

# 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 H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>
- 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

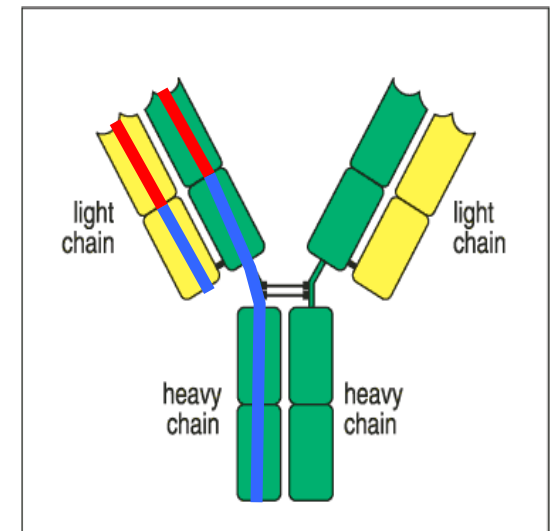


Fig 1.17 © 2001 Garland Science



# 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
- Imunogenicitu 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, WAIHA .....fagocytóza



# 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
  - Degradální 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:

- C1q .....C1 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

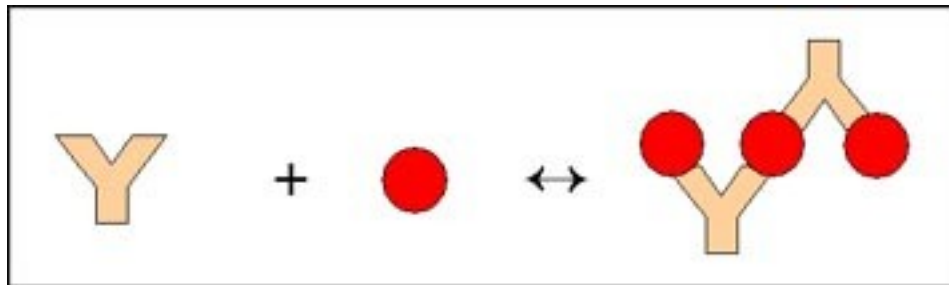
- Reakce imunitních buněk s vlastními antigeny při **selhání fyziologické regulace**
- Vznik autoprotilátek nebo cytotoxická aktivace T bb. včetně cytokinové aktivace B bb. vede k poškození tkání
- Dědičná dispozice (MHC geny i non-HLA geny) + spouštěcí faktory z okolí (infekce, záněty)
- U 1-2% jedinců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

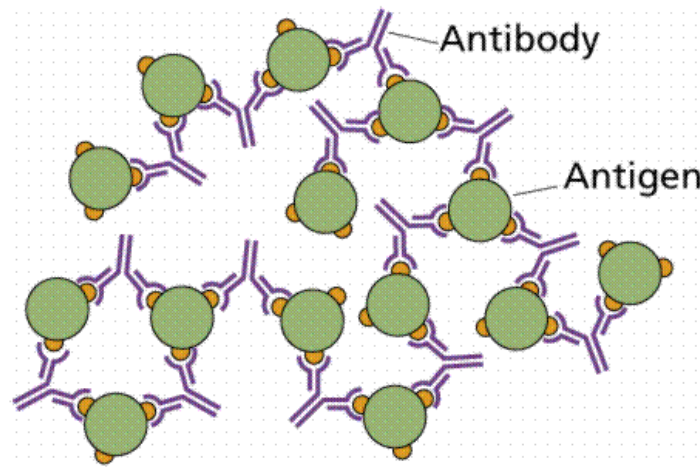
# Aglutinace přímá/ solný test

- 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 erytrocyty)
- *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

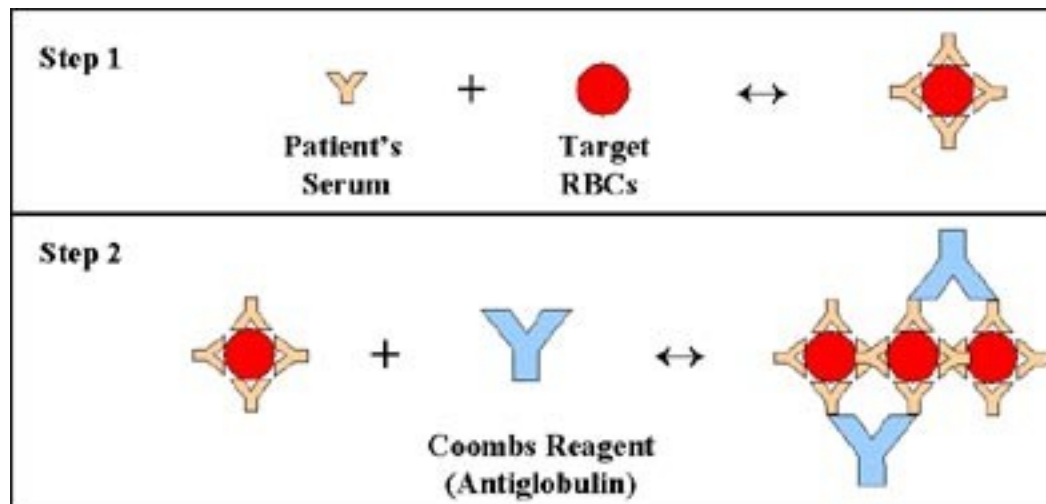
## AGH testy/povinné vyšetření:

- 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

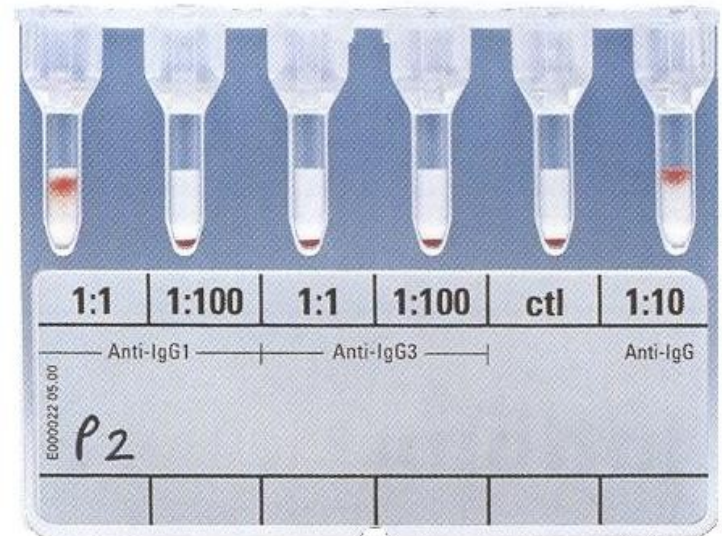
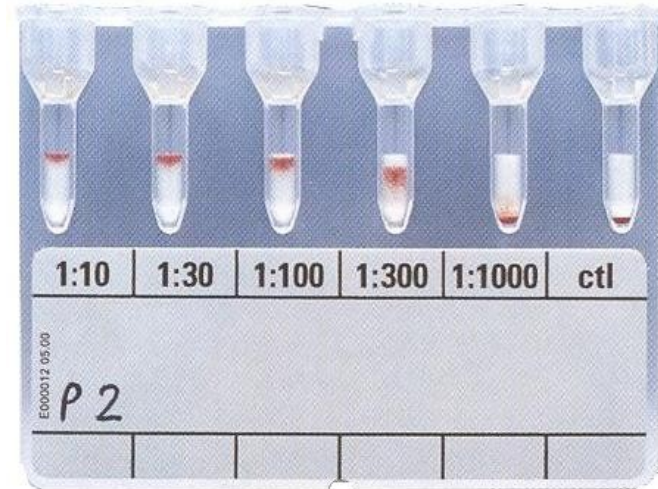
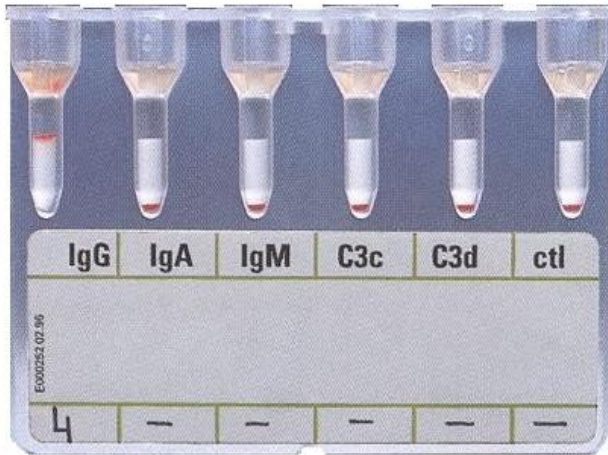
## Anti-C sérum (anti-C 3b,c,d):

- 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, prozóna, 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 (vylučovatelství 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*

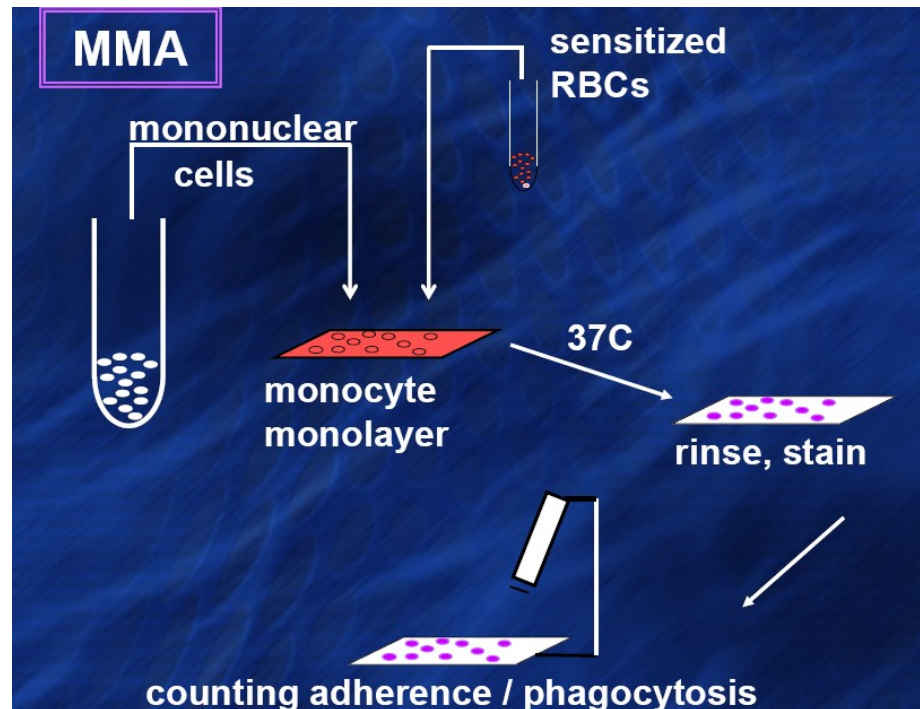
DNA microarray. Analýza signálů scannerem a automatická interpretace genotypů a fenotypů

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

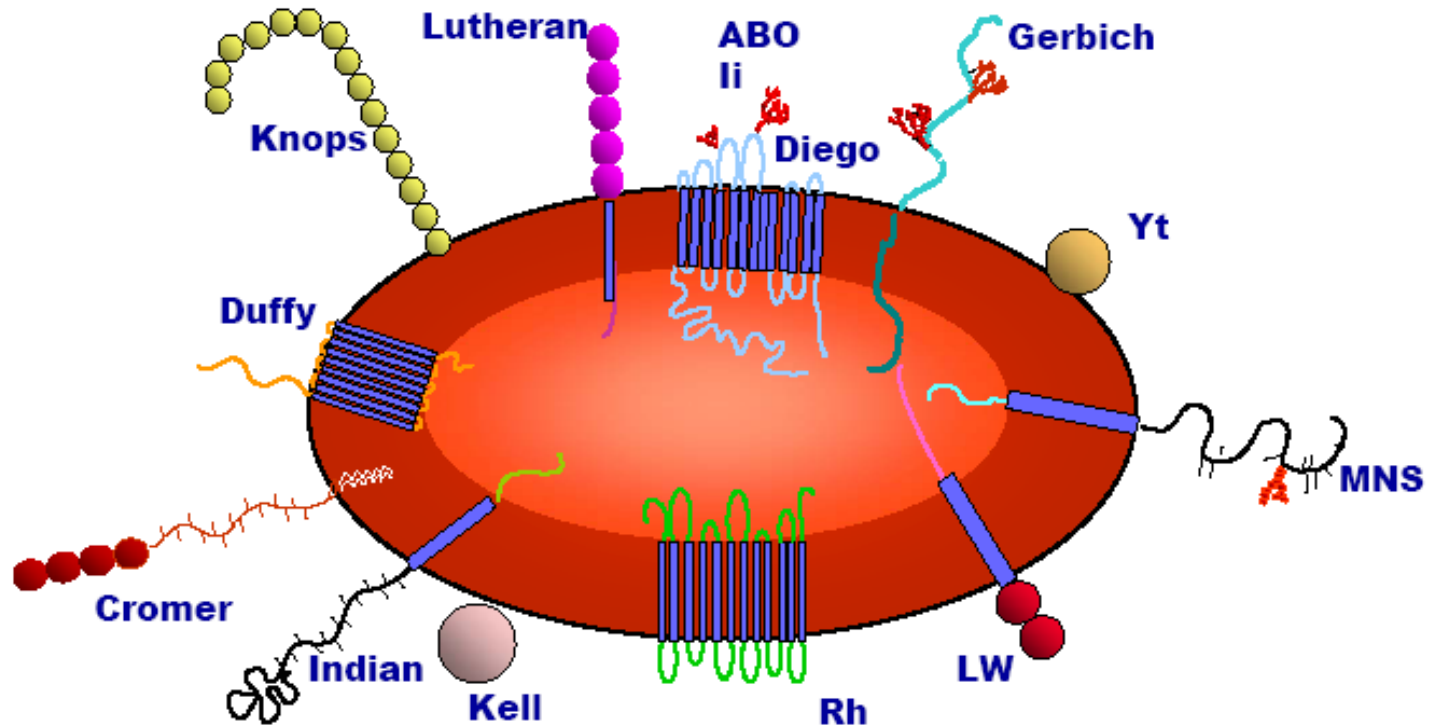




# Speciální testy v imunohematologii

- 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, P<sub>1</sub>, 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

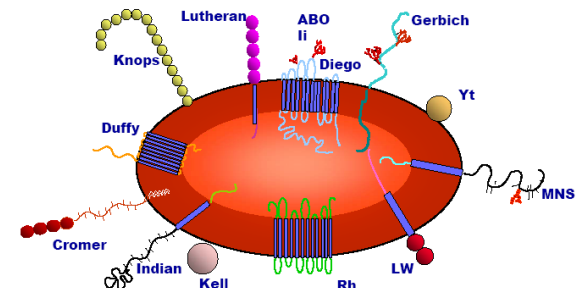
## 1. Strukturální skupiny

- 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<sup>a</sup>)
- První trojčíslí pro systém (005 Lutheran)
- Druhé trojčíslí identifikuje antigen (001Lu<sup>a</sup>)

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

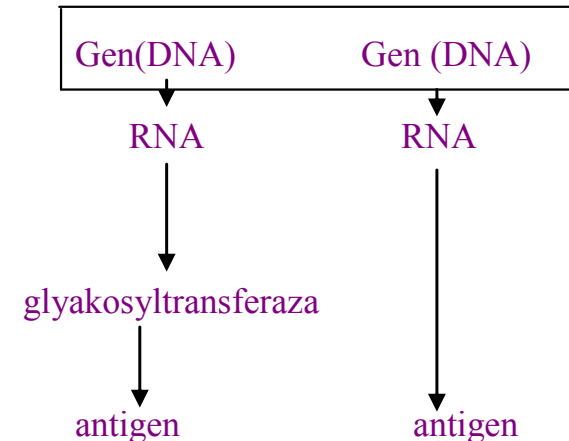
|                |         |                 |                 |                 |
|----------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Matka/<br>otec | 00<br>0 | AA,A0<br>A      | BB,B0<br>B      | AB<br>AB        |
| 00<br>0        | 00      | A0,00           | B0,00           | A0,B0           |
| AA,A0<br>A     | A0,00   | AA,A0,<br>00    | AB,A0,<br>B0,00 | AA,AB,<br>A0,B0 |
| BB,B0<br>B     | B0,00   | AB,A0,<br>B0,00 | BB,B0,<br>00    | AB,BB,<br>A0,B0 |
| AB<br>AB       | A0,B0   | AA,AB,<br>A0,B0 | AB,A0,<br>BB,B0 | AA,AB,<br>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

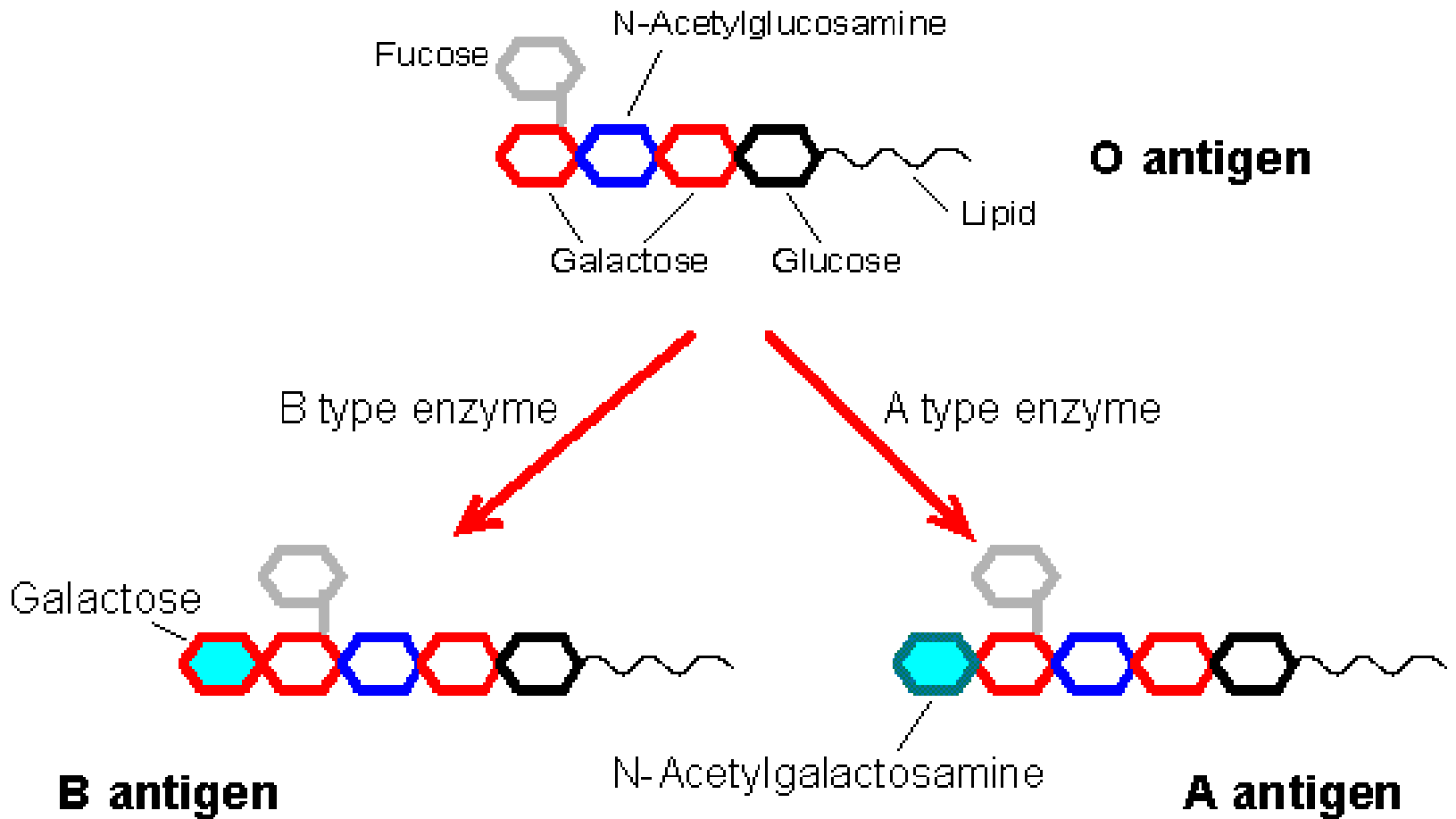
- 0 alela = neaktivní gen

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

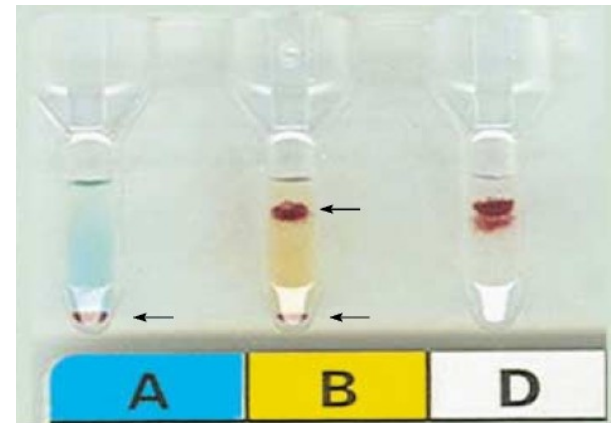
- slabší reakce získaného antigenu B

## Zeslabení antigenů (obvykle A antigenu)

- leukemie, malignity

## Chimérické antigeny (B/0)

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

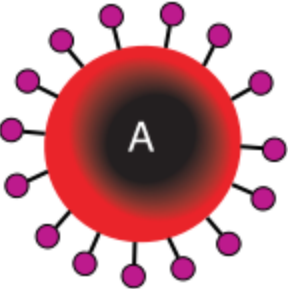
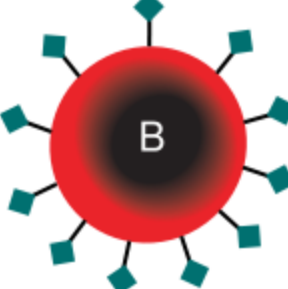
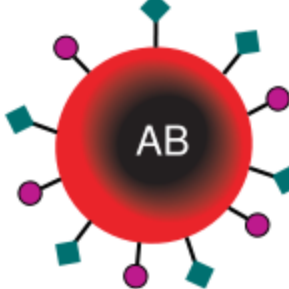
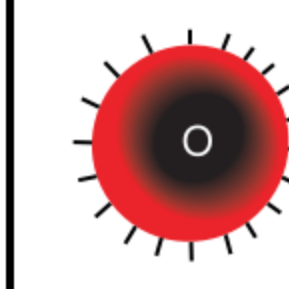


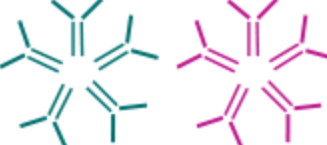





# H - deficitní fenotypy

- 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 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  |
|--|--|--|--|--|
|  |                     |                    |                       |                         |
|  |  <p>Anti-B</p>      |  <p>Anti-A</p>      | <p>O</p>   |  <p>Anti-A a Anti-B</p> |
|  |  <p>A antigen</p> |  <p>B antigen</p> |  <p>A B antigen</p> | <p>O antigen</p>   |

# 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 A<sub>1</sub>,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<br>v séru) | A (anti-B v<br>séru) | B (anti-A<br>v séru) | AB(žádné<br>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

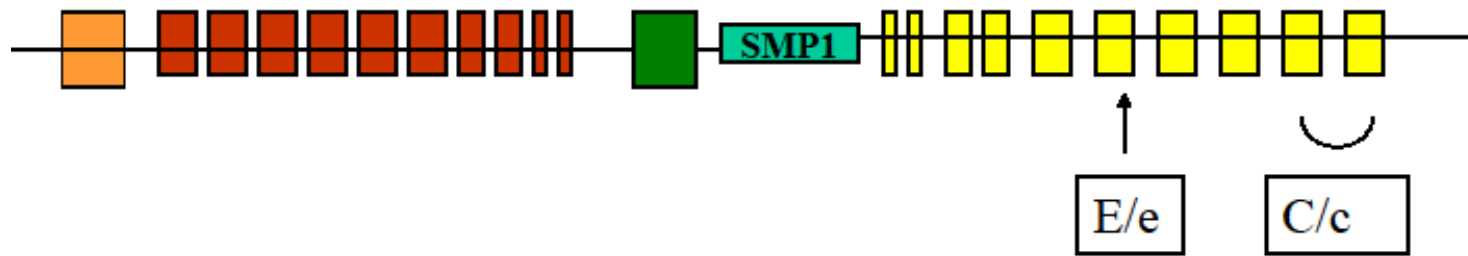
- Princip sérologického vyšetření ostatních krevních skupin je stejný: Antigeny na vyšetřovaných erythrocytech detekujeme pomocí specifických diagnostických protilátek (dg. sér) v testu a technikou, které umožňují jejich průkaz. Je to naprosto dostačující pro běžné diagnostikování.
- Kromě AB0 nejsou 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

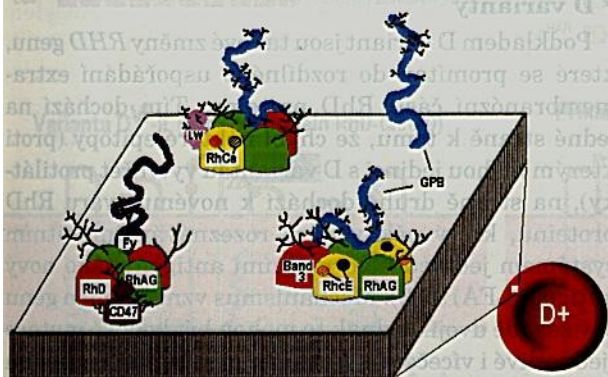
10 exons encoding the CcEe protein

- 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 inknem inkompletní (IgG) anti-RhD protilátek.

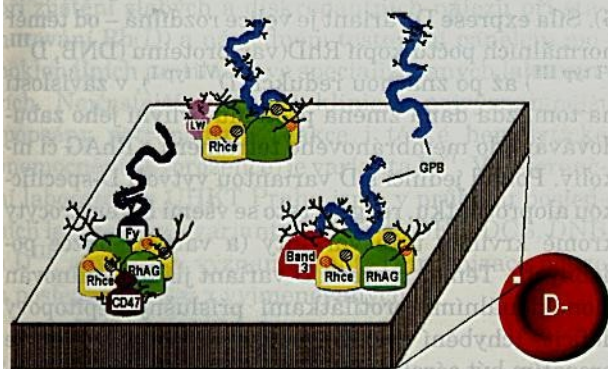
### • Rh<sub>null</sub> a Rh<sub>mod</sub> fenotypy

Na krvinkách těchto fenotypů nejsou prokazovány žádné Rh antigeny (Rh<sub>null</sub>), nebo jsou velice zeslabené a prokazatelné jen nejcitlivějšími metodami (Rh<sub>mod</sub>). Podle způsobu dědičnosti byly rozeznávány dva typy Rh<sub>null</sub>: 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+)

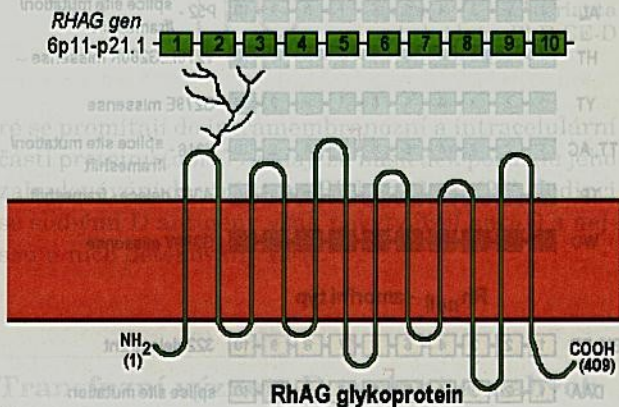
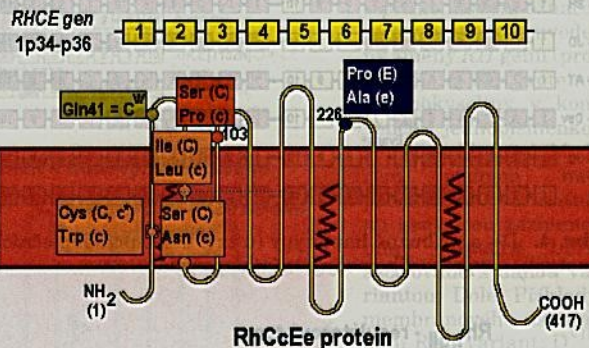
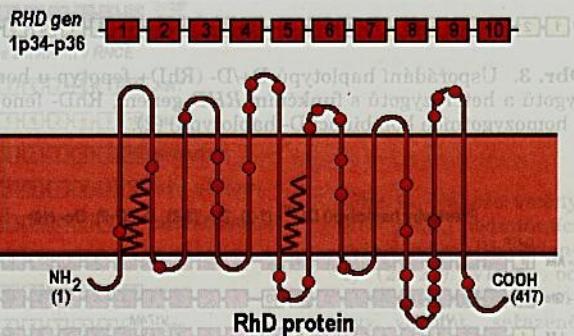
RHD-RHCE/RHD-RHCe



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

RHce/RHcE

Obr. 1. Membránové uspořádání struktur Rh komplexu na RhD+ (R<sub>+</sub>, R<sub>e</sub>) krvinkách (nahoře) a na RhD- (r<sub>+</sub>) krvinkách (dole).



Obr. 2. Schéma uspořádání RHD, RHCE a RHAG genů a předpokládaná dvourozměrná struktura proteinů RhD, RhCcEe a glykoproteinů 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<br>R <sub>1</sub> R <sub>1</sub> | DCe/DCe<br>R <sub>1</sub> R <sub>1</sub><br>DCe/dCe<br>R <sub>1</sub> r'                                 |
| D+C-<br>c+E+e+ | DcE/dce<br>R <sub>2</sub> r              | DcE/dce<br>R <sub>2</sub> r<br>DcE/Dce<br>R <sub>2</sub> R <sub>0</sub><br>Dce/dcE<br>R <sub>0</sub> r'' |

# Rh nomenklatura

- Písmenová: D,C,E,c,e, f,C<sup>w</sup>,C<sup>x</sup>,Hr<sub>0</sub>,Hr,Har,hr<sup>S</sup>...
- Fisherova + Wienerova: DCE = R<sub>1</sub>  
DcE = R<sub>2</sub>  
Dce = R<sub>0</sub>  
DCE = R<sub>z</sub>  
dce = r  
dCe = r'  
dcE = r''  
dCE = r<sup>Y</sup>

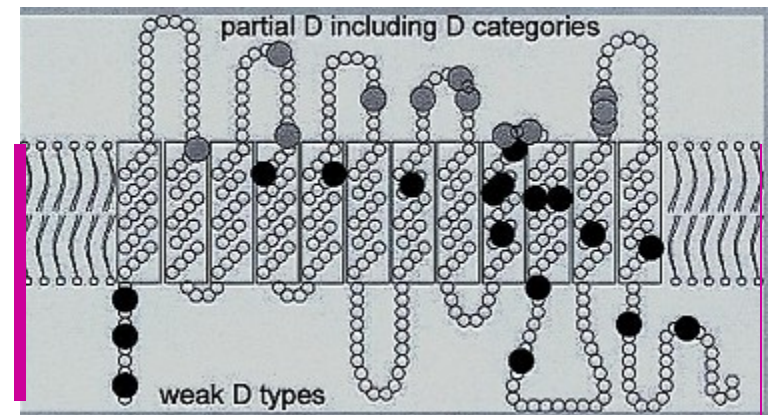
# Abnormální typy Rh antigenů

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



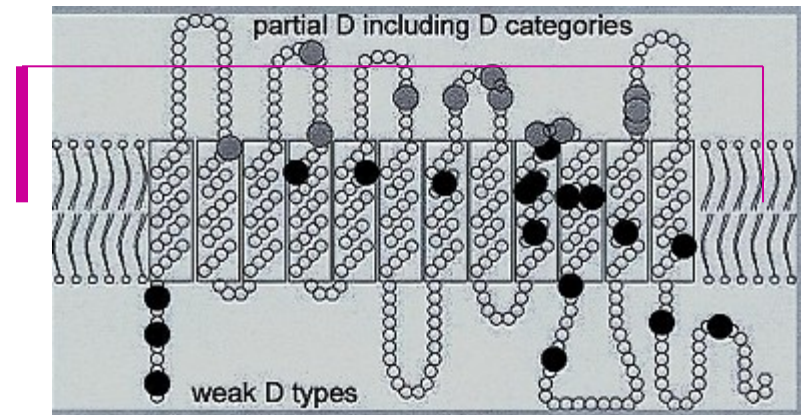
# Weak D, D<sup>w</sup>

- Původní terminologie „D<sup>u</sup>“, 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<sup>var</sup>

- 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

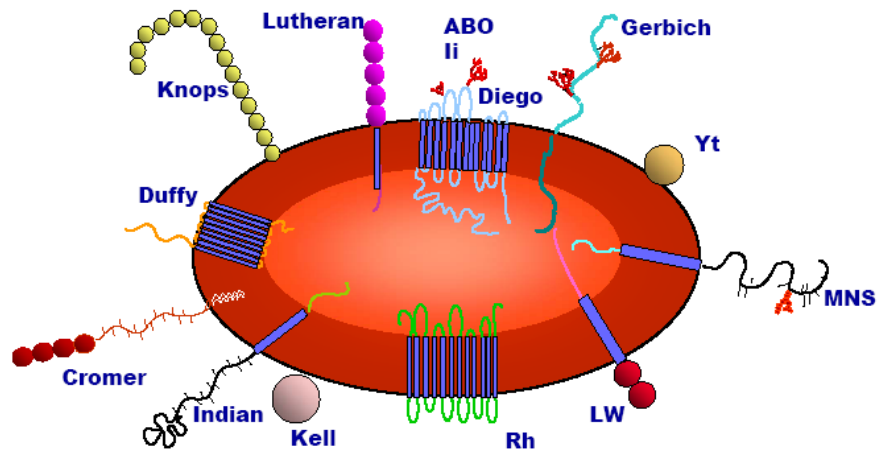
- produkty alely RHCE
- frekvence: C 68%, c 81%, E 29%, e 98%
- substituce aminokyselin v RhCcEe proteinu vede ke vzniku slabých a variantních antigenů
- složené antigeny ce, Ce, CE, cE, antigen G
- antigeny méně časté C<sup>w</sup>, C<sup>x</sup>

# 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 autoprotiátky 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<sub>cord</sub>)



# 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 erythrocytech, 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<sup>a</sup>, anti-Le<sup>b</sup>
- 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
- antitetické 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<sub>u</sub> reaguje se všemi erytrocyty s výjimkou K<sub>o</sub> 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<sup>a</sup>
- méně častá anti-Fy<sup>b</sup>
- anti-Fy<sup>3</sup> 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, erythropoeza

# 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-P<sub>1</sub> jako přirozená chladová protilátka
- nebývá HON, HTR
- anti-P, -P<sup>k</sup>, -p jsou vzácné
- anti-PP<sub>1</sub>P<sup>k</sup> 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 (-IP<sub>1</sub>, -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<sup>a</sup>, Co<sup>b</sup>

## 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<sup>a</sup>, At<sup>a</sup>
- Obtížně identifikovatelné / referenční pracoviště
- Téměř nelze najít kompatibilní erytrocyty pro imunizované

## Nízkofrekventní antigeny

méně než 1%

- Chr<sup>a</sup>, By, Bi, JONES, HJK, SARA
- Vzácně imunizace transfuzemi, většina dárců antigen nemá

# HLA I. třídy na erytrocytech

- Bg antigeny na zralých erytrocytech
- Bg<sup>a</sup> = HLA-B7
- Bg<sup>b</sup> = HLA-B17
- Bg<sup>c</sup> = 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

