

Imunohematologie

Mgr. Jana Tylečková

TTO FN Brno

Obecná imunohematologie

- Imunologie aplikovaná na krevní buňky (erytrocyty, granulocyty, lymfocyty, trombocyty)
- Nauka o antigenech, protilátkách, imunitních reakcích, klinicky využívaná při přípravě a podání transfuze a u některých jiných stavů
- Řeší specifickou imunohematologickou problematiku (hemolytické onemocnění novorozence, autoimunitní hemolytické anemie, potransfuzní reakce, uplatnění v transplantologii)

Imunita

- Obecná definice: odolnost proti nemocem, antigenům
- Zajišťuje ji systém buněk, tkání a molekul, tzv. imunitní systém
- Dva typy imunity:
 - Přirozená (nespecifická) - Okamžitá reakce, brání vstupu aloantigenů do organismu, rychle je eliminuje (první linie obrany).
 - Neporušený epitel (jeho enzymy, mikroflóra)
 - Humorální složka (komplement, cytokiny, interferony)
 - Buněčná složka (fagocyty, NK buňky)
 - Získaná (specifická, adaptivní) - Pomalejší, ale specifická a více efektivní obrana (stimulují ji antigeny, které pronikly do tkání; rozpoznání antigenu v lymfatických orgánech)
 - Humorální složka (protilátky tvořené B lymfocyty, eliminují mikroby z extracelulárních tekutin)
 - Buněčná složka (T lymfocyty, CD4+ a CD8+ eliminují mikroby z buněk)

Imunohematologie = *protilátkový typ*
specifické imunitní odpovědi

Protilátky /imunoglobuliny

- produkty B-lymfocytů
- přítomné na membráně B lymfocytů jako antigenní receptory (BCR) nebo rozpuštěné jako proteiny v krvi a v mukózních tekutinách
- neutralizují a eliminují antigeny z krve a sliznic
- působí pouze extracelulárně
- rozeznávají jen *určité typy* antigenních molekul (sacharidy, složité chemické struktury s lipidy a proteiny)

Struktura imunoglobulinu

- 4 polypeptidové řetězce protilátky H₂L₂
- obsahuje 2 identické těžké (H) a 2 identické lehké (L) řetězce
- Tvoří tvar písmene Y, vzájemně spojené disulfidickými můstky
- Dva fragmenty Fab + jeden fragment Fc, mezi nimi flexibilní otočná oblast
- **Variabilní** část obsahuje oblast pro vazbu antigenu
- **Konstatní** část je neměnná, má oblast pro jinou vazbu (komplement, fagocytoza)
- Lehké řetězce: kappa, lambda
- Těžké řetězce: rozlišení na izotypy IgM, IgD, IgG, IgA, IgE

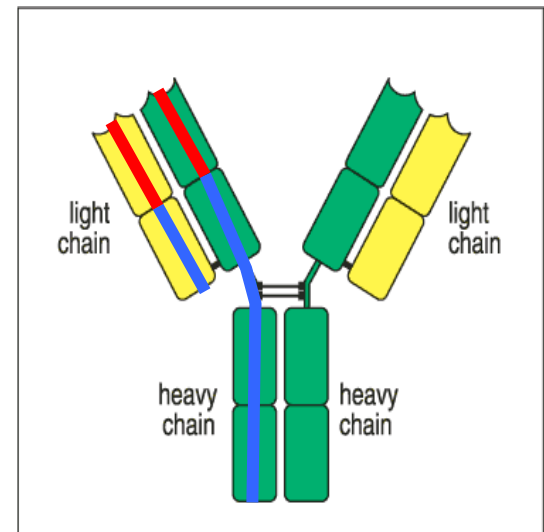


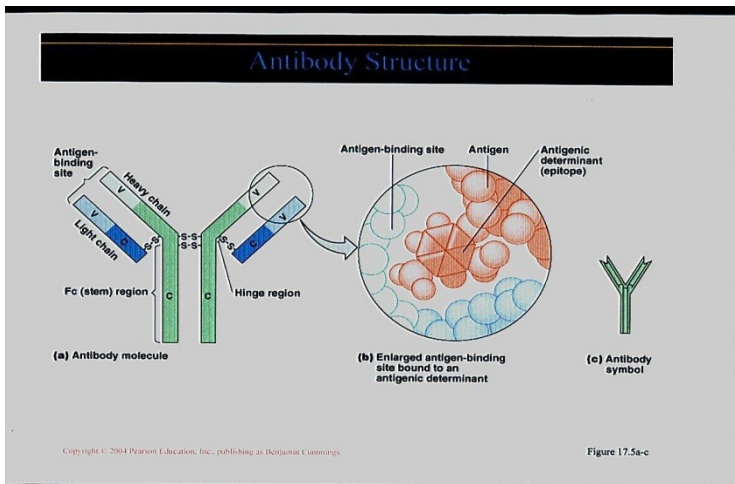
Fig 1.17 © 2001 Garland Science

Struktura protilátky

Monomery IgG, IgD, IgE = dvě vazebná místa pro Ag

Dimer IgA = čtyři vazebná místa pro Ag

Pentamer IgM = deset míst pro Ag



IgM antibodies

- Pentamer
- 5-10% of serum antibodies
- Fix complement
- In blood, lymph, on B cells
- Agglutinates microbes; first Ab produced in response to infection
- Half-life = 5 days

The diagram shows a pentamer of IgM antibodies. Five Y-shaped antibody units are arranged in a circle, connected to each other by disulfide bonds. A central J chain is also present, connecting the units.

Disulfide bond

J chain

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

IgA antibodies

- Dimer
- 10-15% of serum antibodies
- In secretions
- Mucosal protection
- Half-life = 6 days

The diagram shows a dimer of IgA antibodies. Two Y-shaped antibody units are connected to each other by a J chain. A secretory component is also shown, which is attached to the J chain.

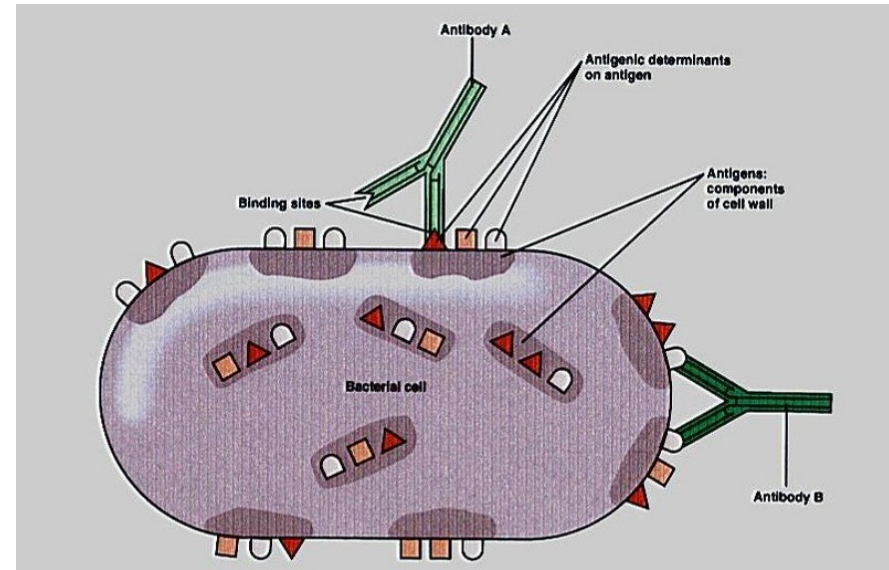
J chain

Secretory component

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Antigeny

- Cizí substance navozující imunitní odpověď
- Epitop (antigenní determinanta) = část Ag, na kterou se naváže protilátka
- Jeden antigen může mít více různých epitopů
- Obvykle proteiny, polysacharidy, lipidy, NK



- Antigeny v imunohematologii:
 - krevní skupiny erytrocytů
 - HLA (histokompatibilní, transplantační) antigeny

Komplement

- soubor sérových a membránových glykoproteinů, které slouží jako humorální složka nespecifické imunity
 - nejdůležitějšími proteiny komplementu jsou sérové proteiny C1-C9, převážně proteolytické enzymy (kaskádová reakce)
- hlavní funkce:
 - opsonizace bakterií při fagocytóze
 - chemotaxe fagocytů
 - zánětlivá reakce
 - lýza buněk (membránolytický komplex)
- 3 cesty aktivace komplementové kaskády:
 - *klasická (kontakt s Ab) – uplatňuje se v imuno hematologii*
 - *lektinová (vazba lektinu na bakteriální povrchy)*
 - *alternativní (s endotoxinem)*

Působení komplementu na erytrocyty

- Masivní aktivace komplementu = intravaskulární typ hemolýzy (vzniku membránového komplexu MAC+ vazoaktivních peptidů): lýza erytrocytů
- Mírnější aktivace komplementu = extravaskulární hemolýza v RES: fagocytóza erytrocytů

např. akutní HTR při ABO neshodě, CAD.....i.v.lýza

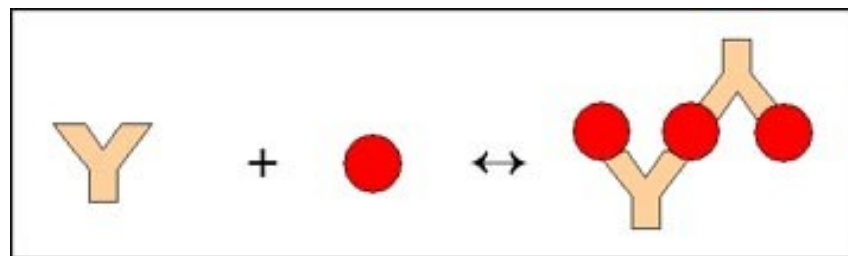
např. pozdní HTR, HON, WAIHAfagocytóza

Hemolýza = zkrácené přežívání erys na méně než 100-120 dní

Imunohematologická vyšetření

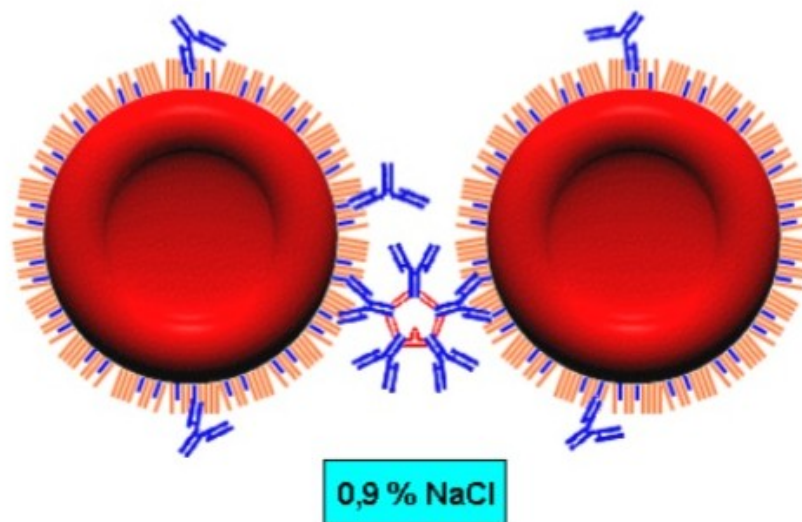
Princip: detekce imunních komplexů Ag+Ab

- 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 aglutinační techniky - testy sklíčkové, zkumavkové, pevná fáze, sloupcová aglutinace v gelu
- Testy při teplotě 20-23°C (PT), 4°C, 37°C dle cíle vyšetření



Aglutinace přímá/ solný test

- Solné prostředí = fyziologický roztok
- **IgM** molekula překlene vzdálenost mezi 2 ery
 - IgM = kompletní protilátky



- Použití:
 - Detekce erythrocytových Ag pomocí IgM Abs
 - ABO, RhD, C, c, E, e, K, M, N aj.
 - Detekce antierythrocytových protilátek (IgM)
 - anti-A, anti-B, chladové Abs

Aglutinace nepřímá

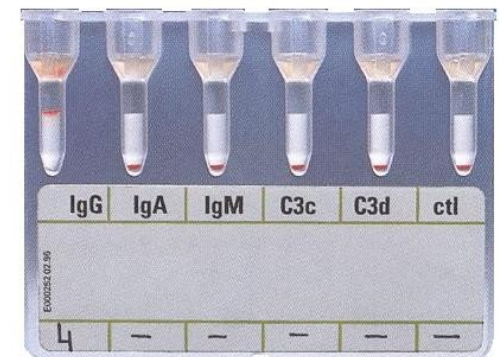
- Zásadní význam v imunohematologii
- Hlavně pro detekci **IgG** protilátek, které nejsou schopné přímé aglutinace
- Použití:
 - Detekce erytrocytových Ag pomocí IgG Abs
 - Dw/v (u dárců), Duffy, S, s aj.
 - Detekce antierytrocytových protilátek třídy IgG
 - Všechny klinicky významné abs (kromě anti-A/-B)
- Nepřímá aglutinace v situaci, kdy je nutné vizualizovat vzniklé imunní komplexy (u senzibilizující protilátky):
 - úprava erytrocytů pomocí **enzymů**
 - použití testu s **AGH** (antiglobulinum humanum)

Nepřímá aglutinace – enzymové testy

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

Nepřímá aglutinace – antiglobulinové testy (Coombsovy testy)

- Používají protilátky proti lidským proteinům (AGH sérum = Antiglobulinum humanum)
- AGH detekuje protilátky i komplement – polyspecifické/monospecifické (IgG, IgM, IgA, C3d, IgG1..)
- Pro vyšetření protilátek v séru i navázaných na erys, zkoušku kompatibility, vyšetření některých krevních skupin
- Různé techniky provedení (zkumavkové, pevná fáze, sloupcová agl.), modifikace testů se zkrácením doby inkubace v LISS, užití PEG

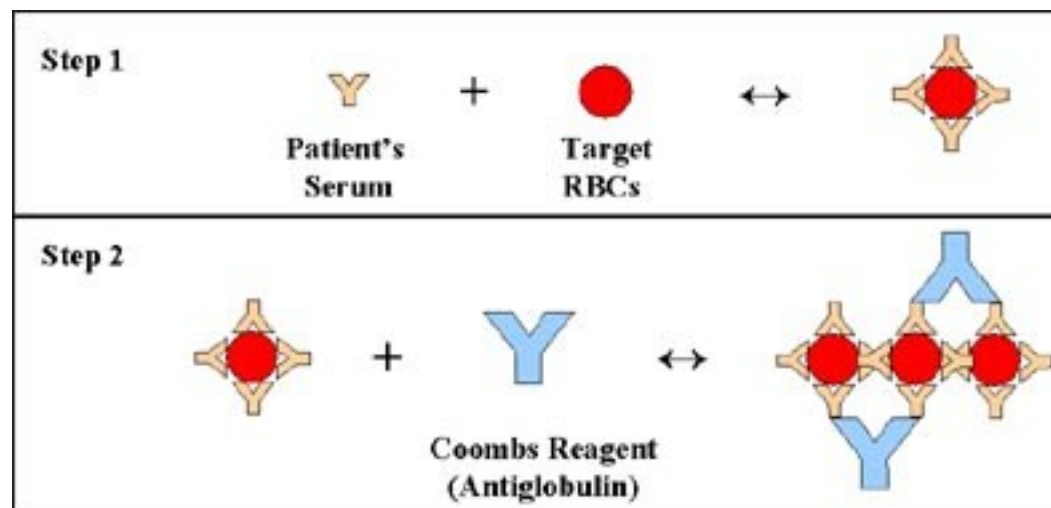


Aktuální doporučení: AGH test s použitím roztoku o nízké iontové síle (LISS), optimální metoda sloupcové aglutinace

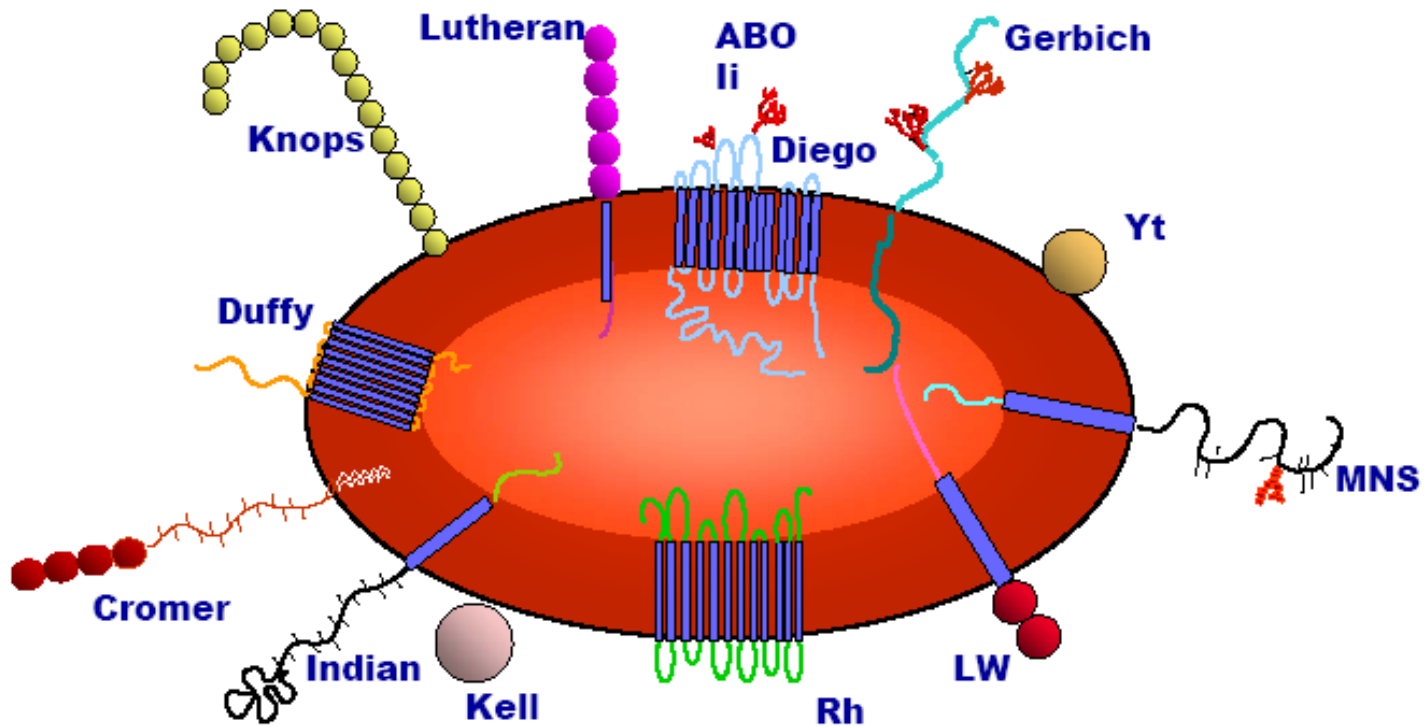
Nepřímá aglutinace – antiglobulinové testy (Coombsovy testy)

Dva typy AGH testů:

- Přímý AGH test (PAT) pro detekci protilátek na erys při in vivo senzibilizaci
- Nepřímý AGH test (NAT) pro detekci protilátek v plazmě/séru po in vitro inkubaci plazmy/séra obsahujícího protilátku s erys



Krevní skupiny erytrocytů



Krevní skupiny/skupinové systémy

- Membránové/povrchové antigeny erytrocytů
- Antigeny proteinové nebo sacharidové (oligosacharidy-glykoproteiny-glykosfingolipidy-glykolipidy) s biologickými funkcemi
- Bialelické systémy (alela mateřská a otcovská)
- Podléhají pravidlům mendelovské dědičnosti
- V r. 2021: známo 43 skupinových systémů, celkem 378 antigenů
- Syntetizované většinou na erytrocytech, ale také naadsorbované z plazmy na buňky
- Zastoupení nejen na erys, ale i na buňkách jiných tkání
- Imunogeny/cizorodé = vznikají proti nim aloprotilátky

Rozdělení krevních skupin podle struktury a funkce

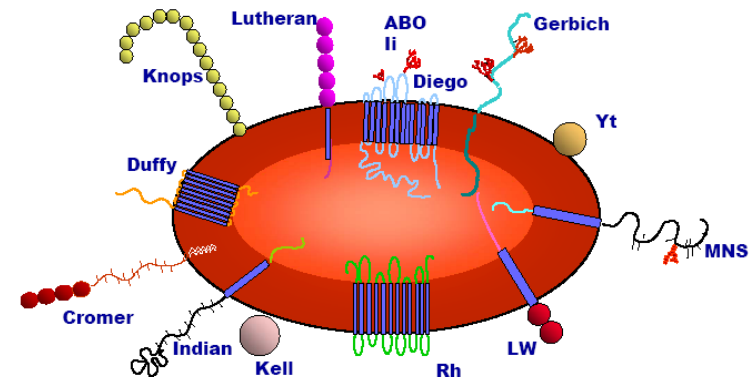
1. Podle struktury

- Povrchové
- Intramembránové
- Transmembránové

2. Podle funkce

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

Blood Groups on the RBC



JR Storry

Slide courtesy of E. Sjöberg Wester

Dědičnost krevních skupin

- Obvykle dvě alely pro určitý gen, může být i více alel v genu (genový polymorfismus)
 - Alela dominantní – recesivní - kodominantní
- 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

ABO systém

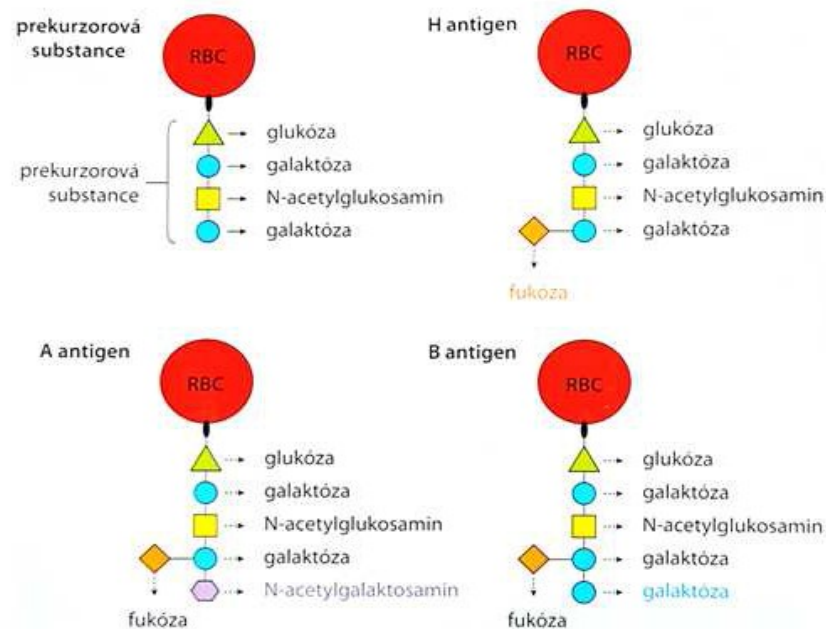
- nejdéle známý systém KS, nejvýznamnější z hlediska histokompatibility
- dva antigeny: A, B - oligosacharidy
- základ tvoří antigen H (KS 0 = prekurzorový řetězec pro A, B)

- 4 základní fenotypy:

- A, B, AB, 0

- 6 genotypů:

- A/A, A/O,
- B/B, B/O,
- A/B,
- O/O



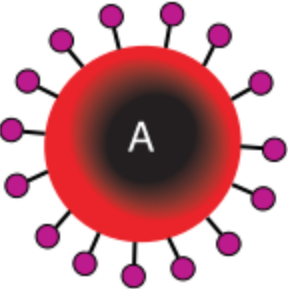
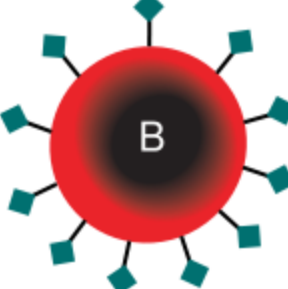
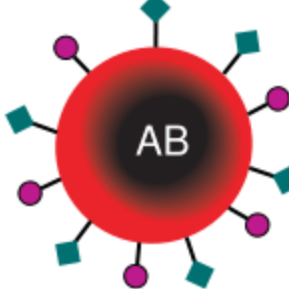
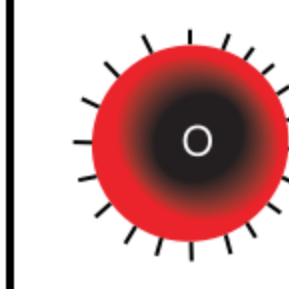


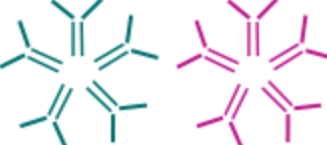
A,B antigeny

- Gen AB0 (na 9.chr.) má 3 zákl. alely: kodominantní A a B a recesivní O:
 - O alela = neaktivní gen
 - Neprobíhá substituce oligosacharidů, exprimován pouze H antigen s fukózou
 - A alela = A transferáza
 - B alela = B transferáza
 - Připojením molekuly N-acetyl-galaktosaminu nebo galaktózy k H antigenu vznikne skupinově specifický (A nebo B) antigen

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

AB0 protilátky

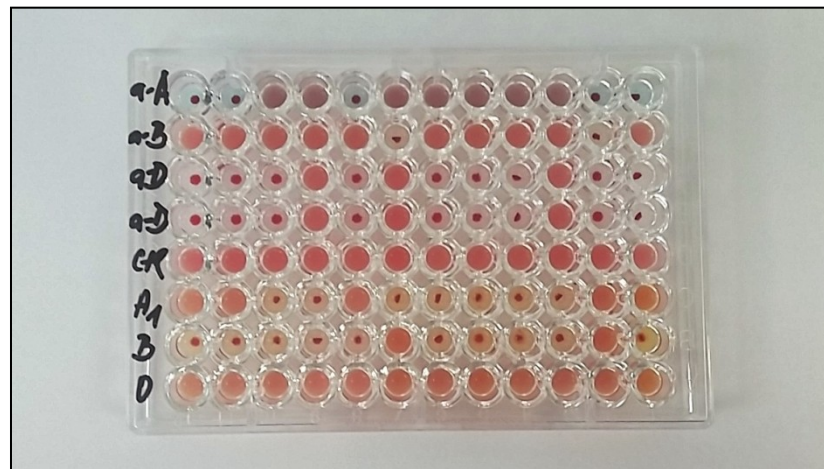
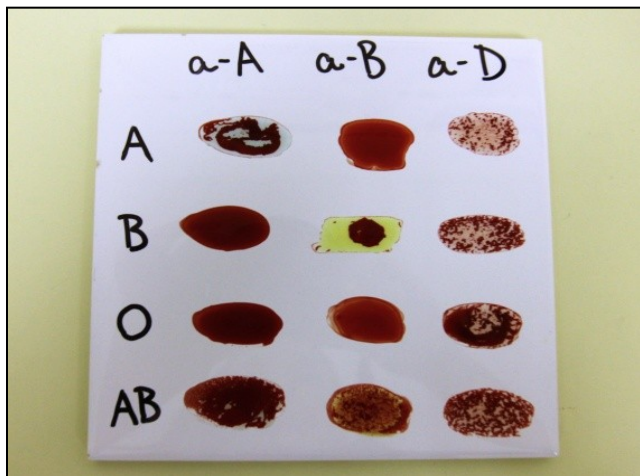
- odlišují AB0 systém od všech ostatních skupin
- **anti-A a anti-B**, u osob 0 také **anti-A,B**
- pravidelné protilátky nacházející se v plazmě
- přirozené protilátky při kolonizaci organismu mikroby - imunizace substancemi podobnými antigenům A,B během prvních měsíců života
- *vzácně jiný nález: novorozenci, 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
				
			O	
	A antigen	B antigen	A B antigen	O antigen

Laboratorní vyšetření:

- A a B antigeny na erythrocytech:
 - monoklonální dg. séra anti-A, anti-B (+ příp. anti-A,B)
- Pravidelné ABO protilátky v séru:
 - detekce pomocí dg.erytrocytů A₁,B (+ ery 0 nebo autoctl.)
 - u dětí do 4 měsíců se nevyšetřují
- solný test pro přímou aglutinaci/ inkubace při laboratorní teplotě
- Přímá aglutinace: metoda zkumavková, sloupcová aglutinace, sklíčková, mikrotitrační desky

Laboratorní vyšetření KS



AB0 diskrepance

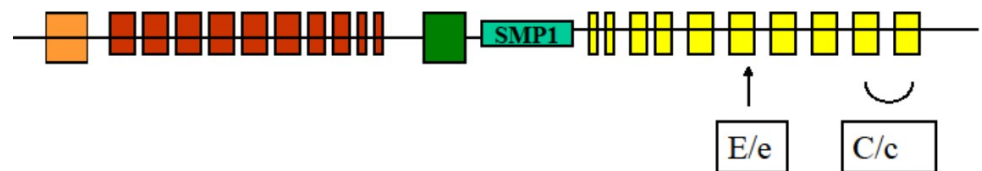
- Jsou při vyšetření antigenů nebo protilátek
- Diskrepance je nutné vyřešit před uzavřením výsledku
 - *Opakovat vyšetření, provést vyšetření z nového vzorku, použít jiné reagensie spolu s kontrolami, zvolit jinou reakční teplotu, promýt erytrocyty, použít eluční techniky apod. dle typu problému*
- Podání AB0 inkompatibilního přípravku vede k těžké hemolytické potransfuzní reakci – fatální následky!
- Pokud není stanovena skupina – univerzální režim: podávat **0 erytrocyty, AB plazmu**

Sérologické vyšetření ostatních krevních skupin

- 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

- Nejpolymorfnější systém – více než 50 známých antigenů
- 2 související geny *RHD* a *RHCE* (na 1. chromozomu)
- *RHD* gen kóduje RhD protein (D+)
 - negativní fenotyp D- : D gen chybí(delece – naše populace) či inaktivní
- *RHCE* gen kóduje RhCcEe protein (kombinace antigenů Ce,ce,cE,CE)
- každý gen 10 exonů, charakteristické uspořádání
- mutace genu, rekombinace mezi genovými oblastmi vedou ke vzniku vzácných D alel
- změny v genu se manifestují jako **změny ve fenotypu**, tj. změnou v expresi RhD antigenu - **variantní D antigeny**



10 exons encoding the D
protein plus 2 Rh boxes

10 exons
encoding the
CcEe protein

Rh antigeny

- antigeny D,C,c,E,e (dále např. C^w, G, Hr...)
- 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 erythrocytu dle genotypu

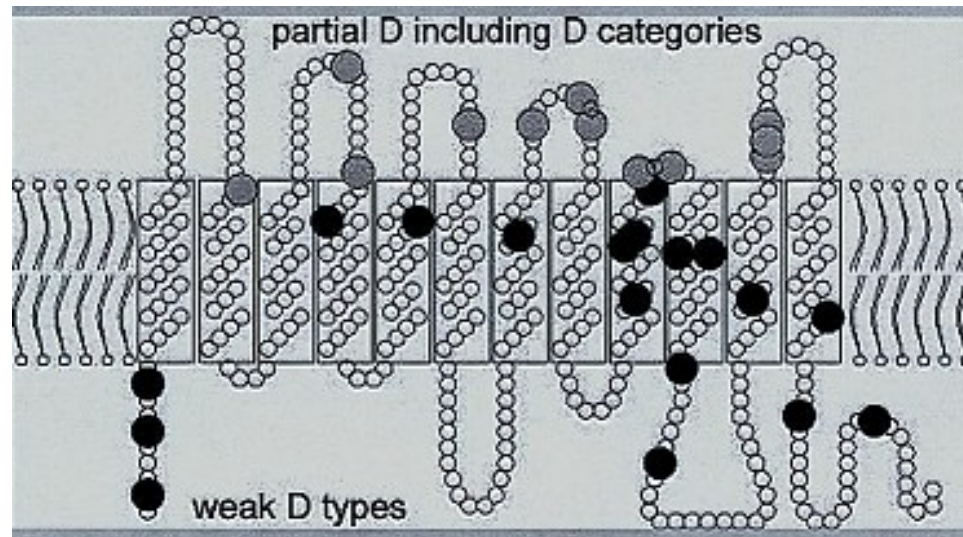
Rh antigeny

- sérologické rozeznání pomocí dg. sér anti-D,-C,-c,-E,-e
- existuje **8 haplotypů** (Dce, DcE, DCe, DCE, dce, dCe, dcE, dCE) a **36 genotypů** (= kombinace 2 haplotypů)
- zygocii D/D a D/d nelze sérologicky odlišit

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

Variantní D antigeny:

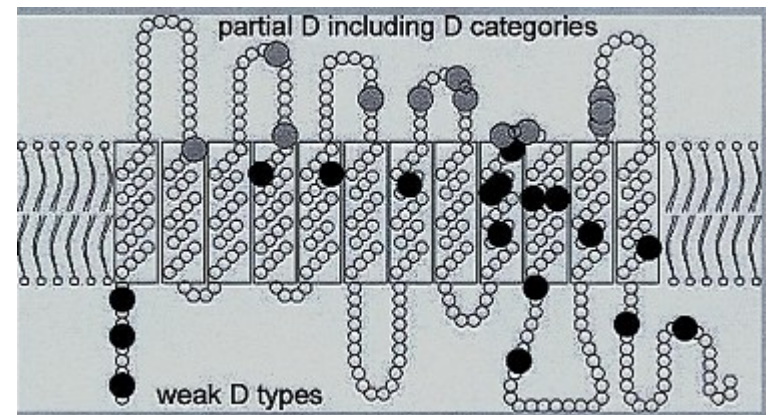
- Weak D
 - kvantitativní změna antigenu
- Parciální (variantní) D
 - kvalitativní změna v mozaice antigenu



Weak D, D^w

- Slabě exprimovaný antigen
- Všechny D epitopy, žádná změna AMK v extramembranózní části RhD proteinu, mutace postihují intramembranózní a intracelulární část proteinu
- Nebývá riziko imunizace D antigenem
- Příjemci: RhD+ transfuze
- Těhotné: anti-D profylaxe ne
- spousta typů – viz.

<http://www.rhesusbase.info/>



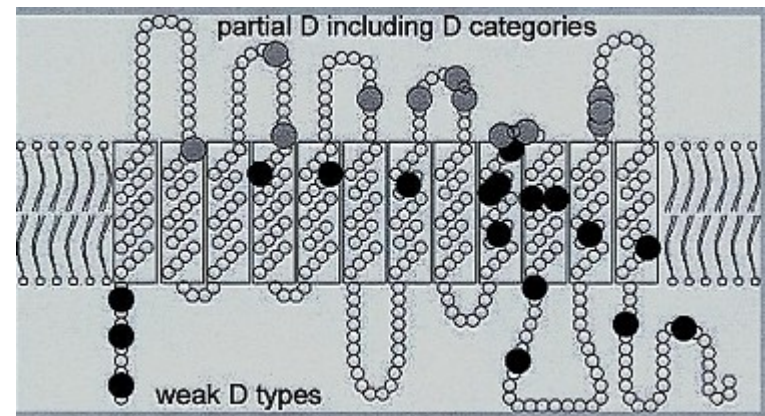
Parciální (variantní) D, D^{var}

- 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, která reaguje se všemi RhD+ kromě vlastních ery
- Příjemci: RhD- transfuze
- Těhotné: anti-D profylaxe ano

- Spousta variant

(<http://www.rhesusbase.info/>)

- Klinicky nejvýznamnější je varianta D VI



Vyšetření RhD antigenu

- rutinní vyšetření D antigenu v rámci krevní skupiny – přímá aglutinace
- různé typy diagnostik anti-D: IgM, blend IgM/IgG, IgG
- vyšetření 2 monoklonálními dg. séry s různými klony anti-D třídy IgM
 - diskrepance či zeslabení reakce – do dořešení uzavření výsledku jako $D^{w/v}$ (TP dárce označen jako RhD poz., příjemce dostává RhD neg. ery TP)
- validita testu - použití kontrolního séra „Rh ctl“ (= diluentová kontrola bez obsahu Abs) k vyloučení falešně pozitivních výsledků
 - pro uzavření výsledku vyšetření RhD musí být Rh kontrola negativní

Rh protilátky

- Imunní, klinicky významné - vedou k destrukci erys
- IgG
- anti-D, -E, -c, -C, -e, -Cw
- neaktivují komplement, vedou k extravaskulární hemolýze
- IgG prochází placentou (aktivní transport)
- klinické souvislosti: HON, HTR
- anti-Rh tepelné autoprotiátky u AIHA
- profylaktické použití anti-D jako prevence HON
- průkaz v testech při 37°C
- zvýšená reaktivita v enzymovém testu, efekt dávky (=Ab reaguje silněji s homozygotní krvinkou)

Kvíz – určování KS

Diagnostická séra	Erys pac.
anti-A	++++
anti-B	-
anti-D	++++
anti-D	++++
Rh ctl.	-

Typové erytrocyty	Plazma pac.
0	-
A1	-
A2	-
B	++++

Kvíz – určování KS

Diagnostická séra	Erys pac.
anti-A	-
anti-B	++++
anti-D	-
anti-D	-
Rh ctl.	-

Typové erythrocyty	plazma pac.
0	-
A₁	++++
A₂	+++
B	-

Kvíz – určování KS

Diagnostická séra	Erys pac.
anti-A	++++
anti-B	++++
anti-D	++++
anti-D	++++
Rh ctl.	-

Typové erythrocyty	plazma pac.
0	-
A₁	-
A₂	-
B	-

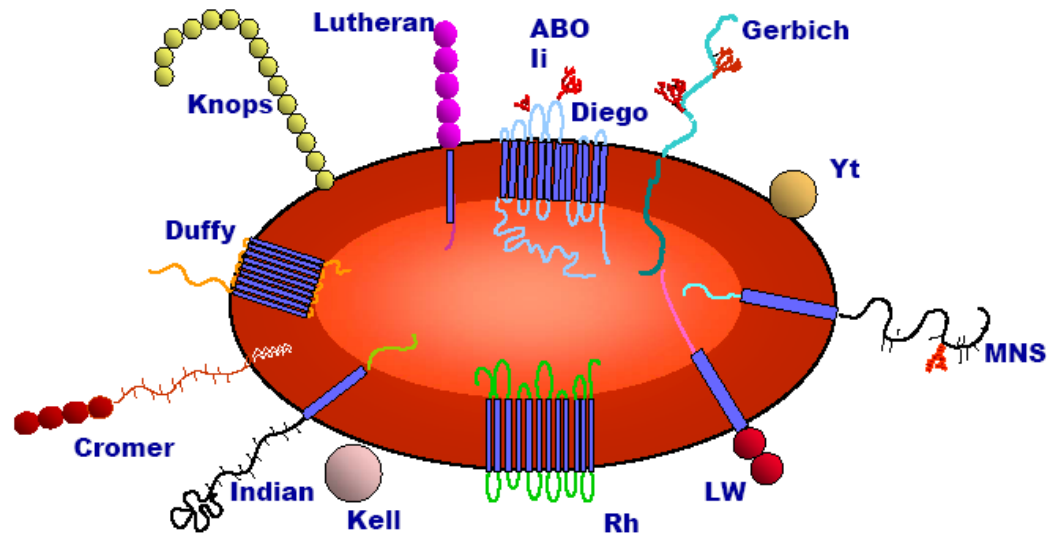
Kvíz – určování KS

Diagnostická séra	Erys pac.
anti-A	-
anti-B	-
anti-D	+
anti-D	++
Rh ctl.	-

Typové erythrocyty	plazma pac.
0	-
A₁	++++
A₂	+++
B	++++

Ostatní krevní skupiny

Blood Groups on the RBC



JR Story

Slide courtesy of E. Sjöberg Wester

Kell systém

- glykoproteinové antigeny
- silné imunogeny
- Celkem 38 antigenů v systému, tvoří alelické páry: K/k, Kpa/Kpb, Jsa/Jsb
- Nejvýznamnější antigeny: Kell (K), Cellano (k)
- 90% jedinců nemá K (Kell), 1% nemá antigen k (Cellano)

Kell – protilátky:

- imunní protilátky, IgG typ
- klinicky významné
 - v etiologii HON (navíc suprese erythropoezy), HTR
- dop. se nepodávat K+ ery dívkám a ženám ve fertilním věku
- častá anti-K, vzácně anti-k

Kidd systém (Jk)

- glykoproteinové antigeny Jka a Jkb (kodominantní)
- Fenotypy: Jk(a+b-), Jk(a+b+) a Jk(a-b+)

Kidd – protilátky:

- imunní IgG typ, hemolyzující účinek při aktivaci komplementu (cca 50%)
- méně časté, ale klinicky významné
 - nebezpečné, senzibilizované ery podléhají rychlé fagocytóze - přehlédnutelné (rychle odstraňovány z oběhu nemusí být detekovány při následujícím předtransf. vyš.) → rychlá sekundární imunologická odpověď, akutní potransfuzní reakce typu HTR
 - vzácně u HON

System Duffy (Fy)

- glykoproteinové antigeny
- alely Fya, Fyb - kodominantní
- alela Fy u Afričanů (nefunkční alela bez Ag produktu)
 - fenotyp Fy(a-b-) protektivní pro malarii

Duffy – protilátky:

- imunní IgG typ
 - relativně častá anti-Fya , méně častá anti-Fyb
- Klinický význam:
 - HON vzácně
 - někdy HTR (pozdní či akutní, obvykle s lehčím průběhem)

MNS systém

- Glykoforiny transmembránové
- *GPA* gen = MN antigeny (kodominantní)
- *GPB* gen = Ss antigeny (kodominantní)

MNS – protilátky:

- většinou přirozené protilátky - chladové, IgM
 - -M,-N bez klinického významu
- vzácně imunní IgG (anti-s,-S,-M)
 - -S,-s vzácně HON a HTR při aktivitě v NAT

Další systémy krevních skupin

- I systém
- Lewis
- Lutheran
- P systém
- Chido/Rodgers (Ch/R)
- Colton (Co)
- Cromer (Cr)
- Diego (Di)
- Dombrock (Do)
- Gerbich /Ge
- ...

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
- Exprese jen u malé části populace
- Protilátky proti nim vzácně vedou k HTR