola)
- aglutinace erys při obsahu chladových protilátek nebo paraproteinu ve vyšetřovaném vzorku (Rh kontrola, opakování vyšetření Rh po promytí erys)
- kontaminace diagnostika - bakterie, T, Tn aktivace erys
- laboratorní chyby

Falešně negativní výsledky:

- selhání diagnostika (použití kontroly + a -)
- laboratorní chyby

C,c,E,e antigeny

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

Rh protilátky

- klinicky významné, imunní = vedou k destrukci erys
- IgG / lab. teplota 37°C/ nepřímá aglutinace
- neaktivují komplement, vedou k extravaskulární hemolýze
- Procházejí placentou
- HON, HTR
- anti-D, -E, -c, -C, -e, -Cw
- Rh autoprotiátky u AIHA
- zvýšená reaktivita v enzymovém testu, efekt dávky
- profylaktické použití anti-D u HON, klinické léčebné použití anti-D u ITP

Ostatní krevní skupiny

- Ii
- Lewis
- Kell
- Kidd
- Duffy
- Lutheran
- MNSs
- P
- Ostatní s méně častými Abs (Dombrock, Diego, Colton, Chido/Rodgers, Gerbich, Cromer)
- HFA
- LFA

Ii systém

- sacharidové struktury lineárně spojené
- antigen i je prekurzorem antigenu I
- fenotyp I dominuje u dospělých, i fenotyp u novorozenců
- od narození do 2 let věku se množství I antigenu zvyšuje
- antigeny jsou přítomné v sekretech, plazmě
- změny antigenu u akutních i chronických leukemií

Funkce

- zajišťují připojení sacharidů k proteinům a lipidům buněčné membrány
- receptory a ligandy v adhesivních procesech

Tkáňová distribuce

- všechny krevní buňky, sekrety, epitel, jiné tkáně (oční čočka)

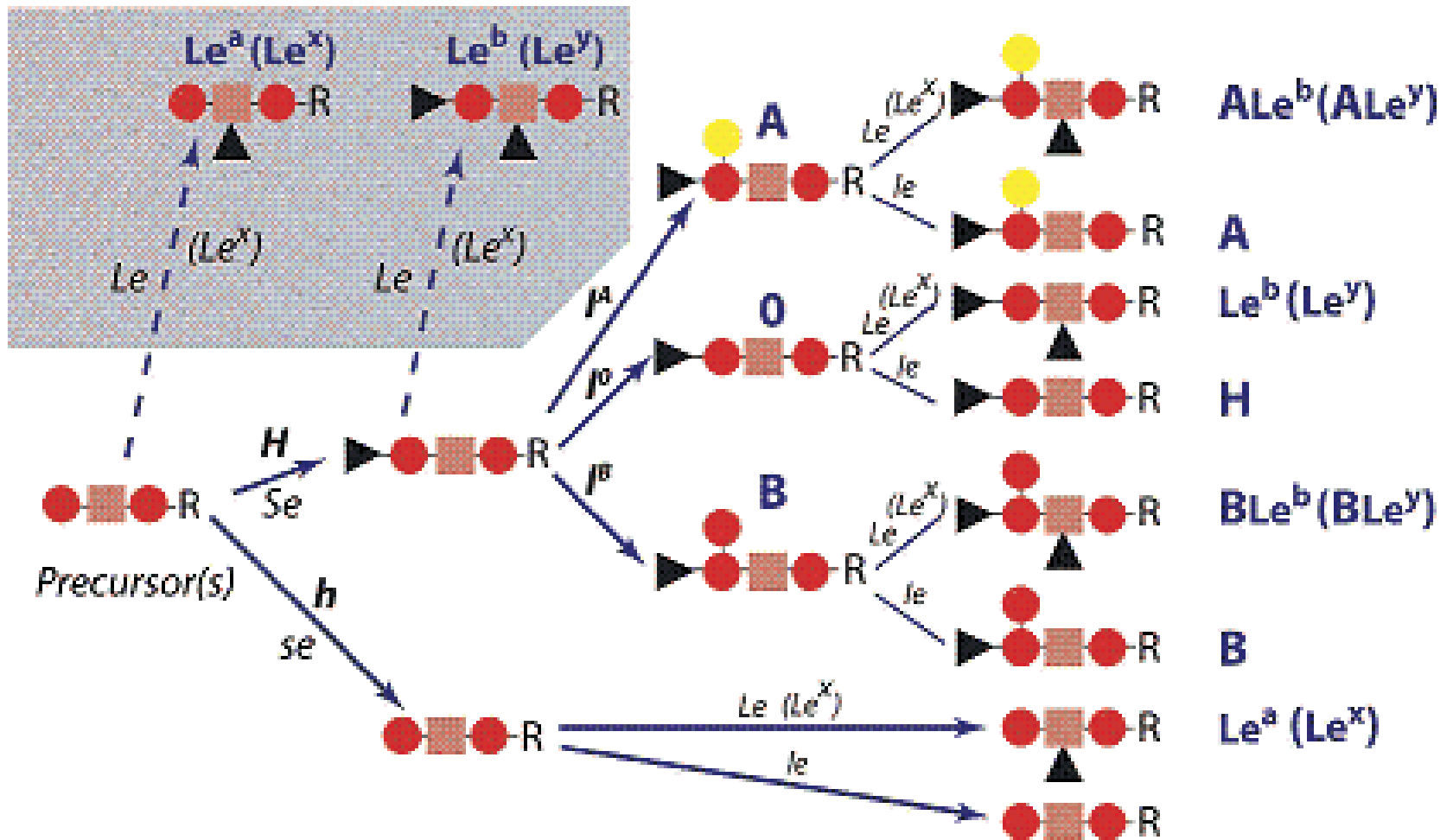
Asociace s nemocemi

- anti-I u CAD (průkaz pomocí erys I-)
- zvýšená exprese i antigenu u thalasémie

Lewis /Le

FUT3 (Lewis) FUT2 (Se)

- souvisí s AB0 a H/h systémem
- gen na 19. chromozomu
- addice specifických monosacharidů k prekurzorovému řetězci
- účast na syntéze antigenů Le^a a v přítomnosti genu Se také antigenu Le^b
- syntéza neprobíhá v erytroidní tkáni, na erys se navazují z plazmy, jsou obsaženy v sekretech
- antigeny Le^a , Le^b , Le^X (Le^c), Le^Y (Le^d)



- D-galactose
- N-acetyl-D-glucosamine
- N-acetyl-D-galactosamine

- ▶ L-fucose in α 1-2 linkage
- ▲ L-fucose in α 1-3 (or α 1-4) linkage
- R** Remainder of the molecule

- Fenotypy

Le(a+b-)

Le(a-b+)

Le(a-b-)

Le(a+b+) ↓exprese H, nekompletní fukosylace: unikátní

- Funkce:

nejasné, nejsou patologické souvislosti, ligandy pro E-selektiny, adhesivní funkce

Lewis protilátky

- přirozené protilátky, bez imunizačního podnětu
- anti-Le^a, anti-Le^b
- Časté protilátky
- IgM – lab. průkaz v chladových testech
- ne aktivní při 37°C (někdy -Creaktivní, hemolýza)
- vzácně imunní: HON i HTR
- asociace s orgánovými transplantacemi

Kell.

Kel. Cellano

- Glykoproteinové antigeny, silné imunogeny
- Kell protein je připojený k membránovému proteinu XK
- Kell proteiny tvoří cca 25 antigenů
- Antitetické alely K2/K1, K4/K3, K7/K6, K11/K17
- Různá frekvence výskytu v populaci

Funkce:

- Kell : aktivace bioaktivních peptidů /proteolýza
- XK: membránový transportní protein

Asociace s nemocemi:

- absence XK (McLeod) u akantocytozy a svalové dystrofie s neurologickými defekty

Kell protilátky

Protilátky:

- známé od r.1949 při anemii novorozence
- imunní protilátky, IgG typ
- klinicky významné
- v etiologii HON (hlavně anemie, ne hemolýza), navíc suprese erythropoezy), HTR
- častá anti-K1, vzácně anti-K2, raritně anti-K_u

Kidd /Jk

- membránový glykoprotein
- produkt jednoho genu JK na 18 chromozomu
- alely JKA, JKB , ostatní jsou vzácné
- Jk(a+b-), Jk(a-b+), Jk(a+b+)

Funkce:

- transport urey
- udržení osmotické stability a deformovatelnosti ery

Tkáňová distribuce:

- erys, leukocyty, ledviny

Kidd protilátky

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

Duffy /Fy

- membránový glykoprotein
- Fy(a+b+), Fy(a-b+), Fy(a+b-)

Funkce

- chemokinový receptor, receptor pro Plasmodium knowlesi
- protektivní fenotyp Fy(a-b-)
- úloha v zánětu a při malarické infekci

Tkáňová distribuce

- erytroidní i nonerytroidní bb., epitel ledvin, endotel, plicní alveoly aj.

Asociace s nemocemi nejsou známe

Duffy protilátky

Protilátky:

- méně časté
- imunní protilátky IgG
- HON vzácně, někdy HTR
- falešně negativní testy používající enzymy (destrukce Ag)

Lutheran /Lu

- membránový GP
- přes 20 alel , většina vysokofrekventních
- po narození slabé Ag, postupně zesilují (nebývá HON)
- enzymy nepůsobí destrukci Ag

Funkce: buněčná adheze, erytropoeza

Tkáňová distribuce: epitel, endotel, erys (ne na lymfo, granulo, mono, trc)

Asociace s nemocemi: nejasná, bývá vyšší exprese Ag u malignit

Lutheran protilátky

- málo časté
- většinou IgM, v chladových testech
- někdy IgG v testech při 37°C
- mohou vázat komplement
- často v kombinaci s HLA protilátkami
- efekt dávky u homozygotní exprese
- raritní anti-Lu³ u null fenotypu

MNS. Glykoforiny A,B,E

- GPA gen = MN skupina
- GPB gen = Ss skupina
- GPE u vzácných variantních alel
- membránové Ag, tvoří negativní povrchový náboj erys

Funkce:

- nejasná, absence nevede k fyziologickým abnormalitám
- receptor pro komplement ,cytokiny, bct, viry

Tkáňová exprese:

- pouze erys

Asociace s nemocemi: neznámá

MNS protilátky

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

P systém

- Globosidové antigeny P, P^k a paraglobosid P₁
- raritní fenotyp p

Funkce:

- v diferenciaci B lymfocytů
- adheze bb., P antigen je buněčný receptor pro bakterie - na erys pro parvovirus B19

Tkáňová exprese:

- erys a jiné krevní bb., endotel, svalové bb., GIT , tumory, bakterie

P systém protilátky

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

T/T_n

- antigenem je neúplně dostavěný polysacharid
 - za normálních okolností se tyto antigeny nevyskytují, za patologických situací umožňují polyaglutinabilitu různých krevních buněk (ery, trc, leu)
1. přechodná exprese T antigenu na ery u malignit, virových onemocnění (neuraminidázy uvolněné z mikrobů odstraňují kyselinu sialovou membrány)
 2. trvalé odhalení T antigenu u idiopatického T_n syndromu, malignit (MDS, leukemie), autoimunních chorob
- pravidelná anti-T_n protilátka v sérech zdravých lidí
 - odlišení typu T aktivace dle reaktivity s různými lektiny

Chido/Rodgers

- Ag tvoří C4A (acid) a C4B (basic) 4.složky komplementu
- při aktivaci komplementu a jeho štěpení zůstane fragment C4d (tj.Ch/Rg) připojený na membránu ery
- přítomné v plazmě, odtud se navazují na erys

Funkce proteinů

- patří ke klasické aktivaci C, pomáhají při interakci mezi Ag a Ab komplexem a jinými komponentami C

Colton /Co

- 11 antigenů jednoho genu AQP1 (protein vodního kanálu)
- AQP1 a AQP3 exprimované na erys.

Funkce

- Zajištění transportu molekul vody membránou erys podle osmotického gradientu

Tkáňová distribuce

- většina tkání včetně erys (ledvinové tubuly, kapiláry, epitel oka, hepatální duktus aj.)
- Významné protilátky: HON, HTR

Cromer /Cr

- součást DAF(CD55) = komplementregulační protein, tlumí aktivační kaskádu
- receptor pro adhezi některých mikroorganismů/ enterovirů

Funkce

- regulace komplementu, chrání tkáň inhibicí C3 a C5 konvertázové aktivity při klasické a alternativní cestě

Asociace s nemocemi

- nejsou pospané abnormality, pouze u null forem intestinální nemoci
- u PNH je deficientní DAF

Diego /Di

- protein bandu 3
- exprimovaný v různých tkáních jako hlavní integrální protein membrány buňky
- čtvrtý loop z 12 nese AB0 epitopy
- absence bandu 3 je spojena se sferocytózou a hemolýzou

Funkce

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

Distribuce ve tkáních

- erytroidní gen je na erytrocytech
- exprese v ledvinách, kostech

Asociace s nemocemi

- v patogenezi ovalocytozy (Melanesie), kongenitální akantocytozy, hereditární sferocytozy

Protilátky:

- imunní IgG
- hemolyzující účinek

Dombrock /Do

- glykoproteinový Ag připojený k membráně erys GPI kotvou
- neznámá funkce
- tkáně: erytroidní, lymf.uzliny, testes, slezina
- asociace s nemocemi: ztráta Ag u PNH

Protilátky:

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

Gerbich /Ge

- glykoproteiny membrány
- tři vysokoincidentní Ag, ale také Ge negativní fenotypy

Funkce

- udržují integritu buňky, negativní povrchový náboj erys, participují při vstupu Plasmodia do erys

Tkáňová distribuce

- erytroidní i nonerytroidní tkáně

Asociace s nemocemi

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

Protilátky:

- imunní IgG
- vzácně HON, HTR
- autoprotilátky u AIHA, klinicky nevýznamné

Ostatní skupiny

Vysokofrekventní antigeny

- Vel, Lan, JMH, Sd^a, At^a
- Obtížně identifikovatelné / referenční pracoviště
- Téměř nelze najít kompatibilní krev
- Složitě potvrzení negativními fenotypy

Nízkofrekventní antigeny

- Chr^a, By, Bi, JONES, HJK, SARA
- Vzácně imunizace

Registry dárců krve

Jsou:

- Národní registr dárců vzácných krevních skupin / Transnet
- Mezinárodní registry dárců vzácných krevních skupin
- Referenční laboratoře národní/mezinárodní

Cíl:

- Vyhledávání skupinově shodných dárců pro imunizované pacienty – zajištění substituce krve (mražené TU)
- Work shop

View Rare Blood Types
Information

Blood Type	Monthly Donors	National Blood Bank	Frozen Blood Council/Europe
Oh	35	12	11
CDE/CDE	8	5	--
CdE/CdE	1	--	2
CwD-/CwD-	1	--	--
-D-/D-	86	--	--
Rhnull	9	--	5
Rh:-51	38	--	--
LW(a-b+)	45	--	11
LW(a-b-)	1	--	--
S-s-U-	328	37	21
S-s-U(+)	27	--	--
pp	74	2	38
Pk	11	5	3
Lu(a+b-)	323	32	49
Lu(a-b-)	151	37	13
Kp(a+b-)	145	37	39
Kp(a-b-)	2	--	--
Js(a+b-)	165	18	--
Ko	81	12	4
K:-11	2	--	--
Fy(a-b-)	563	69	75
Jk(a-b-)	91	19	3
Di(b-)	957	--	1
I-	93	12	--
Yt(a-)	230	17	107

CLB (Sanquin)



Amsterdam,
Netherlands

Rotterdam,
Netherlands



Lund, Sweden

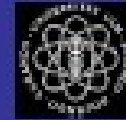
Dreieich, Germany



Bristol, UK
(UWE
and BITS)



Ulm, Germany



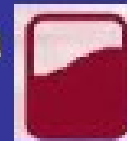
Derio, Spain



Prague,
Czech Republic



Barcelona
Spain



bloodgen
blood grouping & genotyping

Cave: Laboratorní průkaz

- **Antigenů** na vyšetřovaných erys **pomocí známých dg. sér**
- **Protilátek** ve vyšetřovaném séru **pomocí známých dg. Erys**
- **Průkaz** komplexu antigen+protilátka = **aglutinace**

- Zaškolený personál
- Standardní laboratorní postupy
- Postup dle správné laboratorní praxe