

Imunohematologie

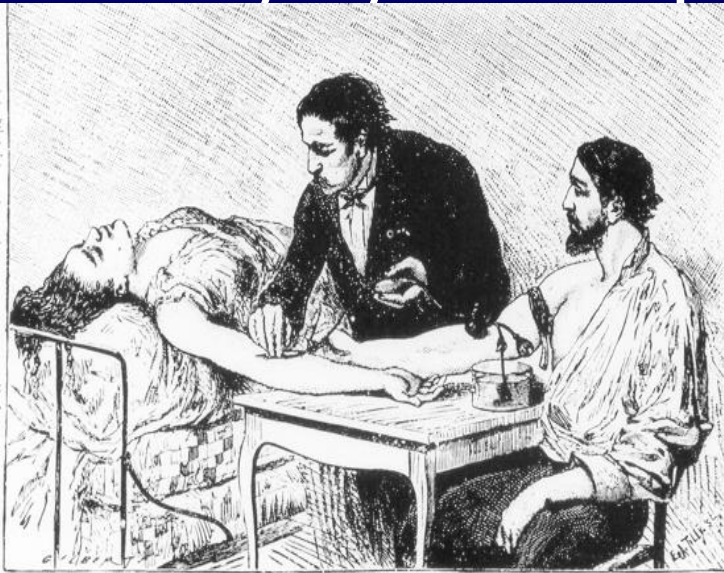
Martin Písačka
ÚHKT Praha

Seminář 1.IK 1.LF UK 2014

Poznání krevních skupin

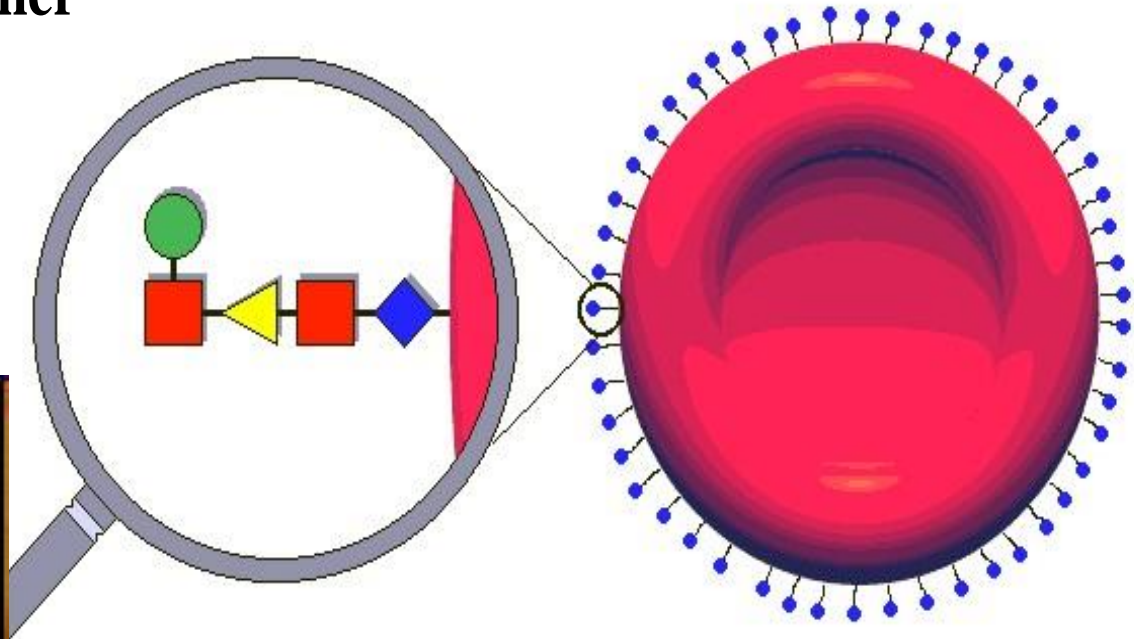
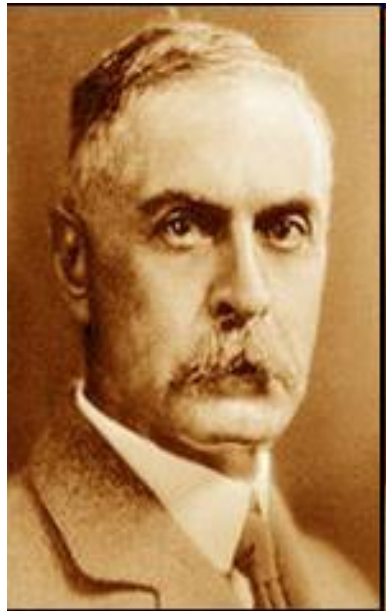
= jeden z největších objevů v historii medicíny

- umožnilo rozvoj transfuzní medicíny
- a tím i všech oborů, závislých na hemosubstituci
- velký význam i pro fetální medicínu



1901

Karl Landsteiner



1. systém krevních skupin

.... 2 antigeny

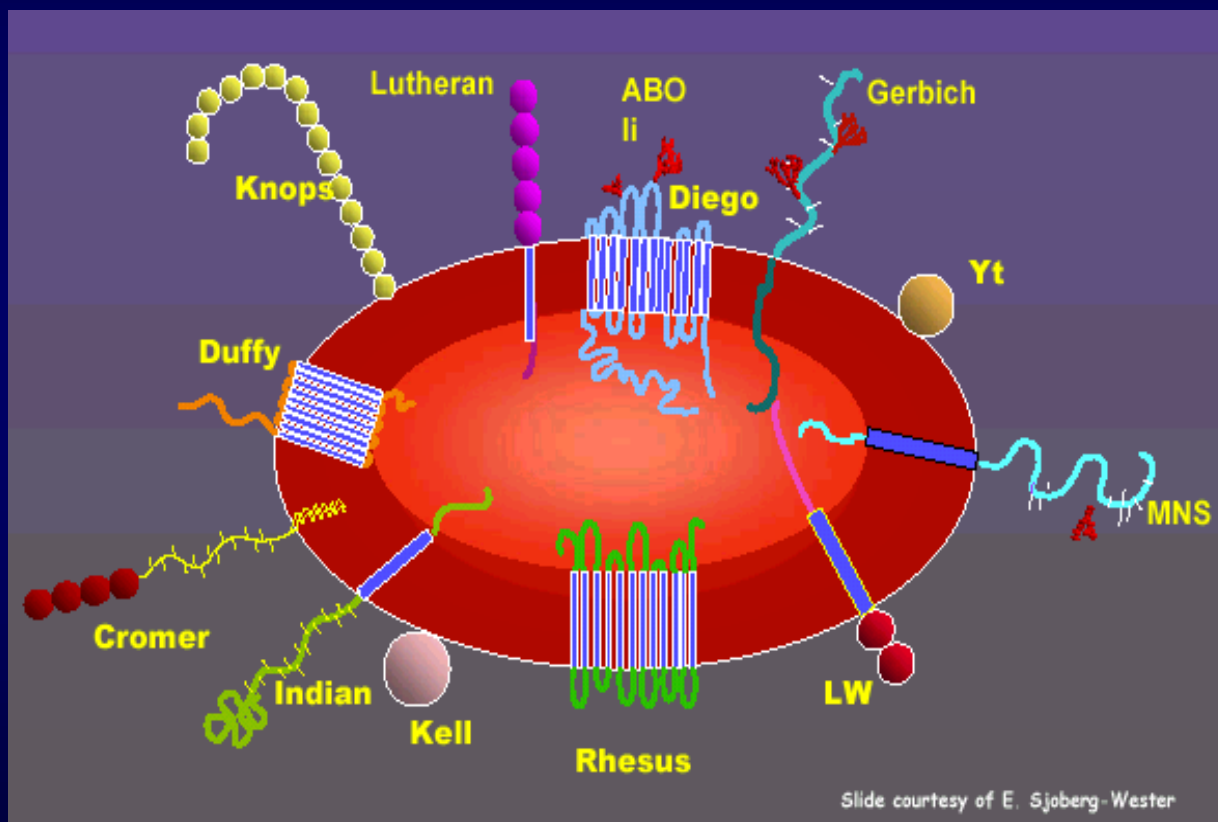
.... 3 fenotypy

2014



349 antigenů

- 35 systémů
- 5 kolekcí
- 16 LFA
- 6 HFA



Definice pojmů

- **Antigen**

= sacharidová nebo proteinová struktura membrány, definovaná lidskou protilátkou

- **Krevní skupina ... různý význam dle kontextu**

= “laicky“ vlastnost v systému ABO a RhD

= obecně též jako synonymum pro antigen

- **System krevních skupin**

= soubor fenotypů, definovaných lidskými protilátkami, se známou biochemickou podstatou, chromozomální lokalizací a sekvenovaným genem

- **Kolekce**

= soubor příbuzných antigenů, částečně definovaných, ale nesplňujících všechny kritéria systému

- **Série ... antigeny nepatřící do systémů ani kolekcí**

- 700: LFA = incidence méně než 1% v populaci

- 901: HFA = incidence více než 90% v populaci

Co je imunohematologie ?

- základní kámen transfuzní medicíny a všech ostatních oborů používajících transfuzní substituční léčbu

Co vyšetřuje imunohematologie:

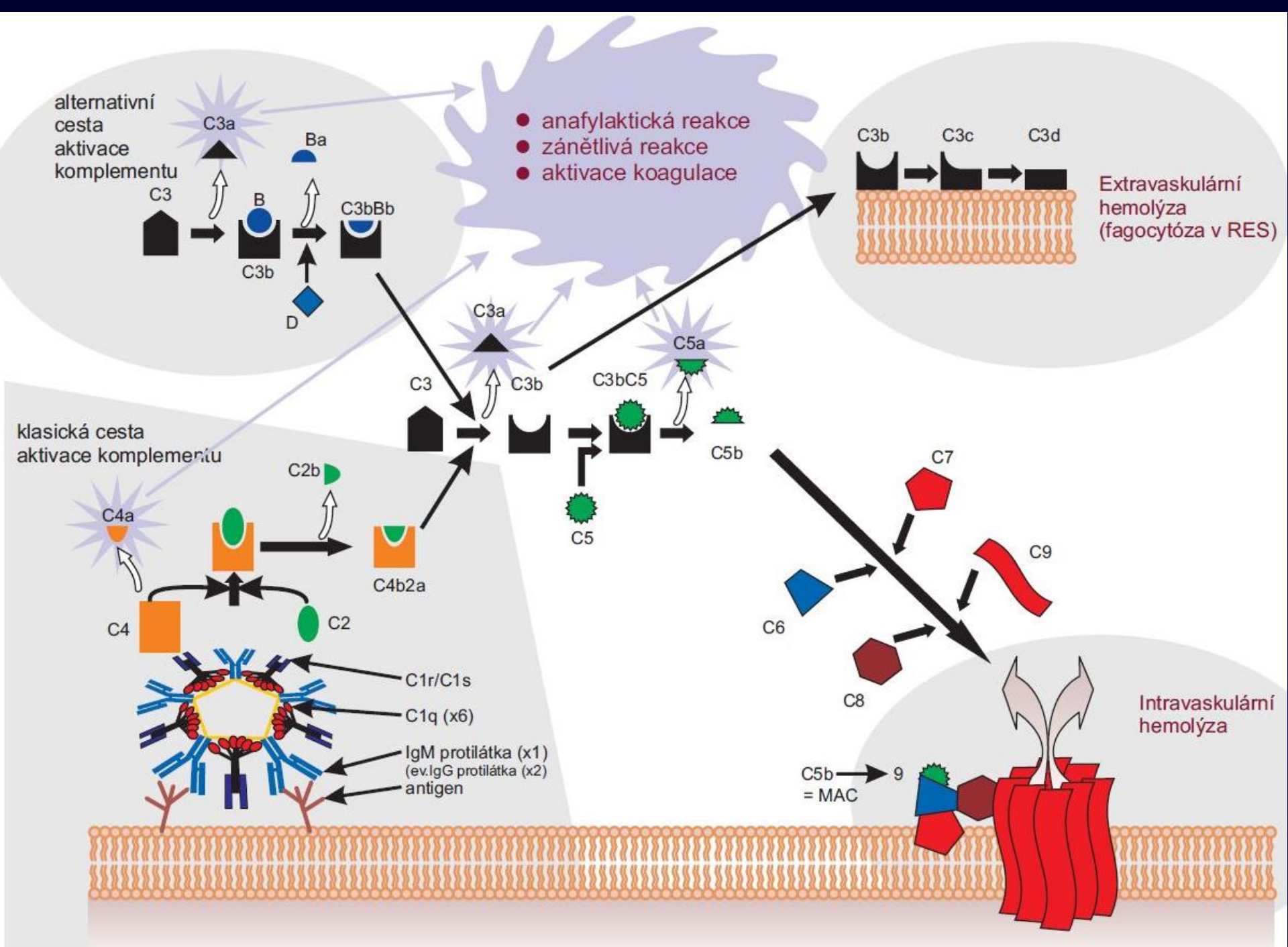
- antigeny a protilátky a související procesy (aktivace komplementu, hemolýza)

Proč se tato vyšetření dělají:

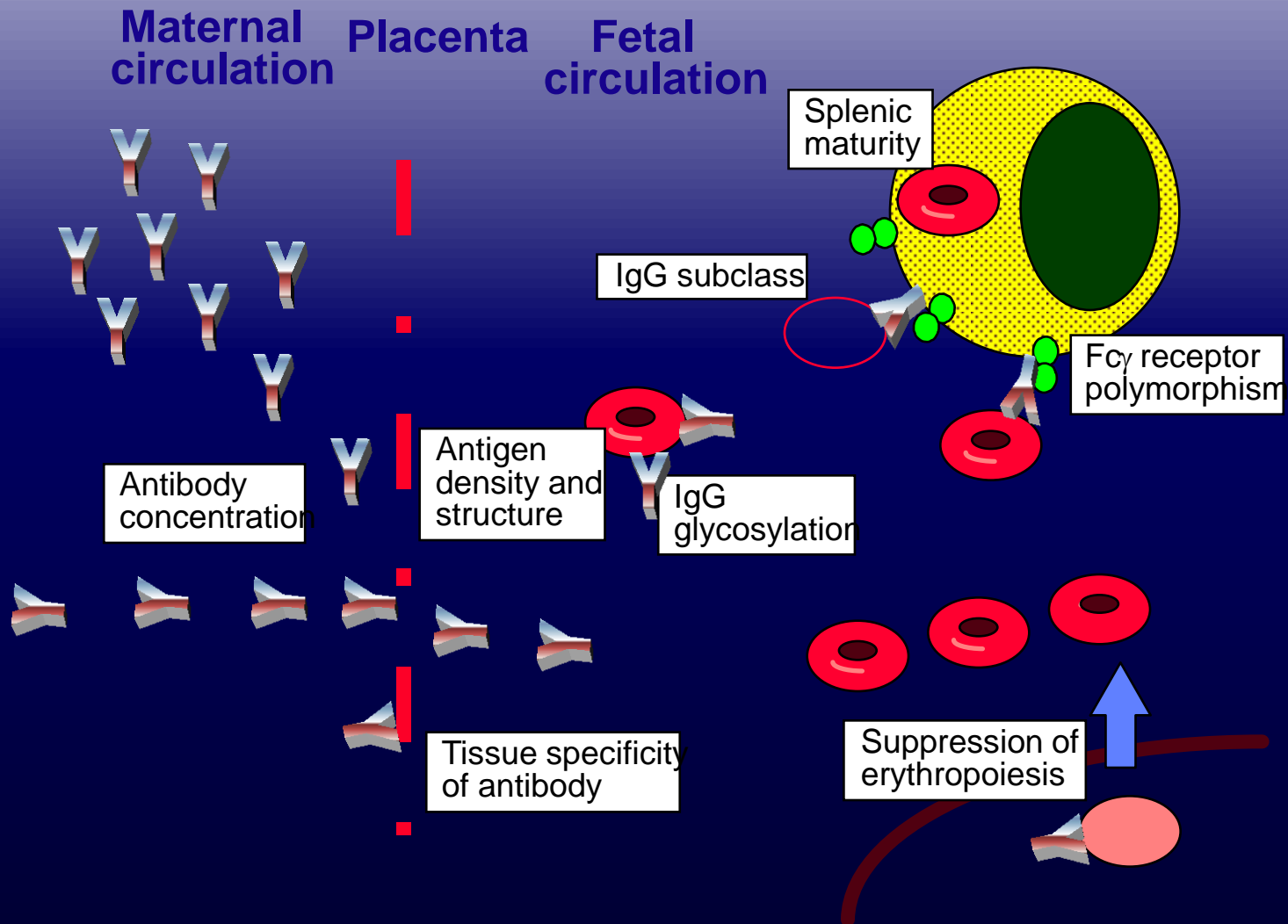
- aby se zabránilo nežádoucím účinkům transfuze (potransfuzní hemolytické reakce, aloimunizace)
- aby se prokázaly a léčily netransfuzní protilátkami způsobené patologické stavy (HON, AIHA)

Nežádoucí imunohematologické účinky transfuze krve

- Akutní potransfuzní hemolytická reakce
 - ...intravaskulární hemolýza
 - ...vážné klinické projevy /šok, renální selhání, DIC, aj./
 - ... hlavní příčina: ABO inkompatibilita
- Pozdní potransfuzní hemolytická reakce
 - ... extravaskulární hemolýza
 - ... hlavní příčina: aloprotilátky proti antigenům erytrocytů transfuzního přípravku /jiným než AB0/
- Aloimunizace proti antigenům erytrocytů
 - ... nebezpečí pro další transfuze a těhotenství



IgG – extravaskulární hemolýza



- **Transfuzní „prehistorie“:**

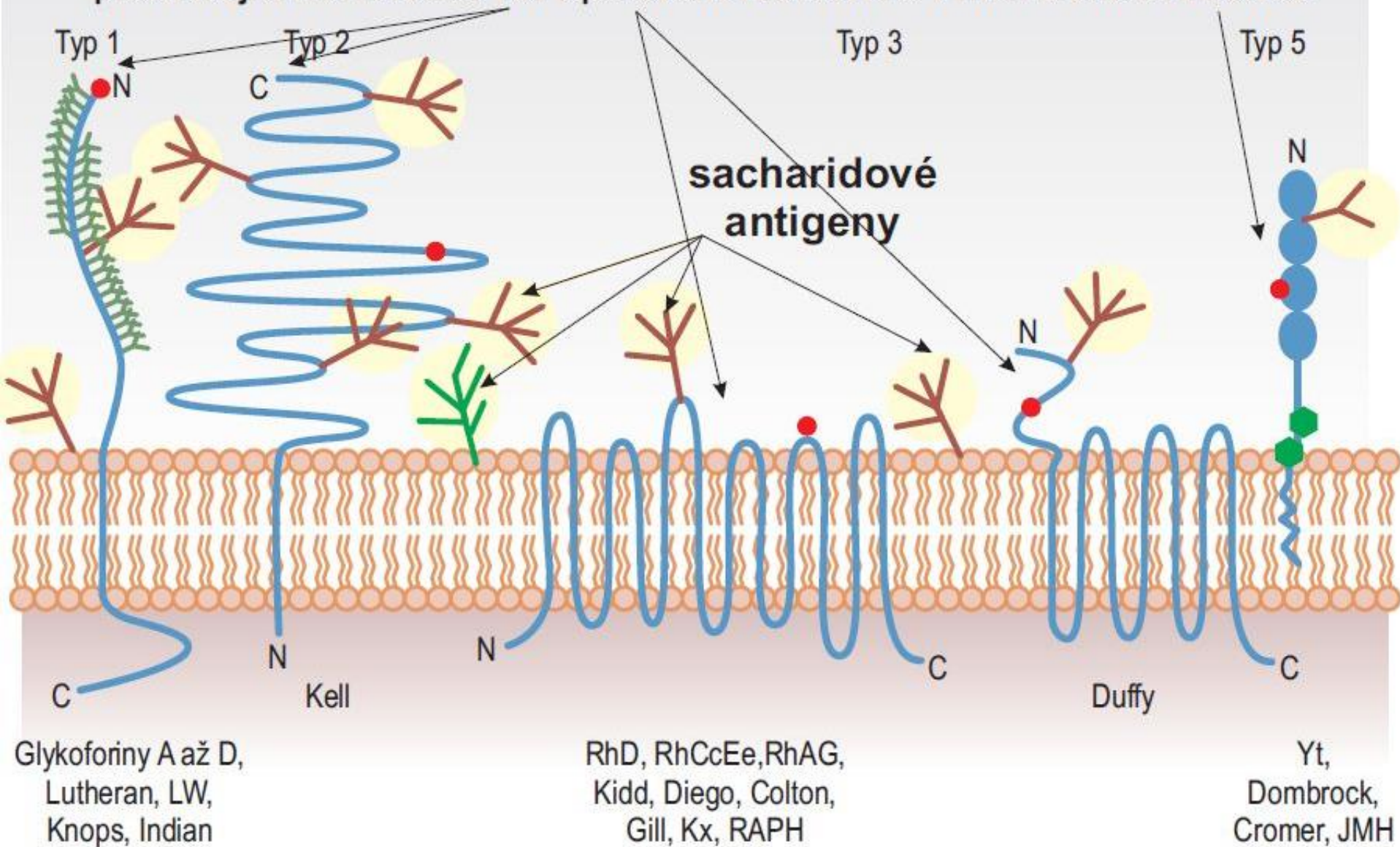
- životodárná vlastnost krve známa od „pradávná“
- potřeba doplnění krevních ztrát evidentní již ve starověku
- pokusy o krevní substituci měly mnoho „otazníků“ :
 - KUDY doplnit krev? ... pítí krve? **NE!** koupele v krvi? **NE!**
 - Cestu ukázal objev krevního oběhu (W.Harvey 1616)
 - První doložený krevní převod – mezi dvěma psy z krční tepny jednoho zvířete „oživil“ vykrváčené druhé zvíře (R.Lower, Oxford, 1665)
 - První doložená transfuze u člověka – 1667: Jean Baptiste Denis (lékař Ludvíka XIV.) ... jehněčí krev... **další pokusy neúspěšné, v XVII. století pokusy s transfuzemi zakázány**
 - „renezance“ transfuze lidské krve – XIX. století – úspěšné transfuze u poporodního krvácení – 1819 – James Blundell (fyziolog a porodník) ... **přesto stále nepředvídatelné katastrofické neúspěchy ... akutní hemolytické reakce po transfuzi inkompatibilní krve („ruská ruleta“)**





proteínové antigeny

procházející membránou 1x / opakovaně / zakotvené v membráně GPI kotvou



Klinický význam krevních skupin

- je dán protilátkami proti jednotlivým antigenům
- protilátky mohou působit destrukci erytrocytů s daným antigenem /transfundovaných, fetálních/
- tím ohrožovat zdraví /i život/ příjemce, event. plodu
- naštěstí ne všechny protilátky jsou nebezpečné
 - Rh systém /57 antigenů/:
 - cca 15% s potenciálem těžkých HTR/HON
 - cca 40% působících mírné HTR/HON
 - ostatní - dosud bez prokázaných HTR/HON
 - MNS systém /46 antigenů/:
 - cca 20% s potenciálem těžkých HON, 10% HTR
 - cca 10-15% působících mírné HTR/HON
 - ostatní - dosud bez prokázaných HTR/HON

Milníky imunohematologické historie

- I. milník: **Objevení ABO systému**
 - K vlastnímu využití objevu došlo až po několika letech (R.Ottenberg v roce 1911)
 - Následně (do 40.let 20.století) byla zajišťována kompatibilita transfuzí
 - na základě znalosti ABO skupiny dárce a příjemce
 - a na základě mísení krví dárce a příjemce a pozorování aglutinace či hemolýzy
 - Tehdy objeveny jen některé další antigeny (kde se vyskytují hlavně IgM protilátky (MNSs, Lewis,P)

Prevence fatálních akutních potransfuzních hemolytických reakcí z ABO inkompatibility

Milníky imunohematologické historie

- II. milník: **Objevení Rh systému**
 - 1939 – Levine a Stetson (kazuistika anti-D HON a HTR)
 - 1940 – Landsteiner a Wiener (imunizace morčat krví makaků)
 - Prevence anti-D imunizace a HON

- III. milník: **Testy detekující IgG protilátky**
 - 1945 – antiglobulinový test (Coombs)
 - 1947 – enzymový test (Morton a Pickles)
 - 1974 – LISS pro intenzifikaci vazby IgG
 - Prevence pozdních potransfuzních hemolytických reakcí (extravaskulární hemolýzy u aloprotilátkové inkompatibility)

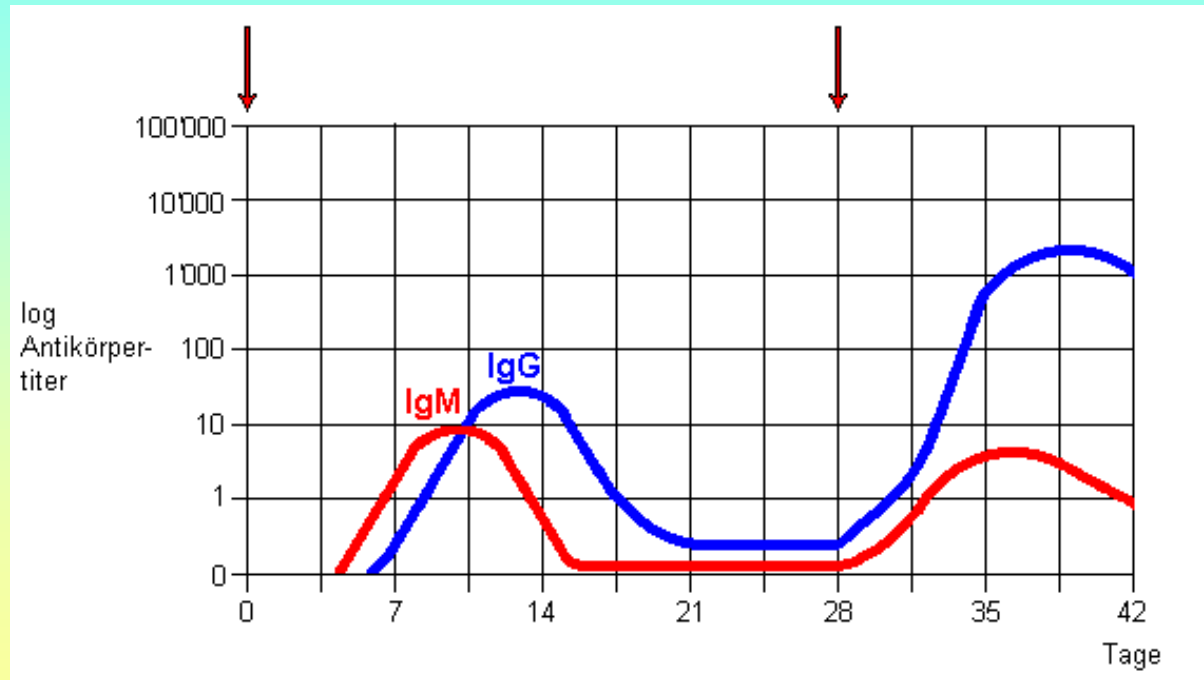
Milníky imunohematologické historie

- IV. milník: Citlivější a „robustnější“ testy
 - 1980 – polybrenový test (Lalezari a kol.)
 - **1984 – pevná fáze (Plapp a kol.)**
 - 1987 – PEG (NANCE, Garratty)
 - **1990 – sloupcová aglutinace (Lapierre a kol.)**
 - Prevence pozdních hemolýz u slabších protilátek
- V. milník: Automatizace testů – konec 20.století
 - Snaha o minimalizaci subjektivních chyb
 - Zvýšení kapacity laboratoří – centralizace
 - Ulehčení lidské práce
 - Zvýšení bezpečnosti a komfortu práce

Primární a sekundární protilátková odpověď

První expozice antigenu

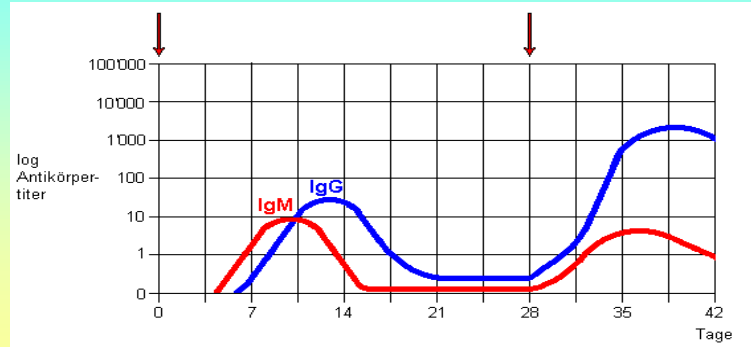
Druhá expozice antigenu



Primární a sekundární protilátková odpověď

První expozice antigenu

Druhá expozice antigenu



ABO – primární odpověď „přirozená“: reakce na Ag zevního prostředí

RhD – prevence primární odpovědi: jde o nejvíce imunogenní Ag

Ostatní antigeny – prevence sekundární odpovědi

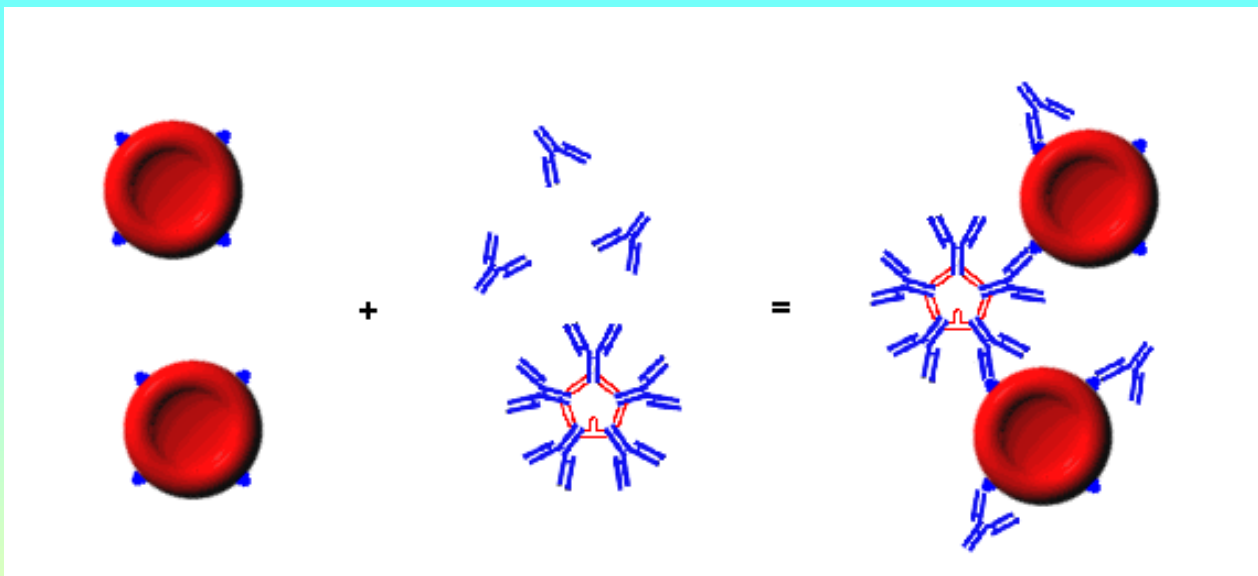
Vyšetřovací metody v imunohematologii erytrocytů

- serologické testy
 - detekce protilátek v séru
 - detekce erytrocytárních antigenů (fenotyp)
- DNA techniky - stanovení genotypu

Serologické testy

- solný test (reakční prostředí = fyziologický roztok)
 - IgM protilátky
- Coombsův test
 - IgG protilátky
 - reakce s AGH = anti-IgG + anti- C3d
 - přímý
 - nepřímý
- enzymový test

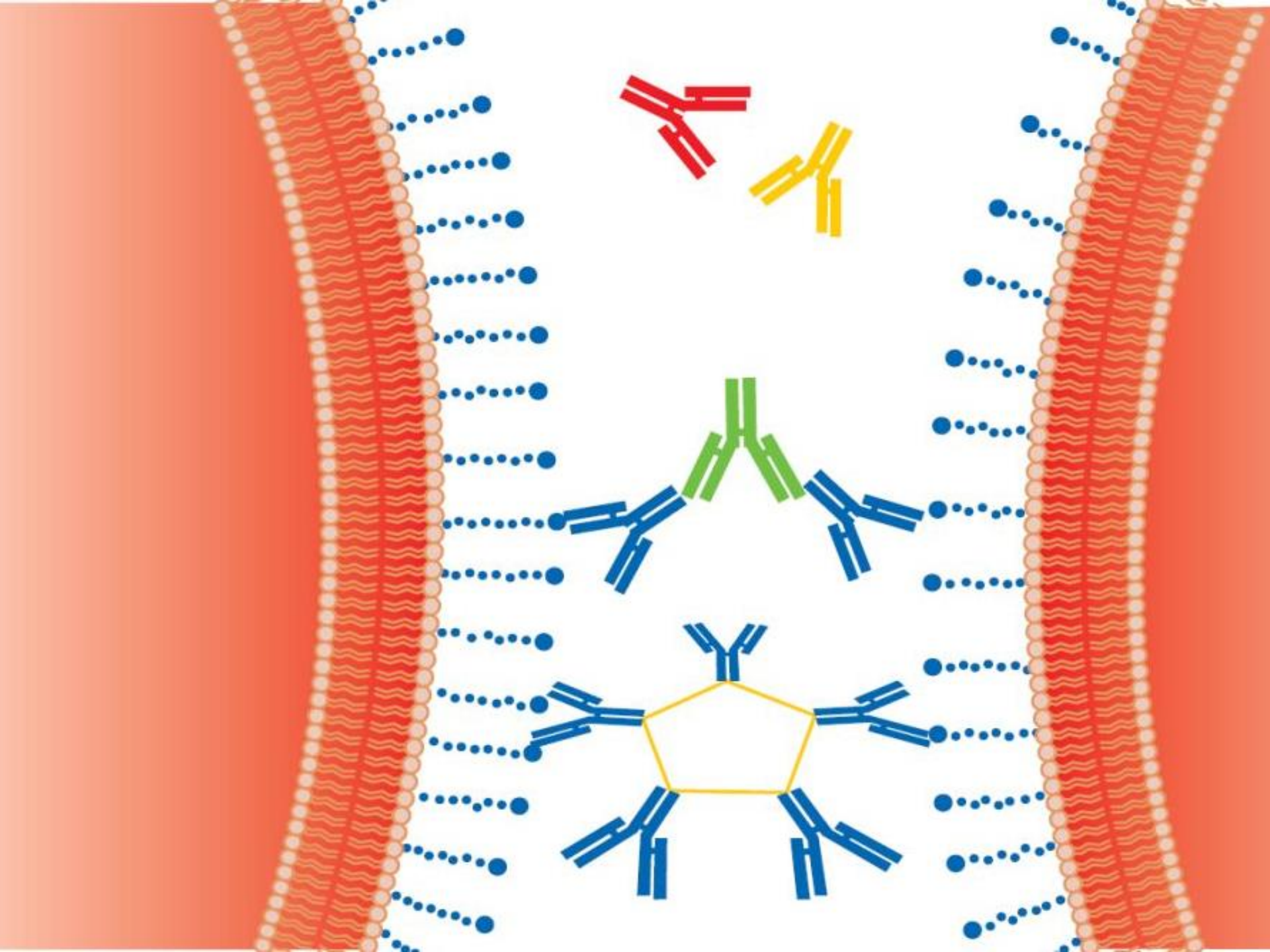
Reakce antigenu s protilátkou



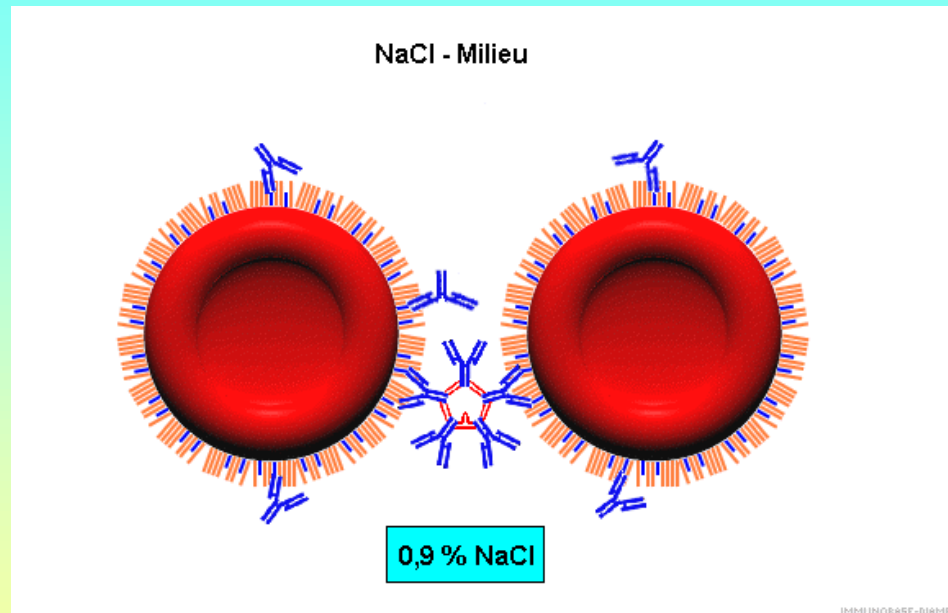
Erythrocyt s antigenem

Protilátka proti antigenu

- vazba na erythrocyt
- aglutinace erythrocytů
- ev. aktivace komplementu



Solný test





2



4



8



16



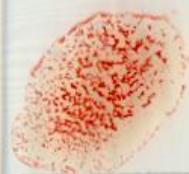
32



64



128



256



512



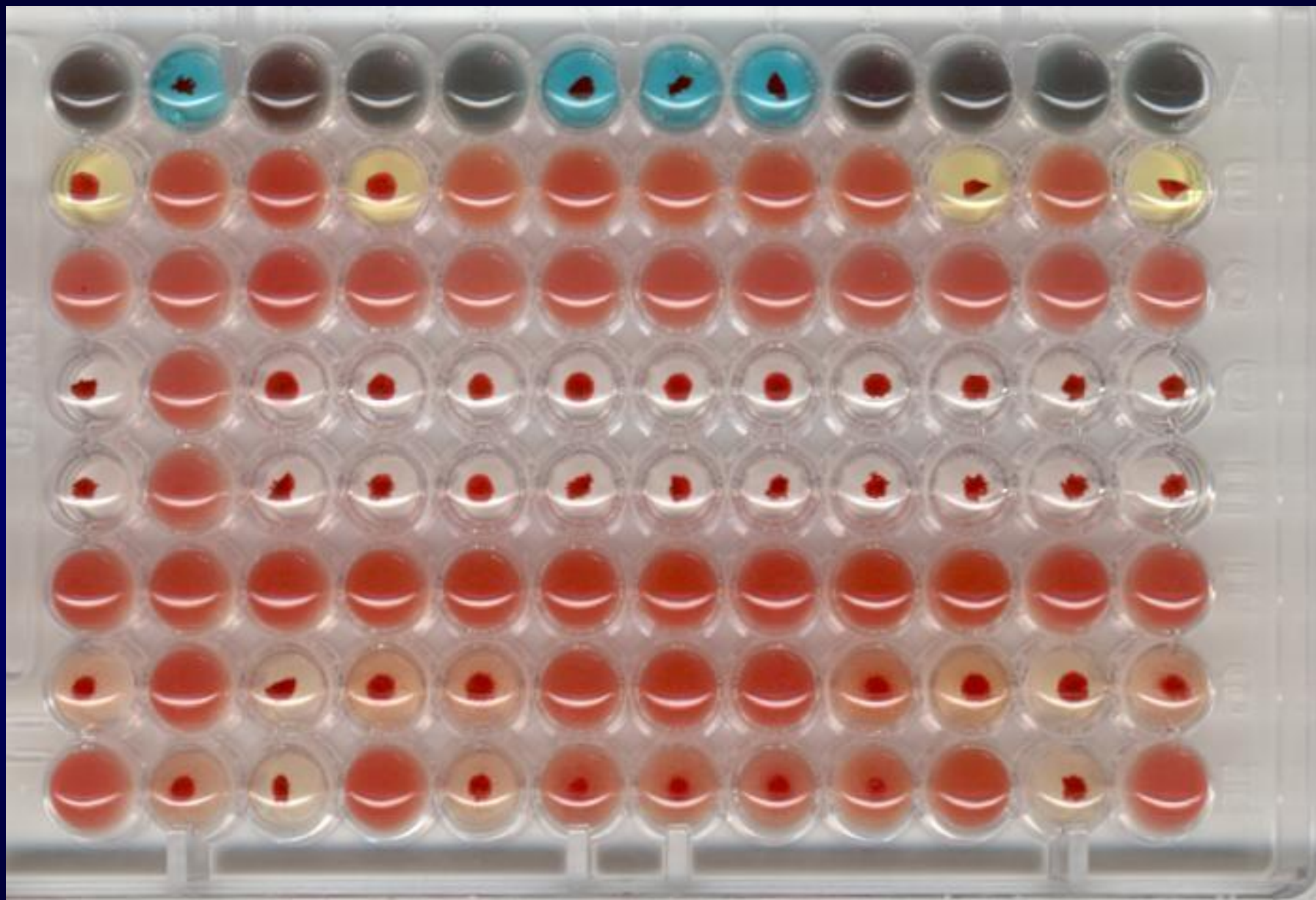
1024



2048

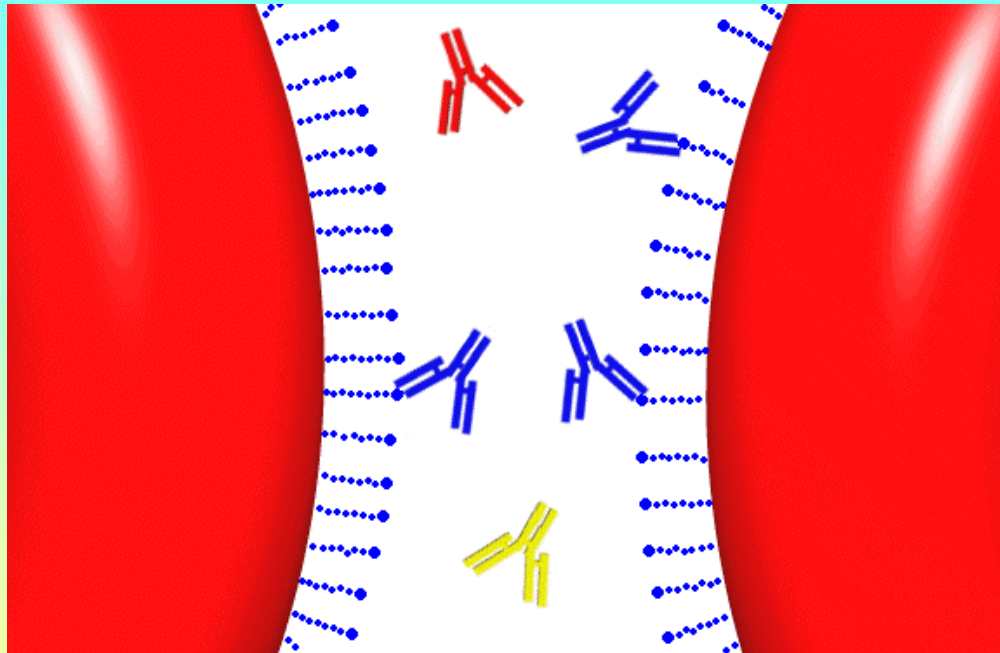


4096



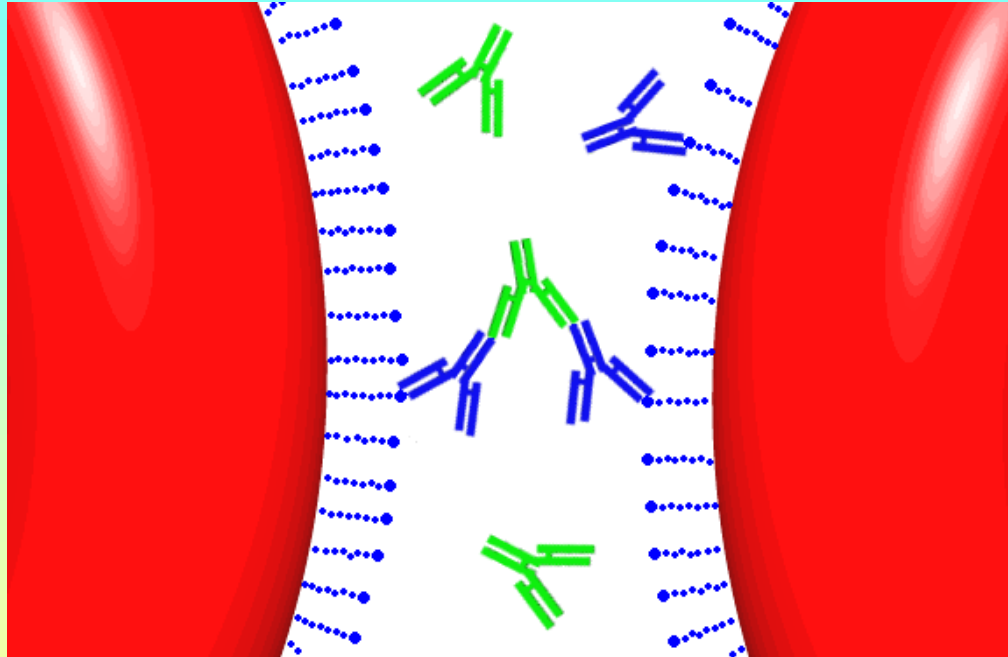
Nepřímý Coombsův test (NAT) - princip

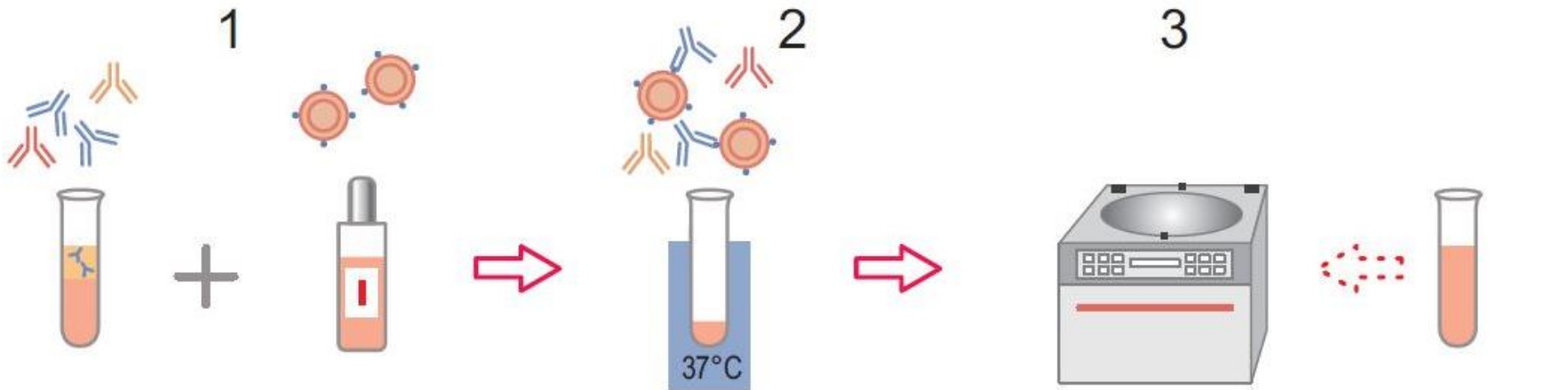
2



Nepřímý Coombsův test (NAT) - princip

4





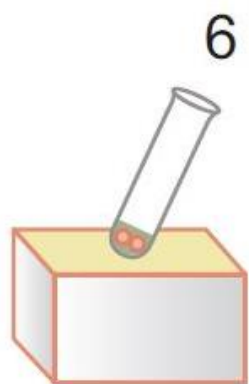
a) sérum / plasma
b) monospecifické
diagnostické
protilátky

a) diagnostické erythrocyty/
erythrocyty přípravku
b) erythrocyty k typování
antigenů

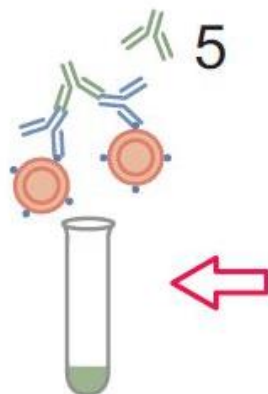
Inkubace

promytí x3

Erythrocyty
pacienta / novorozence



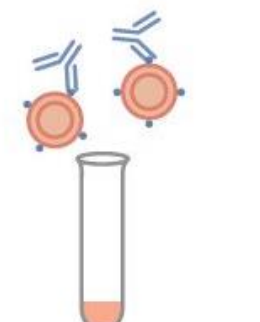
Resuspenzace,
vyhodnocení +/-



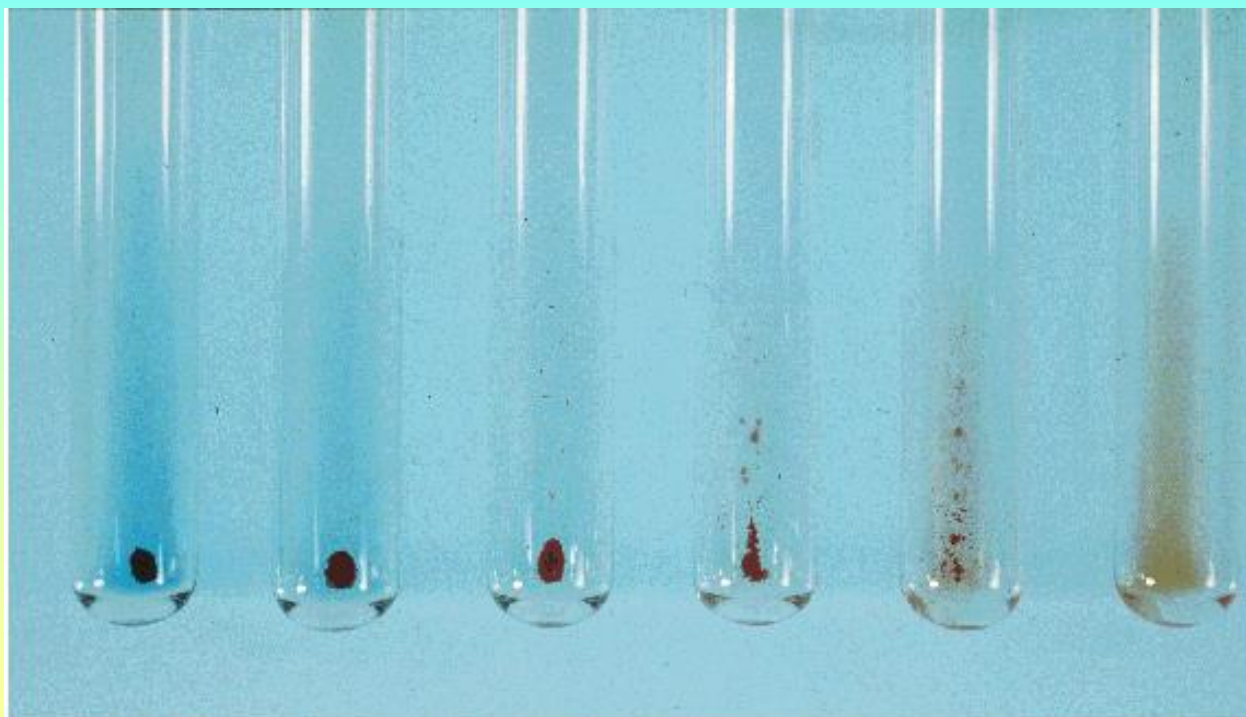
centrifugace →
aglutinace



přidání
antiglobulinového
diagnostika



Zkumavková technika



Erythrocyty Erythrocyty protilátky

a) neutrální gel
– kontrola validity testu

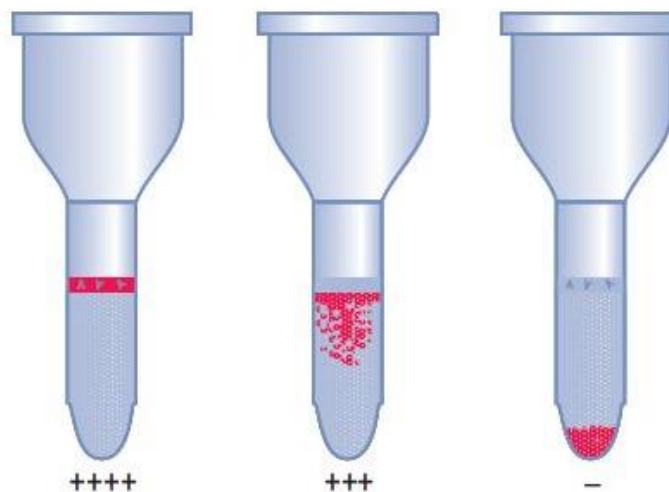
a) neutrální gel
– enzymový test
– test přímé aglutinace

b) gel se specifickými protilátkami
– určování antigenů (anti-A, B, D atd.)
– přímý antiglobulinový test (anti-IgG, -C3d atd.)

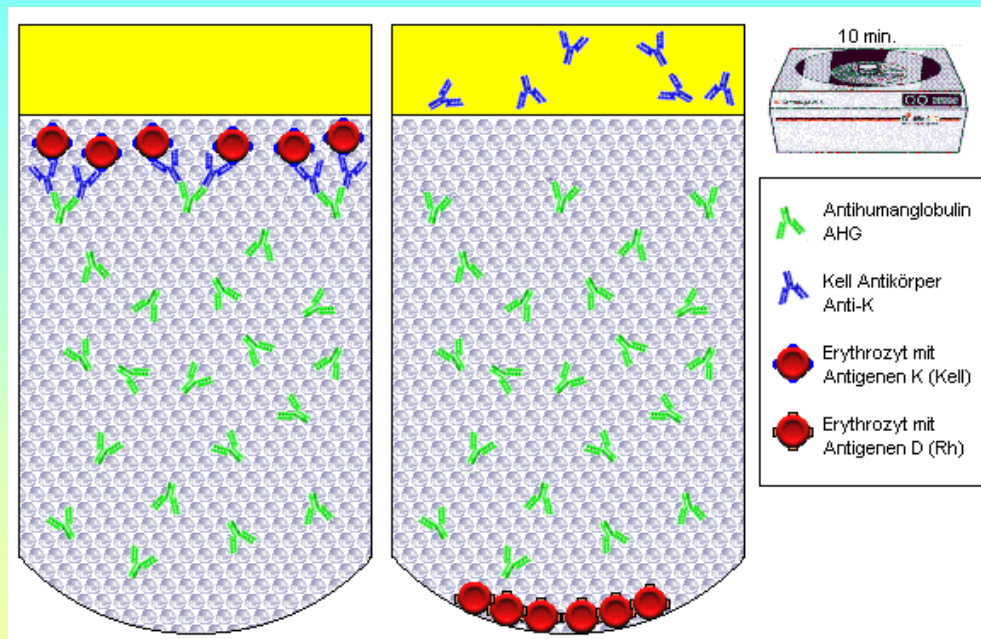
b) gel se specifickými protilátkami
– nepřímý antiglobulinový test

gelový sloupec

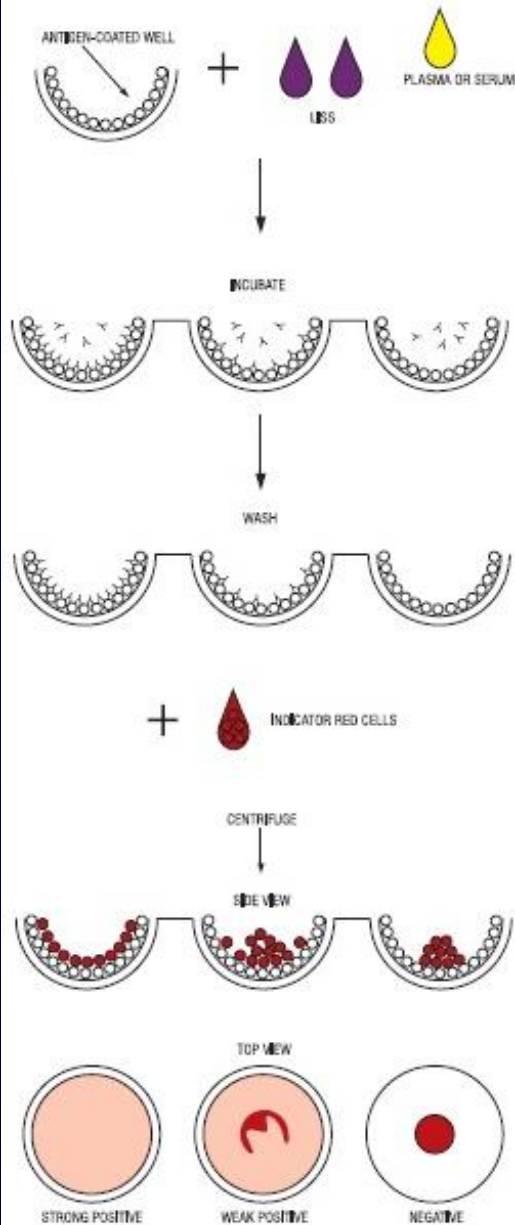
centrifugace



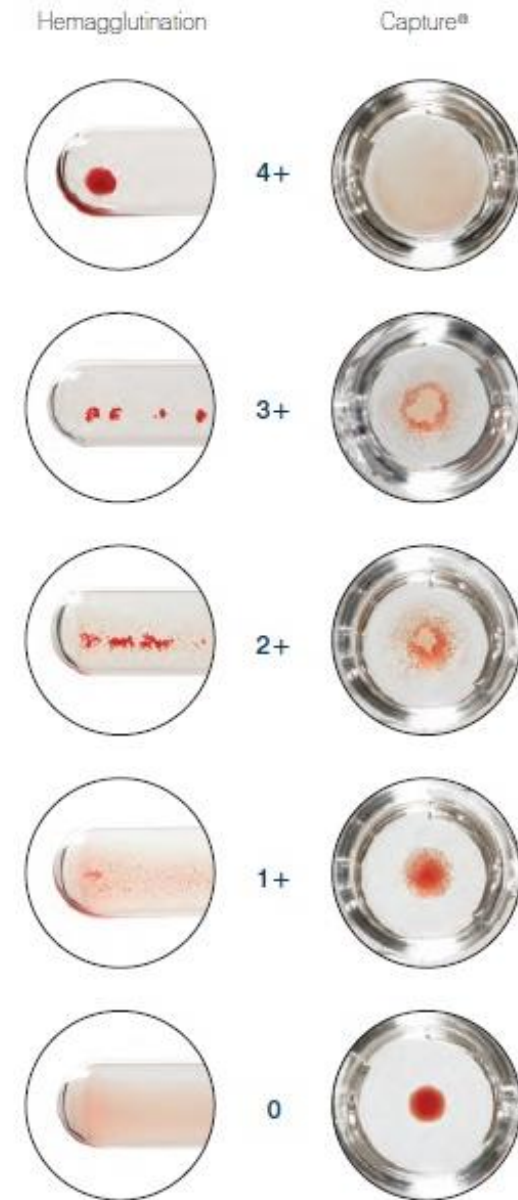
Nepřímý Coombsův test gelovým testem



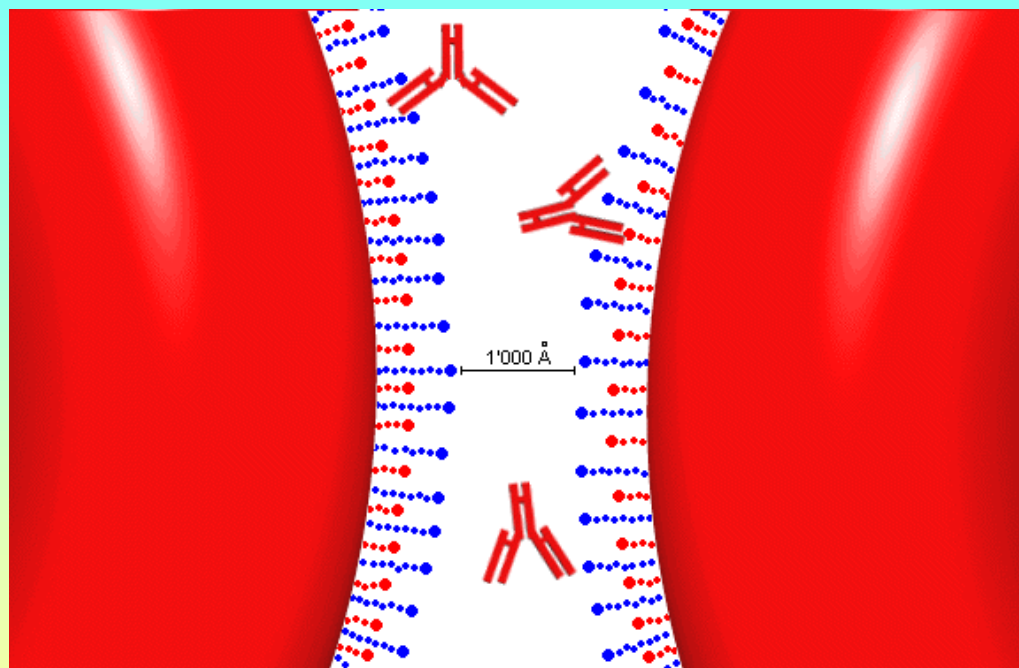
Test Procedure



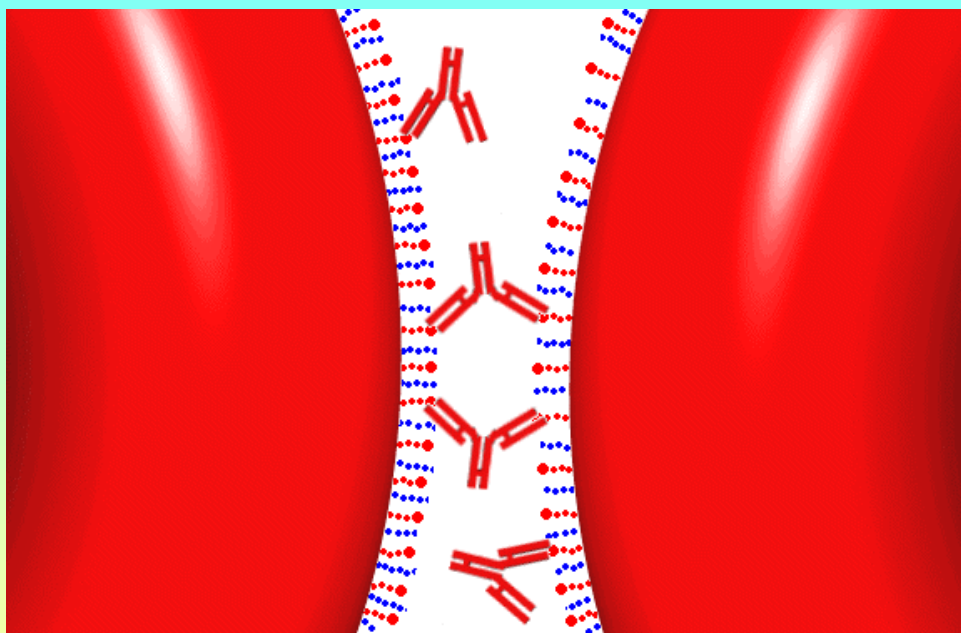
Grading Chart



Enzymový test - princip 2



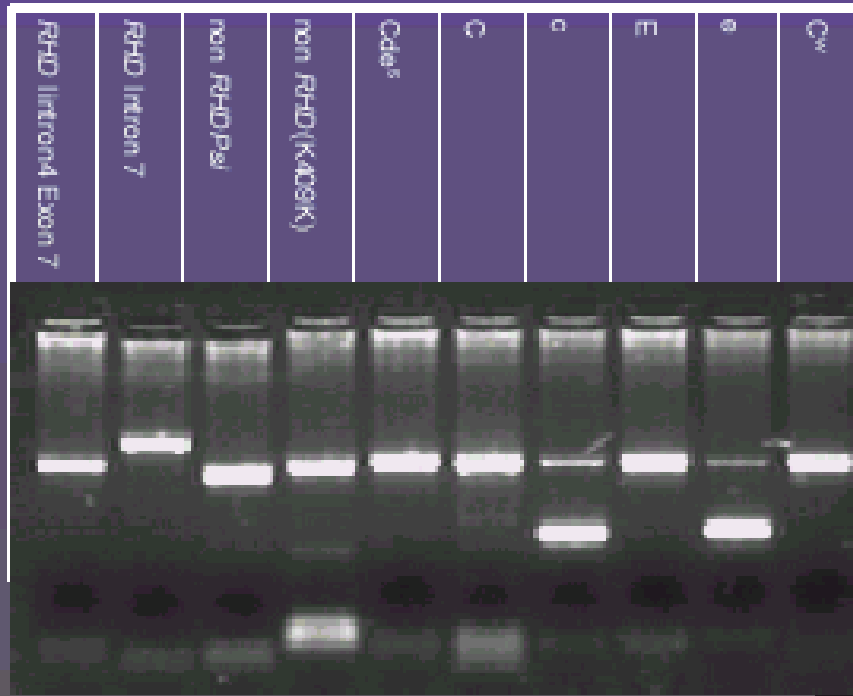
Enzymový test - princip 5



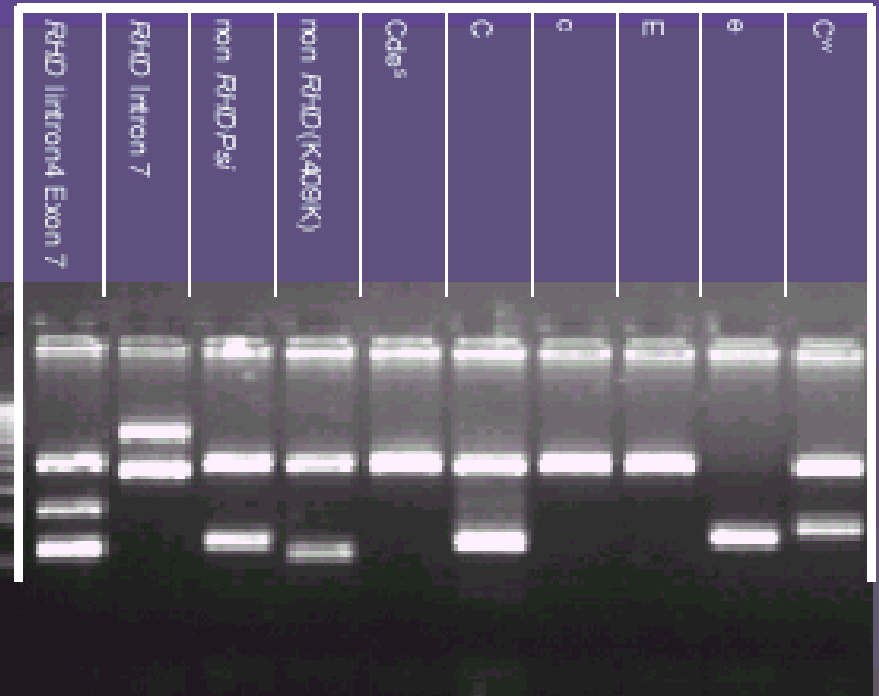
Současně dostupné PCR kity

- INNO-TRAIN (dodává IMUMED) a BAG
 - AB0-SSP /vzhledem k velké variabilitě AB0 genů nepříliš užitečné/
 - CDE-SSP /detekce CcEeCw (SNP) a D včetně nejčastějších variant (exon-scanning + SNP)
 - weak-D-SSP (SNP pro nejčastější typy D weak)
 - „little“-D-SSP (test na D zygozitu – detekce Rh-boxu)
 - KKD-SSP, MNS-SSP, HPA-SSP (SNP pro dané alely)
 - stejné podmínky pro všechny reakce
 - v inovovaných kitech některé reakce „multiplexové“
 - **registrovány jako IVD, mají CE značku ... je tedy možné je používat jako plnohodnotná diagnostika**

RH-TYPE PCR-SSP



ccddee



CC^wD.ee

BAGene

Multiparametrové genotypování

- Snaha z jednoho vzorku jedním kitem získat co nejvíce informací
- Shodný postup aplikovatelný na série vzorků
- Do budoucna možnost automatizace

- Princip microarrayí
 - na sklíčku přímo navázené próby (BloodChip)
 - próby na jednotlivých mikrokuličkách, z nich potom složena array (flexibilnější, BeadChip)

CLB (Sanquin)



Amsterdam,
Netherlands

Rotterdam,
Netherlands



Lund, Sweden

Dreieich, Germany



Bristol, UK
(UWE
and BITS)



Ulm, Germany



Derio, Spain



Prague,
Czech Republic



EU Bloodgen
Consortium

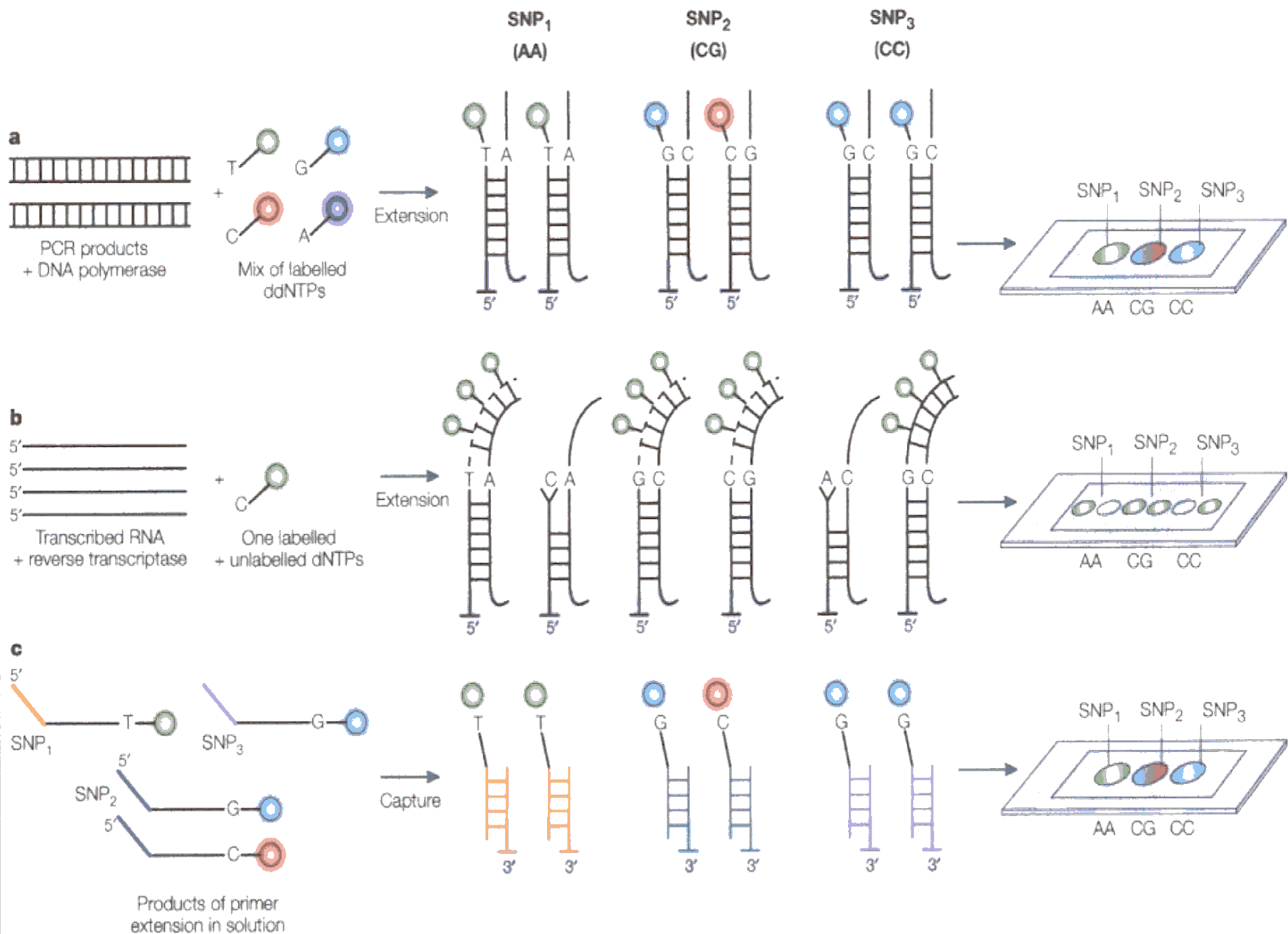


Barcelona
Spain

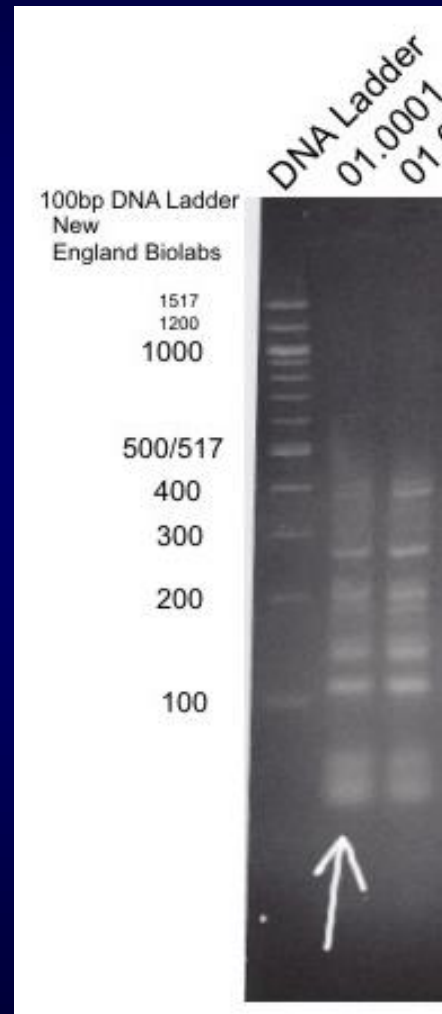
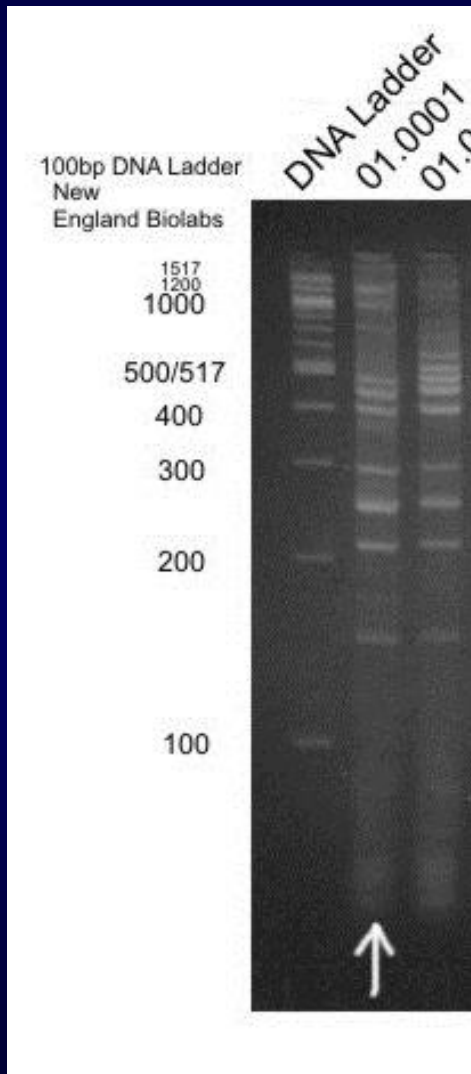


Bloodchip Specifications

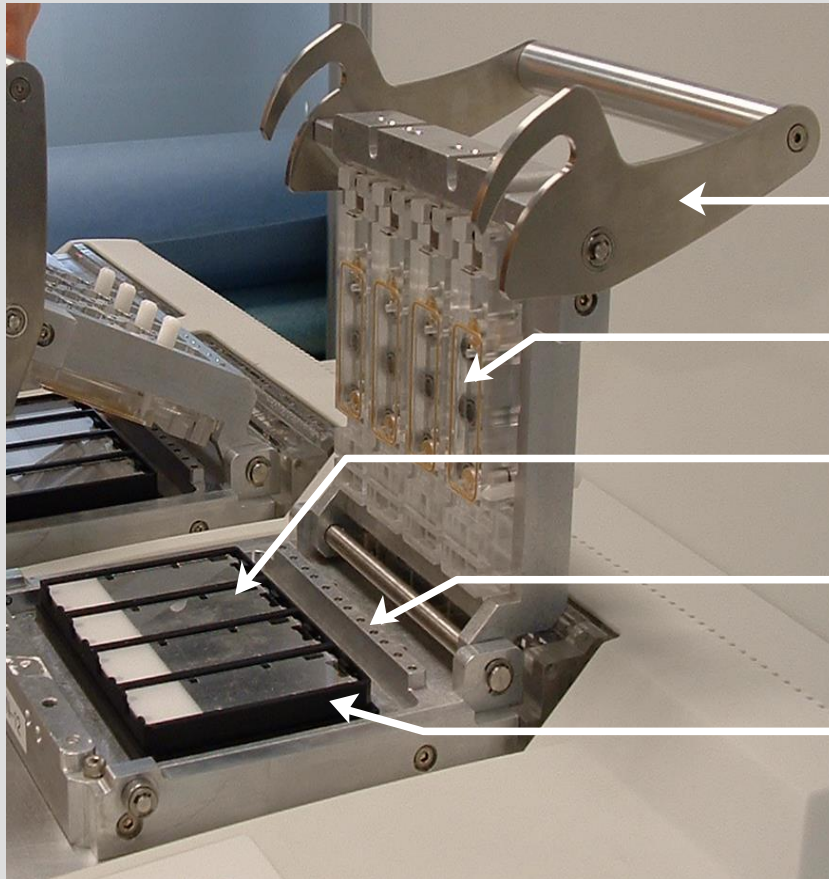
Number of Arrays	1
Number of Subgrids	
32	
Array Size	25 x 40
mm	
Oligo Length	19-27
mer	
SNPs	116
Background control	
88 spots	
Oligo replicates for each mutation	
40 spots	
Total number of spots	6408



Two separate PCR reactions I (ABO and RHD) and II ("the rest of antigen groups").



Hybridization Module



Closing mechanism

Hybridization chambers

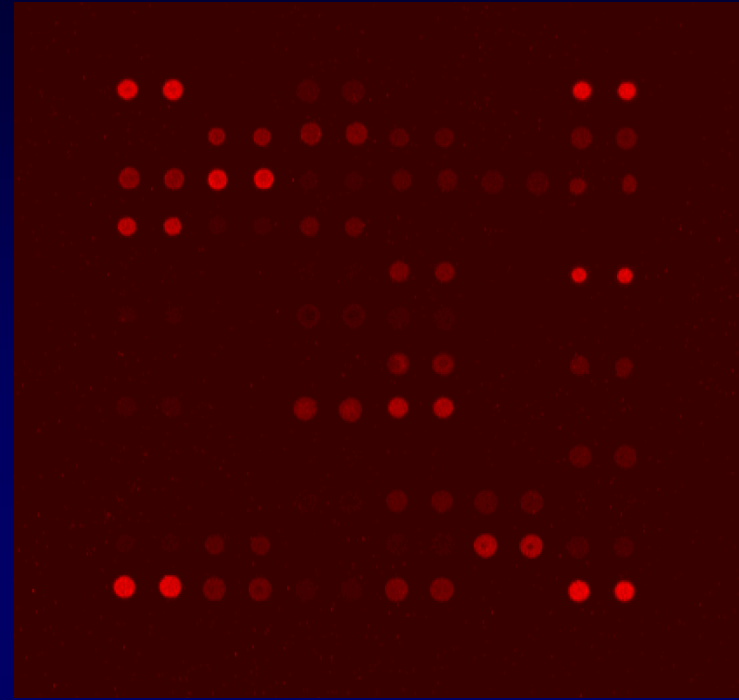
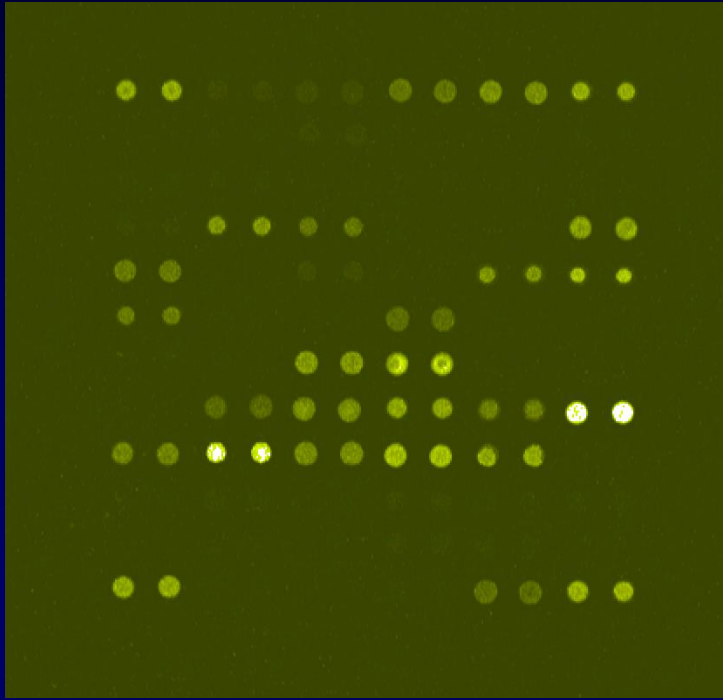
Incubation block (4 – 85°C)

Fluid connections

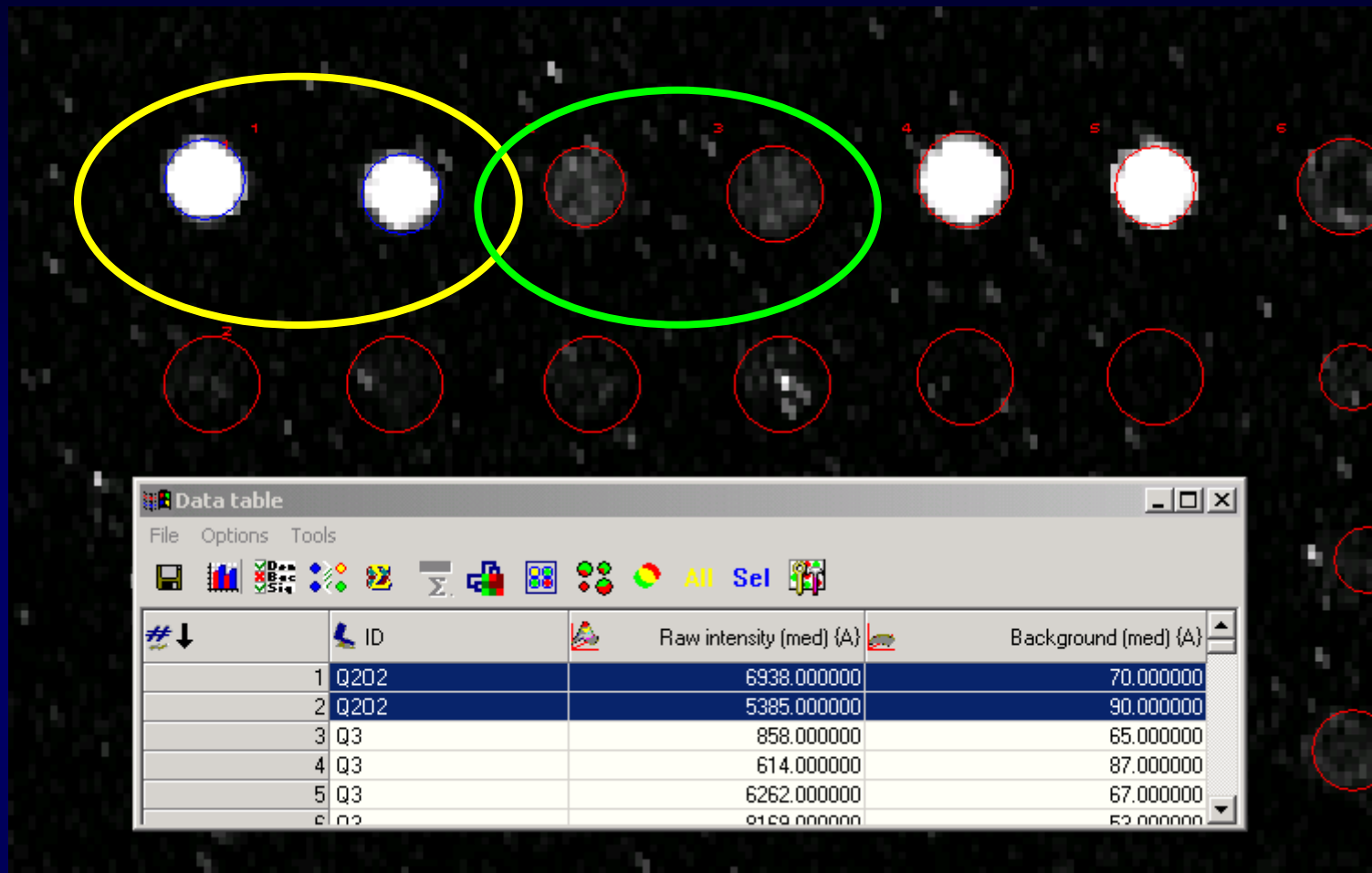
MTP format slide holder for
4 slides

Tecan LSX00 Scanner



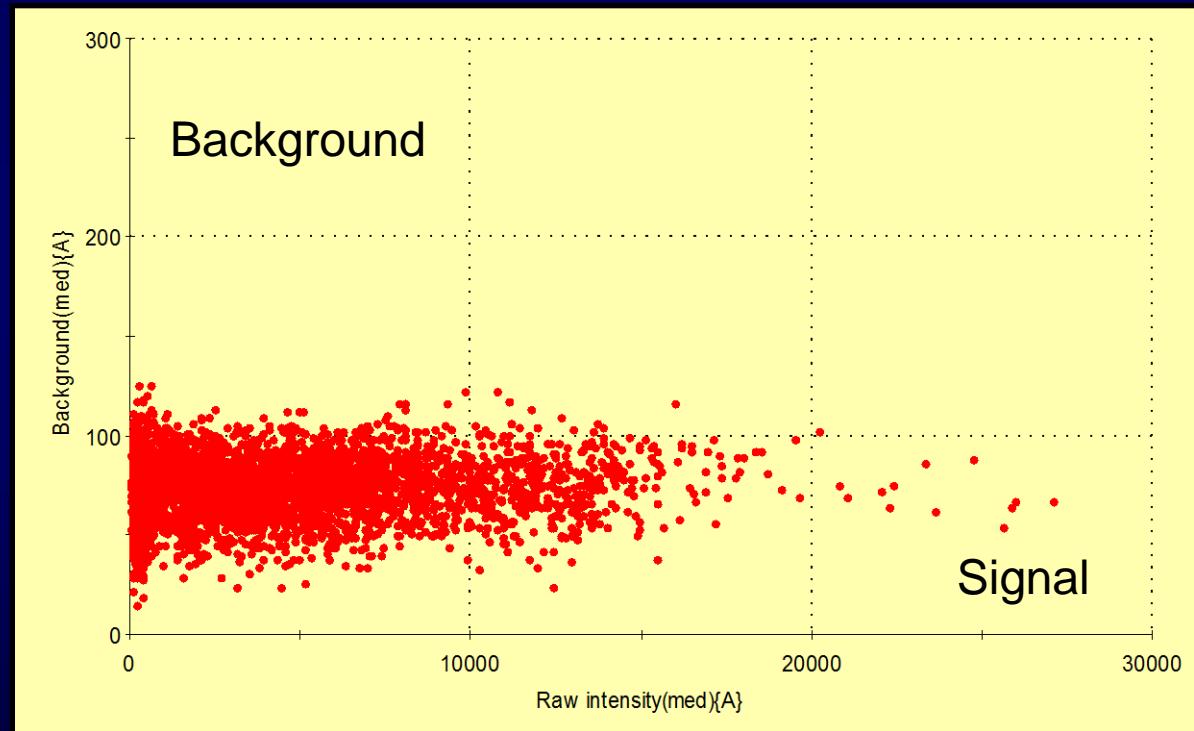
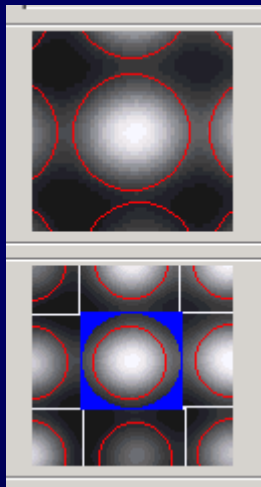


The PCR products are fragmented and labelled separately with two different reagents (Cy-3 and Cy-5 respectively) to allow the distinction between RHD and RHCE



An external control has been included to verify that the hybridisation has been performed correctly. This control will also help to place correctly the spot quantification grid. The chip also includes background hybridisation controls, which consist of spots containing solvent alone (50% DMSO) to allow the determination of background hybridisation.

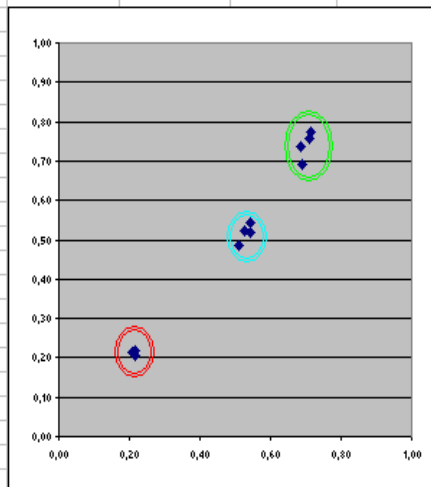
Labelled PCR products will be applied to the microarray surface for hybridisation. Confocal scanner detects the bound DNA as fluorescence is emitted by the fluorophores upon excitation with a laser beam.



M(C),N(T)

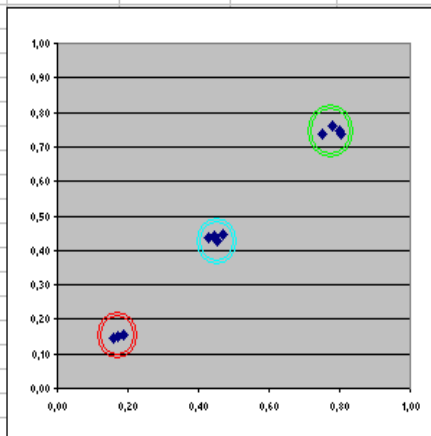
MNSCS9 allelic variant 1
 MNST59 allelic variant 2

	Rene ZWN	6043 OV 302457	Tim T ZWN	04-126RdB 297	6044 SD 32431	Patrick ZWN	3K1K1	02-133 MB 296	02-53 JD 2947458	02-253 AW 2974	Val 39 ZWN
	N	N	N	MN	MN	MN	MN	M	M	M	M
BC084002	0,21	0,21	0,22	0,53	0,54	0,54	0,51	0,71	0,72	0,69	0,69
BC084008	0,22	0,21	0,21	0,52	0,52	0,54	0,49	0,76	0,77	0,74	0,69
	allelic variant 2	allelic variant 2	allelic variant 2	heterozygous	heterozygous	heterozygous	heterozygous	allelic variant 1	allelic variant 1	allelic variant 1	allelic variant 1

**M(CT),N(AG)**

MNSG71T72 allelic variant 1
 MNSA71G72 allelic variant 2

	Rene ZWN	6043 OV 302457	Tim T ZWN	04-126RdB 297	6044 SD 32431	Patrick ZWN	3K1K1	02-133 MB 296	02-53 JD 2947458	02-253 AW 2974	Val 39 ZWN
	N	N	N	MN	MN	MN	MN	M	M	M	M
BC085004	0,19	0,17	0,16	0,47	0,45	0,45	0,43	0,78	0,80	0,75	0,80
BC085006	0,15	0,15	0,15	0,44	0,43	0,44	0,43	0,76	0,74	0,74	0,74
	allelic variant 2	allelic variant 2	allelic variant 2	heterozygous	heterozygous	heterozygous	heterozygous	allelic variant 1	allelic variant 1	allelic variant 1	allelic variant 1





USERS VALIDATION

User :

Password :

Progenika Biopharma S.A.



BLOODCHIP



Main menu:

[View All Samples](#)
[Enter New Sample](#)
[Logout](#)

BLOODCHIP SAMPLES

Id	Bloodgen Sample	Sample Code	Analyzed File	Action
348	CVX7_0002	51	✓	
617	CVX7_0003	52	✓	
618	CVX7_0004	55	✓	
619	CVX7_0005	56	✓	
620	CVX7_0006	57	✓	
621	CVX7_0007	58	✓	
677	CVX7_0001	control DNArun1	✓	
688	CVX7_0008	control DNArun2	✓	
689	CVX7_0009	64	✓	
690	CVX7_0010	63	✓	
691	CVX7_0011	62	✓	
692	CVX7_0012	61	✓	
693	CVX7_0013	60	✓	
694	CVX7_0014	59	✓	
695	CVX7_0015	control DNArun3	✓	
696	CVX7_0016	66	✓	
697	CVX7_0017	68	✓	
698	CVX7_0018	69	✓	
699	CVX7_0019	70	✓	

Hotovo

Internet

ANALYZED FILE

Id: 800 Sample Code: CVX7_0064 Bloodgen Sample: control DNArun10 Date: 23-08-2006
 File: BC_0.4_170706N_7.txt

	Analyzed File	Serology Result	Coincident
AB0	O1vO1v ==> O	O	Ok
RHD	Apparently non-negative ==> RHD +	RHD +	Ok
RHCE Cx	NO Cx		
RHCE Cw	NO Cw		
RHCE Cc	CC	CC	Ok
RHCE r's	no r's		
RHCE Ee	ee	ee	Ok
RHCE 712ceAR	NO CEar,ek/BI		
RHCE 733VS	NO VS		
KELL Kk697*1Ser193	NO Kk697KEL*1Ser193		
KELL Kk	kk_K2K2	kk_K2K2	Ok
KELL KpA/KpB	KpBKpB_K4K4	KpBKpB_K4K4	Ok
KELL KpC/Kmod	NO KpC,no Kmod-1		
KELL JsA/JsB	JsBJsB_K7K7	JsBJsB_K7K7	Ok
KIDD JkA/JkB	JkAJkA_JK1JK1	JkAJkA_JK1JK1	Ok
KIDD Jknull	NO Jknull		
DUFFY FyA/FyB	FyBFyB_FY2FY2	FyBFyB_FY2FY2	Ok
DUFFY FyGATA/Fyx	NO FyGATA ,FyxFy(b+w)		
MN	MM	MM	Ok
Ss	ss	ss	Ok
U	NO U,IVS5		
GpMur	NO GP.Mur		
DIEGO DiA/DiB	DiBDiB_DI2DI2	DiBDiB_DI2DI2	Ok
DOMBROCK DoA/DoB	DoBDoB_DO2DO2	DoBDoB_DO2DO2	Ok
COLTON CoA/CoB	CoACoA_CO1CO1	CoACoA_CO1CO1	Ok

Av. I/B Ratio:	64.3
Q2 X:	0.68
Q3:	4.76
CV:	0.15

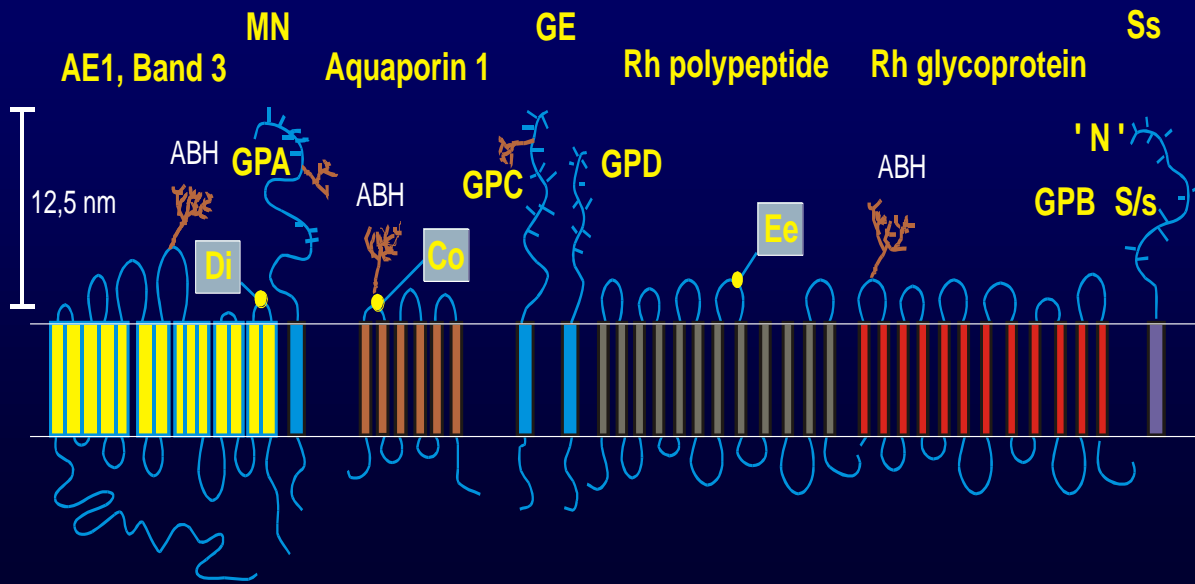
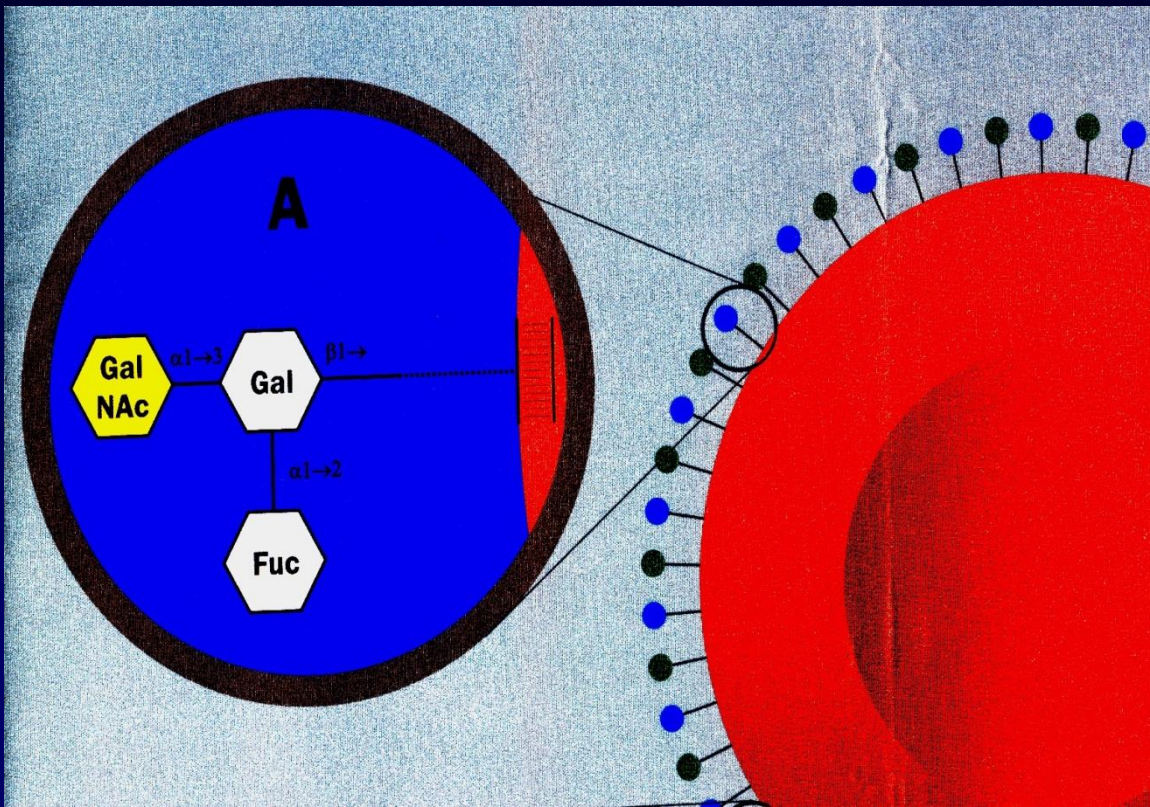
IB RHD:	63.23
RHDEX1:	30.74
RHDEX2:	52.75
RHDEX3:	91.66
RHDEX4:	77.17
RHDEX5:	67.44
RHDEX6:	63.33
RHDEX7:	46.5
RHDEX8:	62.75
RHDEX9:	42.06
RHDEX10:	97.88

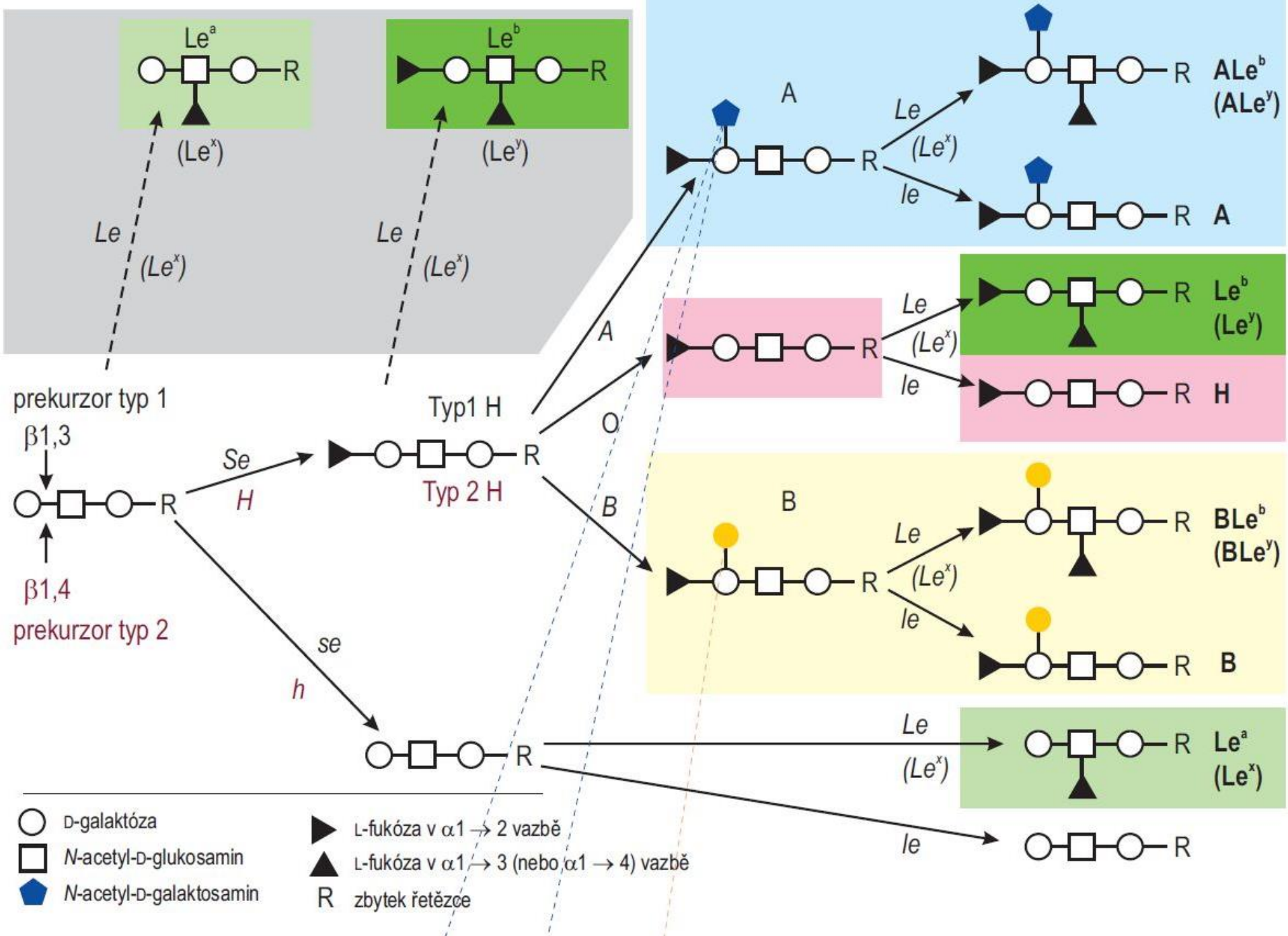
ABO I:	8299.8
ABO B:	147.44
RHD I:	8387.27
RHD B:	134.89
CY5 I:	12647.55
CY5 B:	136.03
Q201 I:	23839.59
Q201 B:	144.45
Q202 I:	11145.3
Q202 B:	142.68

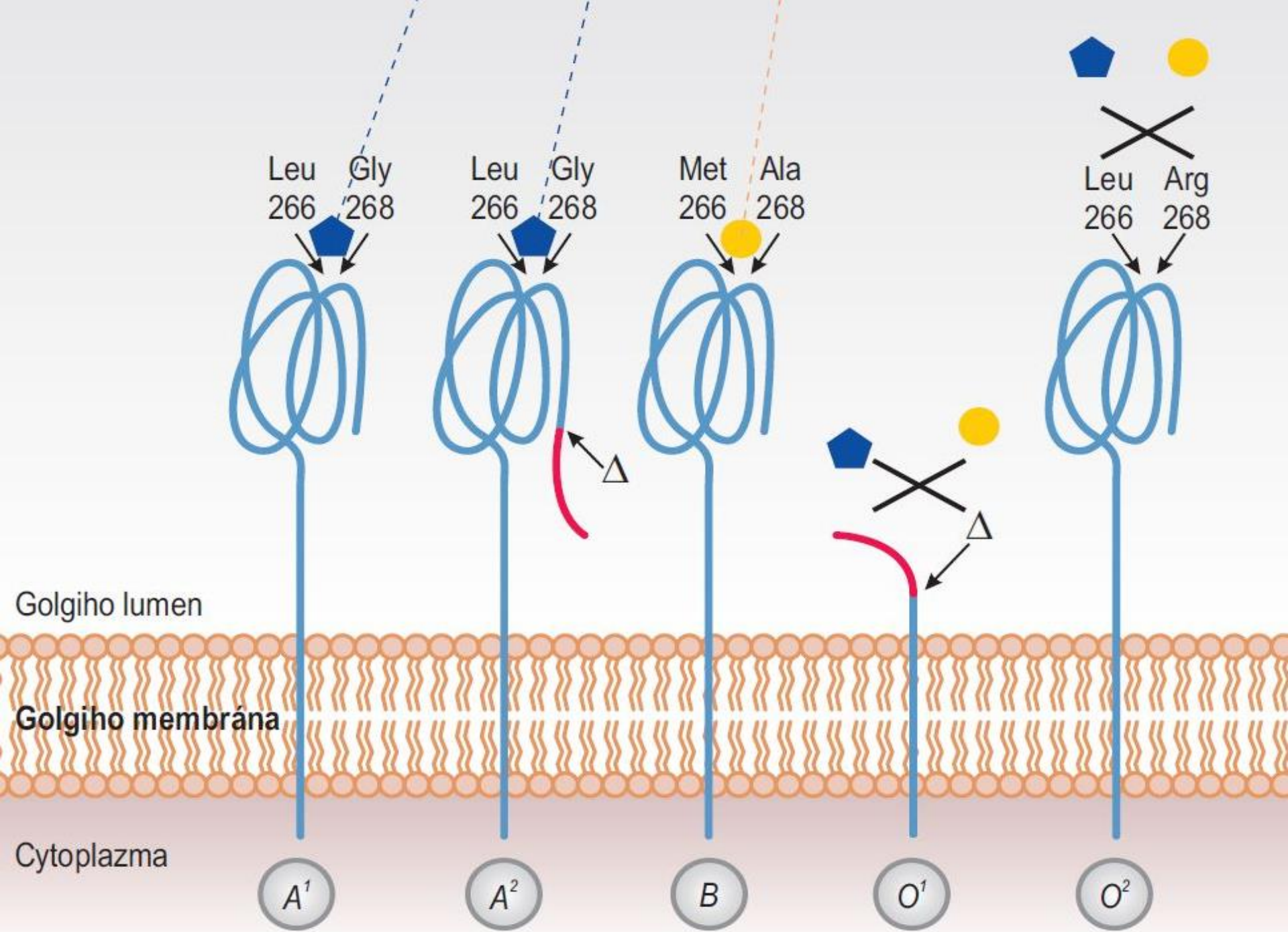
Name	Type	Polymorphism	Out of Rank	I/B	Not Valid	CV	Dist X	Dist Y
BCV001	3	CONSENSUS_A (homABO87-88)	0	41.68	0	0.15	0	0
BCV002	1	O1v (homABO188A189T)	0	82.2	0	0.09	0	0
BCV003	1	O1,O1v (homABO261delG)	0	45.2	0	0.11	0	0
BCV004	3	CONSENSUS_A (homABO322C)	0	101.35	0	0.09	0	0
BCV005	3	CONSENSUS_A (homABO467C)	0	49.84	0	0.08	0	0
BCV006	1	Ax,O1v (homABO646A)	0	76.61	0	0.05	0	0
BCV007	3	CONSENSUS_A (homABO703G)	0	73.8	0	0.08	0	0
BCV008	3	CONSENSUS_A (homABO796C)	0	35.73	0	0.07	0	0
BCV009	3	CONSENSUS_A (homABO802G)	0	43.57	0	0.12	0	0
BCV010	3	CONSENSUS_A (homABO803G)	0	60.1	0	0.06	0	0
BCV011	3	CONSENSUS_A (homABO798-804)	0	30.92	0	0.12	0	0
BCV012	3	CONSENSUS_A (homABO1059-1061delC)	1	33.65	0	0.05	0.07	-1.96
BCV013	3	NORMAL (homRHD8C)	0	33.8	0	0.08	0	0
BCV014	3	NORMAL (homRHD48G)	0	38.55	0	0.19	0	0
BCV015	3	NORMAL (homRHD48G)	0	33.07	0	0.22	0	0
BCV016	3	NORMAL (homRHD94ins)	0	18.43	0	0.21	0	0
BCV017	3	NORMAL (homRHD121C)	0	31.18	0	0.13	0	0

ABO systém /ISBT 001/

- Antigeny: A, B / 4 (až 1 000 000 epitopů/ery)
- Gen: *ABO* 9q34.2 /velice polymorfní, desítky alel/
 - terminální cukry glykoproteinů a glykolipidů ery membrány
 - 60-70% glykoproteiny s N-glykosidickou vazbou (band 3, 4.5)
 - 15-25% glykoproteiny s O-glykosidickou vazbou (glykoforiny)
 - 15-20% polyglykosylceramidy
 - 5% glykolipidy s krátkými cukernými řetězci
- Historie
 - objeven v roce 1901 Landsteinerem /v 1900 princip izoaglutinace/; nejprve rozeznávány 3 fenotypy /A,B,C(později O)
 - AB skupina popsána v 1902 /Decastello a Stuerli/
- Klinický význam
 - potenciál těžkých i fatálních HTR
 - HON většinou jen mírné
 - „histo-blood-group“ ... význam i pro transplantace

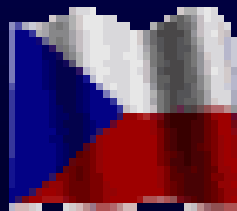






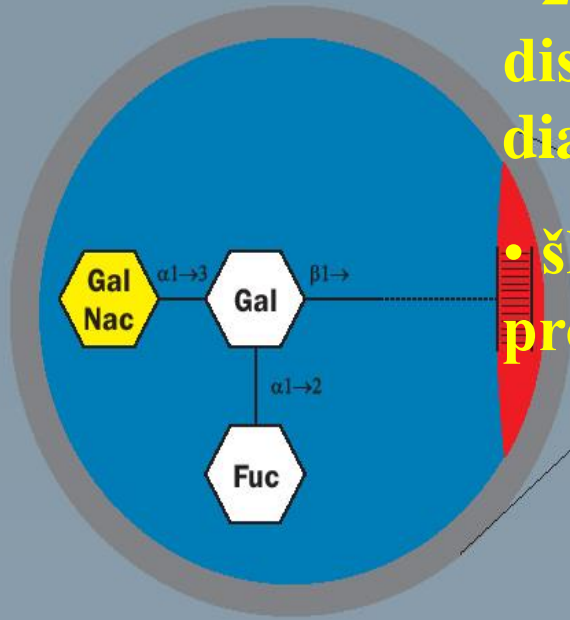
Jan Janský /1873 – 1921/

- studoval aglutinační vlastnosti krví různých osob, primárně však z pohledu psychiatrického („zda tyto vlastnosti nesouvisí s diagnózami maniodeprese, schizofrenie, epilepsie, debilita, progresivní paralýza, aj.“) ... zde souvislosti nenalezl, ale definoval 4 typy aglutinace a aglutinovatelnosti
- 1906 předneseny výsledky na Spolku lékařů českých
- 1907 – „Hematologické studie u psychotiků“ (Sborník klinický, 8,85- 139)
 - první ucelený systém čtyř krevních skupin (ozn.I, II, III, IV)
 - „administrativní priorita“ ... v roce 1911 americká lékařská komise doporučila Janského značení skupin jako oficiální
 - vzhledem k existenci jiného číselného /ale obráceného/ značení (Moss 1909) a prioritě Landsteinerova objevu byla celosvětově přijata ABO nomenklatura

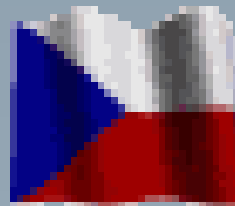
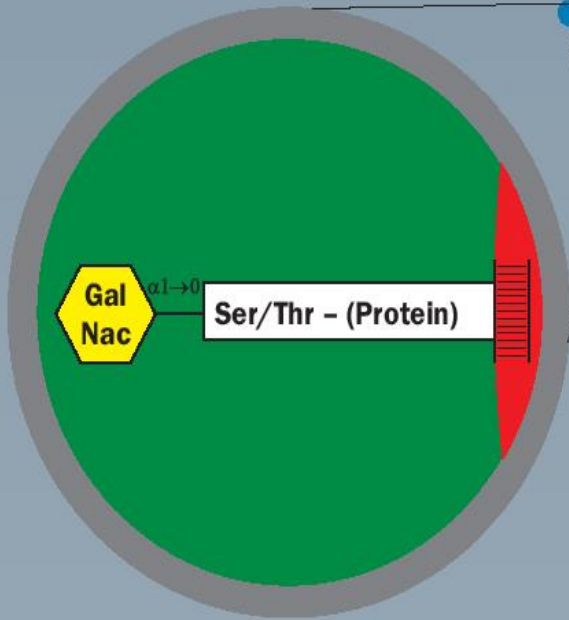


• 2008 na našem pracovišti objasněna příčina diskrepantní reakce dvou CE certifikovaných diagnostik

• šlo o zkříženou reaktivitu anti-A monoklonální protilátky s Tn kryptantigenem



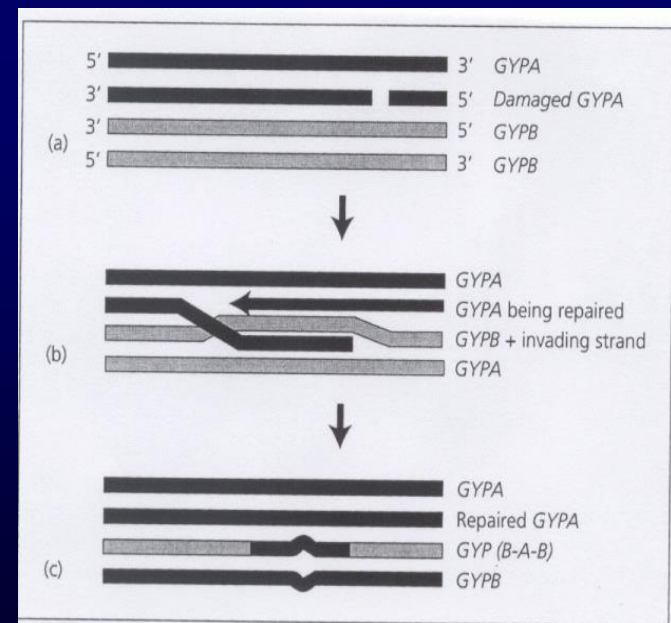
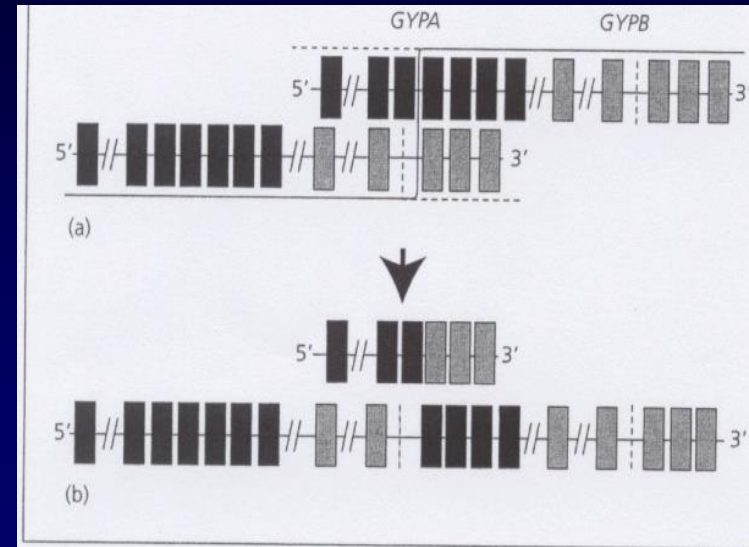
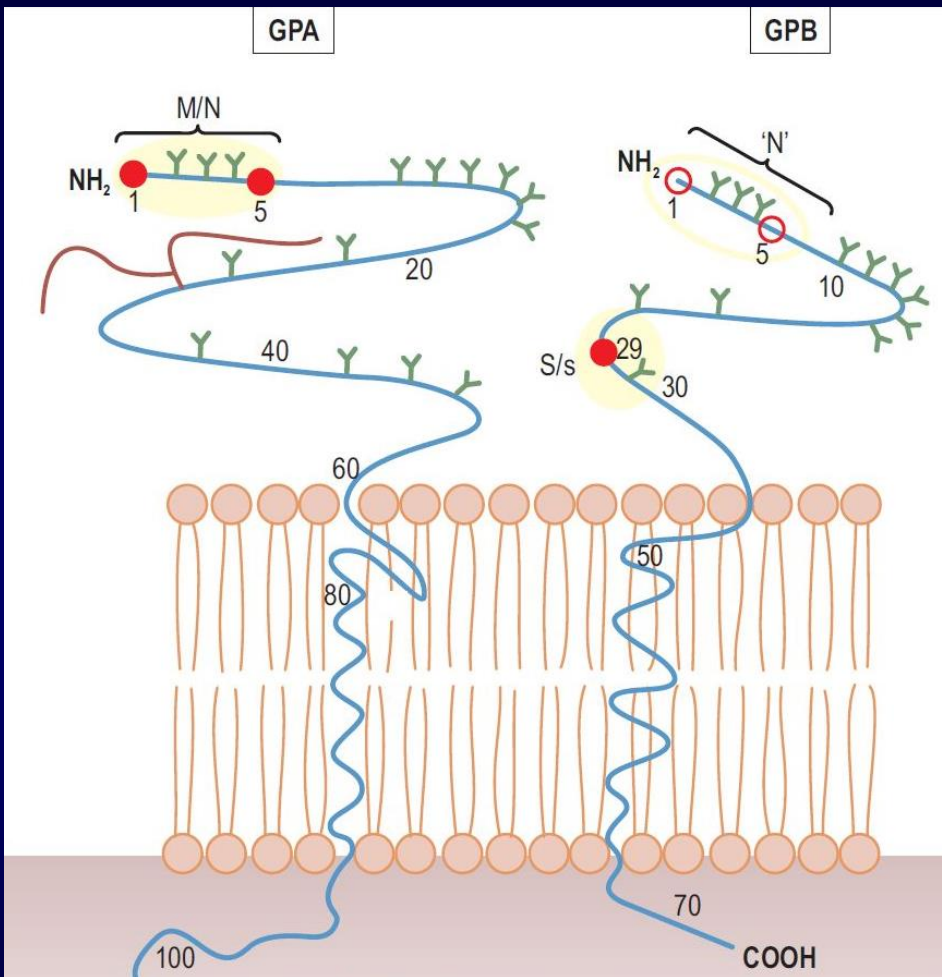
• výrobce uznal svou chybu a přistoupil ke změně výrobního postupu



MNS systém /ISBT 002/

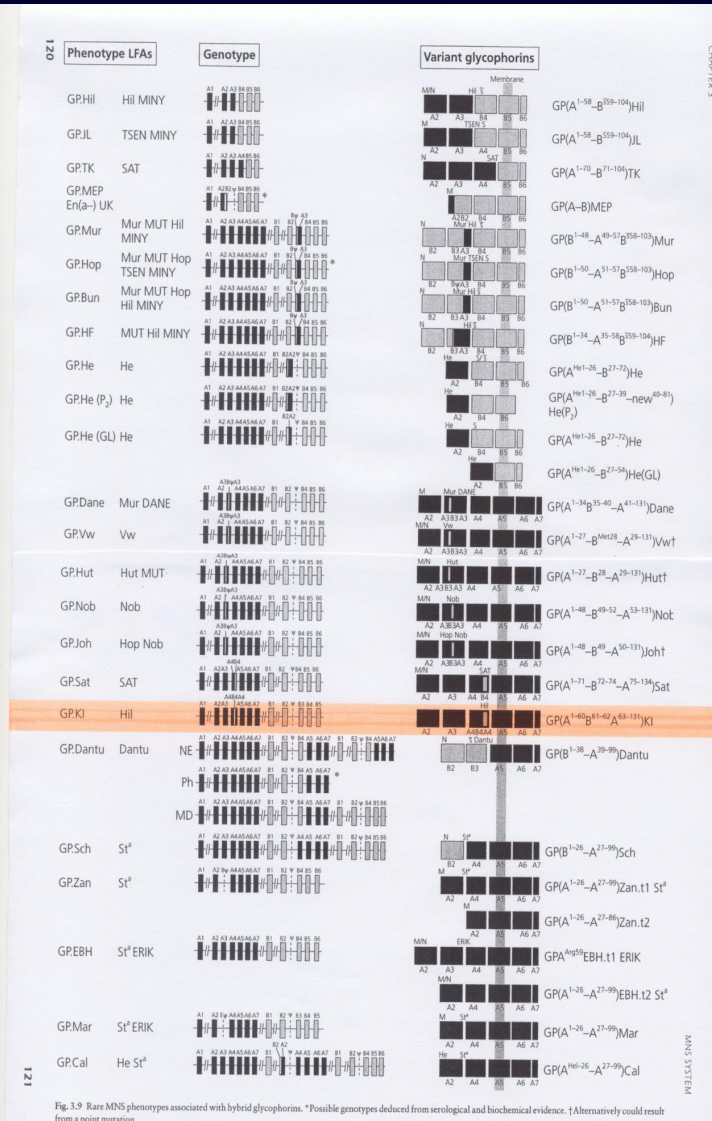
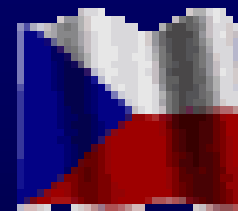
- Antigeny: M,N,S,s,U aj. / 46
- Geny: *GYP A, GYP B, GYP E* 4q31.21
 - aminokyselinové sekvence glykoforinů A a B
- Historie
 - objeven v roce 1927 Landsteinerem
- Klinický význam
 - HON mírné, ale i potenciál těžkých i fatálních HON
 - HTR většinou jen mírné, ale u některých specifit i těžké

MNS systém /ISBT 002/



MNS systém /ISBT 002/

- u dárkyně krve z ÚHK T zjištěna diskrepance při určování Cw antigenu
- příčinou kontaminace polyklonálního diagnostika příměsí další protilátky ... reagující s dosud neznámým hybridním glykoforinem GP(A/1-60/ – B/61-62/ – A/63-131/

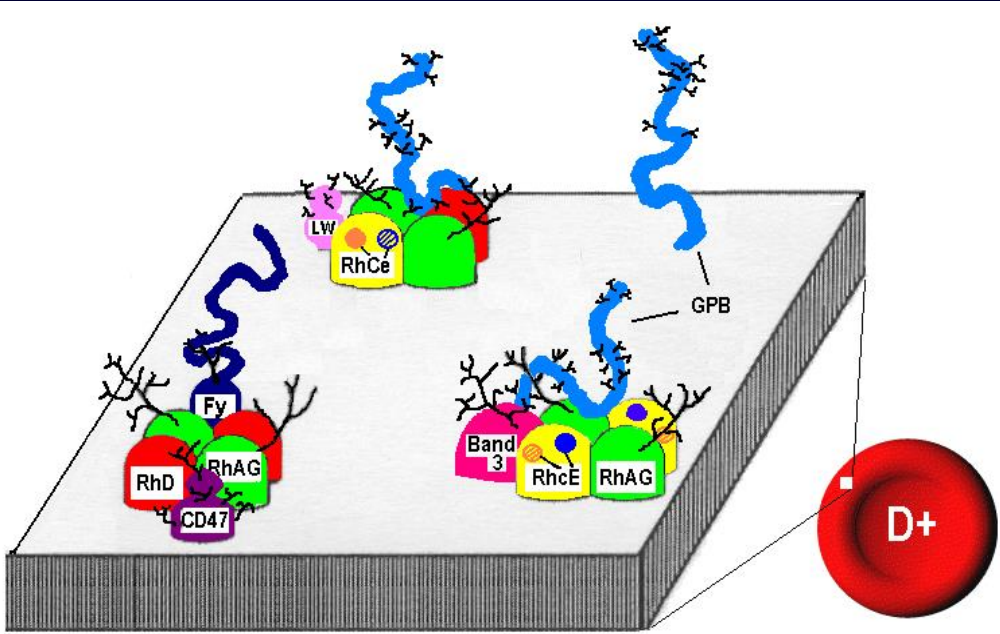


P systém /ISBT 003/

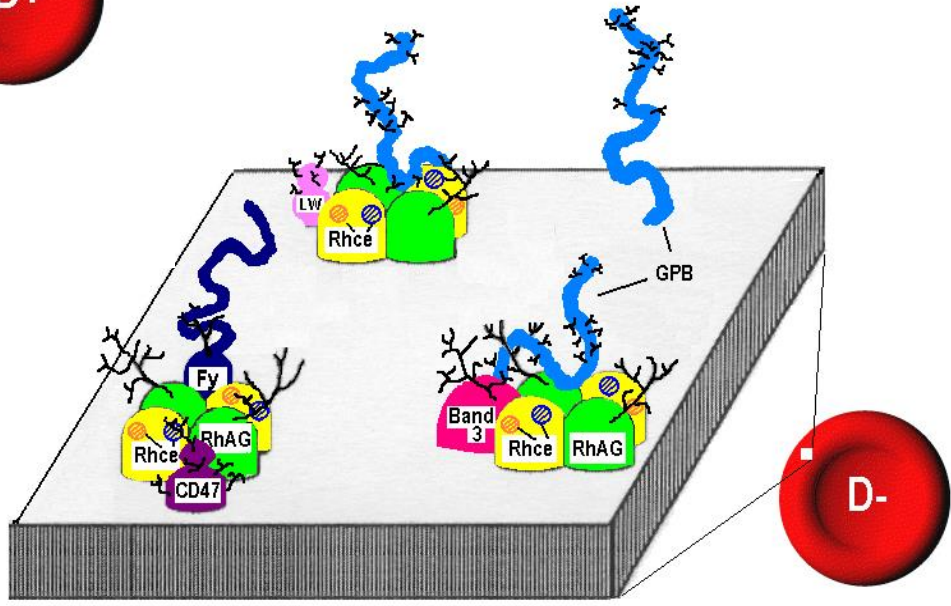
- Antigen: P1 / 1
- Gen: *P1* 22q11.2-qter
 - alfa-galaktosyl-paraglobosid
- Historie
 - objeven v roce 1927 Landsteinerem
- Klinický význam
 - spíše „benigní“ systém
 - protilátky třídy IgM a reagující za chladu, nepůsobící HON ani HTR /jen raritně mírné pozdní reakce/

Rh systém /ISBT 004/

- Antigeny: D,C,E,c,e,Cw aj. / 57
- Geny: *RHD,RHCE* 1p36.11
 - proteiny RhD a RhCE; transportní funkce /NH₄⁺,CO₂/
- Historie
 - popsán v roce 1939 Levinem a Stetsonem
 - název z imunizačních pokusů Landsteinerja a Wienera v 1940
- Klinický význam
 - významný systém – RhD je nejimunogennější struktura ery membrány („superantigen“ daný přítomností či chyběním celého proteinu), jediný antigen s rutinní prevencí primární imunizace
 - protilátky třídy IgG, vzácněji IgM
 - potenciál těžkých HTR a HON
 - velice polymorfní systém, řada variantních a zeslabených antigenů

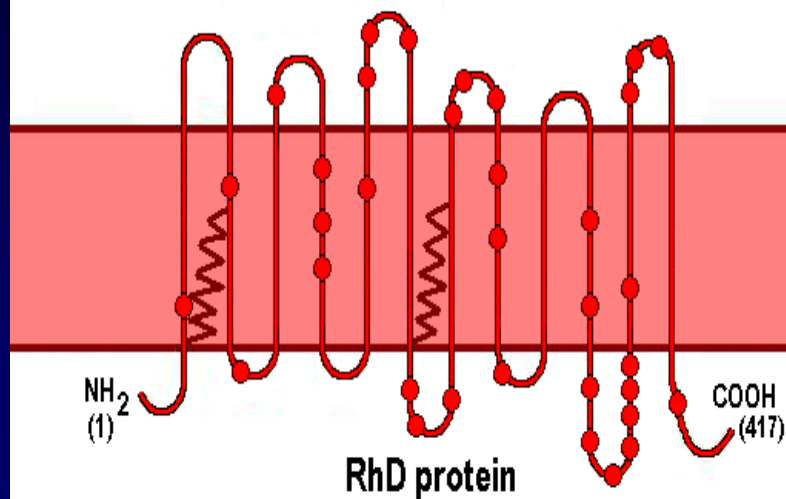


RhD+ (D+ C+ c+ E+ e+) *RHD-RHCE/RHD-RHCE*

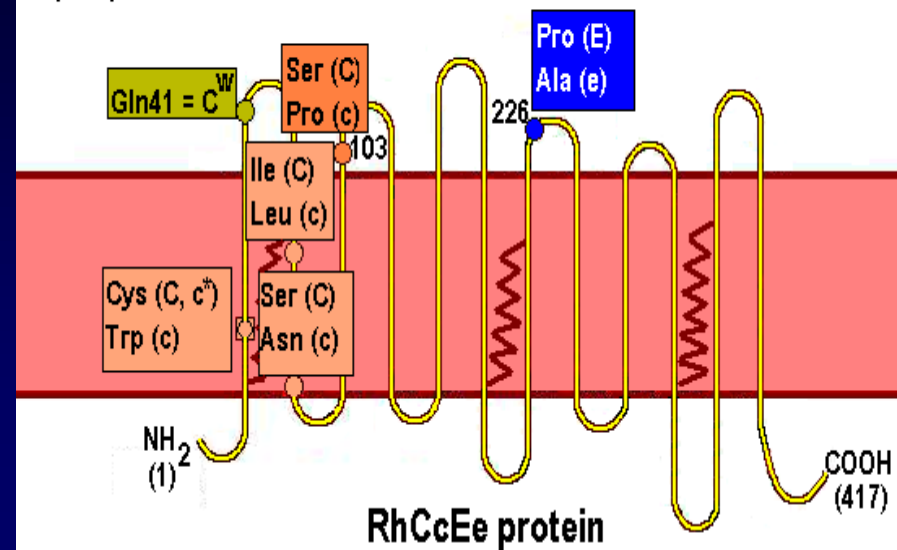


RhD- (D- C- c+ E- e+) *RHCE/RHCE*

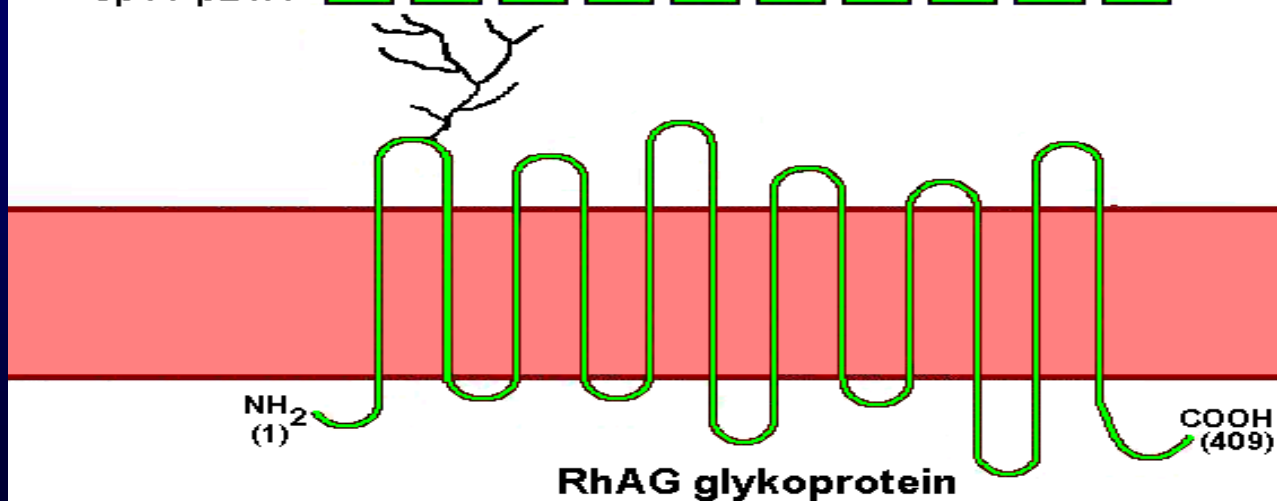
RHD gen
1p34-p36



RHCE gen
1p34-p36



RHAG gen
6p11-p21.1



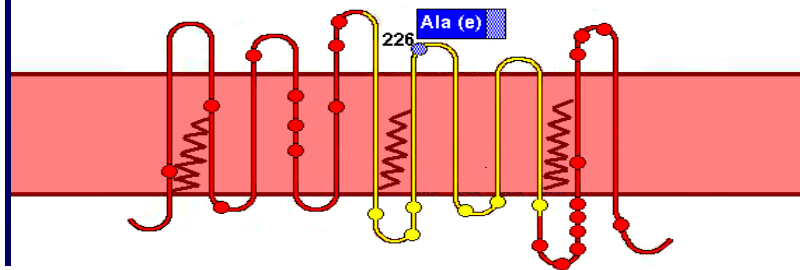
Rh varianty se změnami v RHD

D ^{II}	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	A354D 1061 C->A
D ^{IIIa}	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	N152T...T201R...F223V 455 A->C...602 C->G...667 T->G
D ^{IIIb}	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(2)-D
D ^{IIIc}	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(3)-D
D ^{III-IV}	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	L62F...A137V...N152T 186 G->T...410 C->T...455 A->C
D ^{IVa} -I	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	L62F...N152T...D350H 186 G->T...455 A->C...1048 G->C
D ^{IVb} -II	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(7: D350H -9)-D
D ^{IVb} -III	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(6-9)-D
D ^{IVb} -IV	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(7: D350H...A354N)-D
D ^{IVb} -V	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(7-9)-D
D ^{Va} -I	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(5: F223V...E233Q)-D
D ^{Va} -II	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(5)-D
D ^V -III	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(5: F223V...226P...V238M)-D

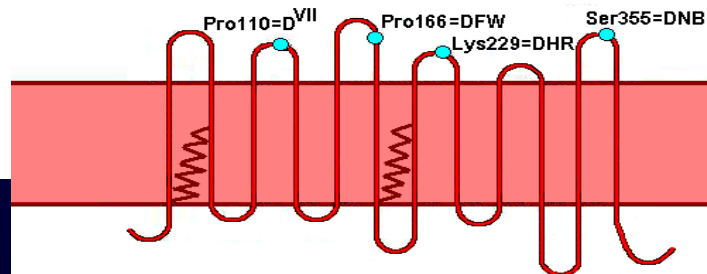
D ^{Va} -IV	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	E233Q 697 G->C
D ^V -V	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	E233K 697 G->A
D ^V -VI	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(5: F223V...V238M)-D
D ^V -VII	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(5: F223V...V245L)-D
D ^{VI} -I	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(4-5 226P)-D
D ^{VI} -II	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(4-6)-D
D ^{VI} -III	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(3-6)-D
D ^{VII}	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	L110P 329 T->C
DAR (ARRO-1)	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	T201R...F223V...I342T 602 C->G...667 T->G...1025 T->C
DBT - I	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(5-7)-D
DBT - II	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(5-9)-D
DCS	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(5: F223V...226P)-D

DFR - I	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(4: M169L...L172F)-D
DFR - II	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(4)-D
DFW	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	H166P 497 A->C
DHMI	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	T283I 848 C->T
DHMIi	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RHD-CE(3-5)-D
DHR	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	R229L 686 G->A
DIM	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	C285Y 854 G->A
DMH	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	L54P
DNB	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	G355S 1063 G->A
DNU	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	G353R 1059 G->A
DOL	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	M170T...F223V
D+G	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	S103P 307 T->C

Varianta D^{VI}-II (hybridní protein RhD-C/ce-D)



Příklady variant s bodovými mutacemi

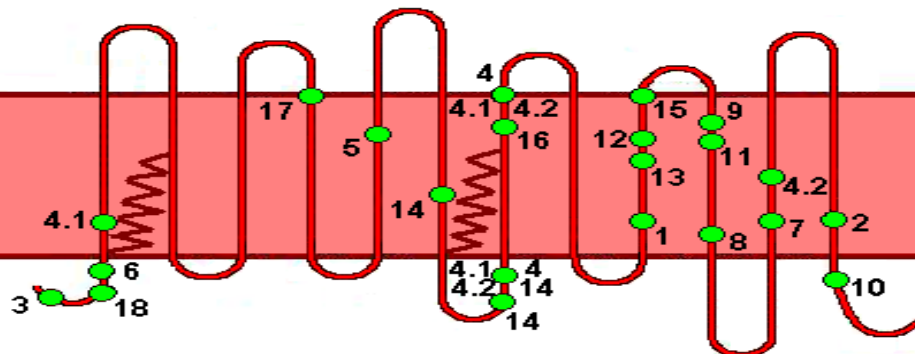


Mutace RHD u slabých D antigenů

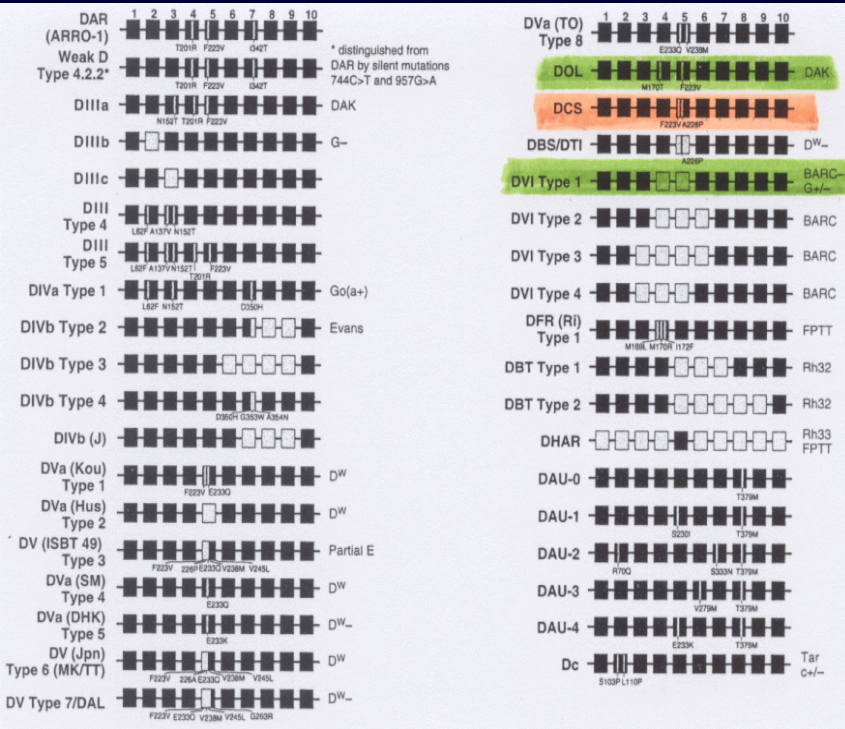
1 cDe		V270G 809 T->G
2 cDe		G385A 1154 G->C
3 cDe		S3C 8 C->G
4 cDe		T201R...F223V 602 C->G...667 T->G...819 G->A
4.1 cDe		W16C...T201R...F223V 48 G->C...602 T->G...667 T->G...819 G->A
4.2 cDe		T201R...F223V...I342T 602 C->G...667 T->G...[744 C->T]...957 G->A...1025 T->A
5 cDe		A149D 446 C->A
6 cDe		R10Q 29 G->A
7 cDe		G339E 1016 G->A

8 cDe		G307R 919 G->A
9 cDe		A294P 880 G->C
10 cDe		W393R 1177 T->C
11 cDe		M295I 885 G->T
12 cDe		G277E 830 G->A
13 cDe		A276P 826 G->C
14 cDe		S182T...K198N...T201R 544 T->A...594 A->T...602 C->G
15 cDe		G282D 845 G->A
16 cDe		W220R 658 T->C
17		R114W 340 C->T
18		R7W 19 C->T

Rh protein u slabých D antigenů (mutace v transmembranozní a cytoplasmatické lokalizaci)



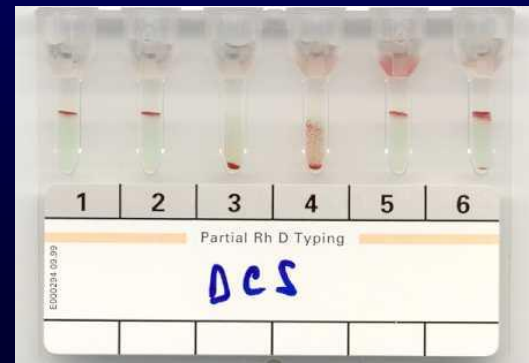
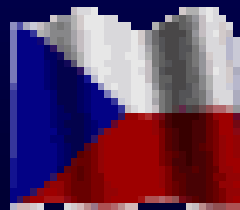
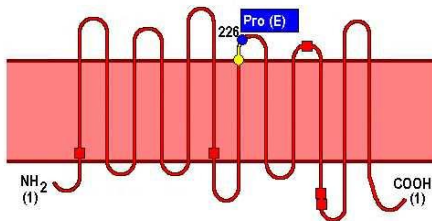
Rh systém /ISBT 004/



- 1998 v ÚHK T definován dosud neznámý typ varianty pojmenovaný „DCS“ (RHD-CE/F223V-226P/-D), zřejmě s úzkou vazbou na českou populaci
- spoluautorství prioritní publikace o D VI, nejčastější a nejvýznamnější RhD variantě /dárce z ÚHK T/

- spoluautorství publikace, popisující variantu DOL /dárce z ÚHK T/

DCS 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 F223V...226P



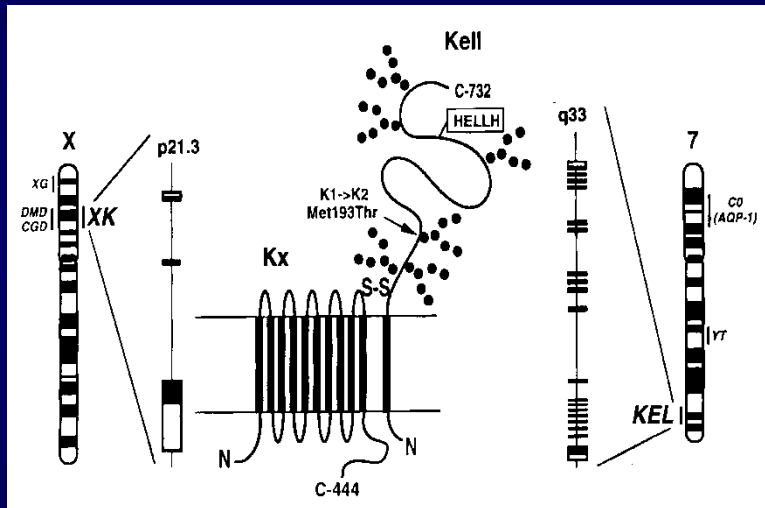
Lutheran systém /ISBT 005/

- Antigeny: Lu(a),Lu(b), aj. / 19
- Gen: *LU* 19q13.32
 - glykoproteiny CD239, imunoglobulinová struktura
 - patří mezi receptory a adhezivní molekuly /ligandy lamininu/
- Historie
 - objeven v roce 1945
- Klinický význam
 - spíše „benigní“ systém
 - protilátky působí jen raritně mírné pozdní HTR
 - vzhledem k nízké expresi na fetálních ery nejsou spojovány s HON

Kell systém /ISBT 006/

- Antigeny: K,k,Kp(a),Kp(b),Js(a),Js(b) aj. / 31
- Gen: *KEL* 7q34
 - glykoprotein CD238 /membránová metaloendopeptidáza/
 - disulfidicky spojen s Kx proteinem, se vzájemným ovlivněním exprese /K null x McLeod/
- Historie
 - objeven v roce 1946 /Coombs et.al./
 - první z řady antigenů, detekovaných pomocí antiglobulinového testu
- Klinický význam
 - významný systém, protilátky mají potenciál těžkých HTR i HON
 - u HON se na těžkém průběhu podílí i supresivní efekt protilátek na erytropoezu

Kell systém /ISBT 006/



- v poslední době v ÚHKT detekovány dva případy anti-Ku protilátky u K(null)fenotypu, ve spolupráci s IBGRL popsán molekulární podklad

- spoluautorství publikace o atypickém případě McLeod syndromu, kde na rozdíl od jiných nebyly téměř žádné akantocyty, definována i příčinná mutace (spolupráce IBGRL)

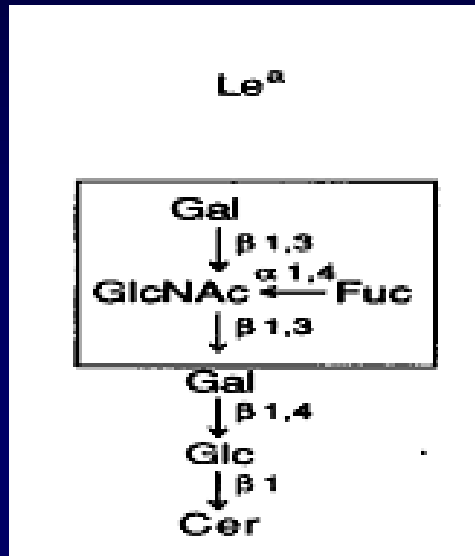


Lewis systém /ISBT 007/

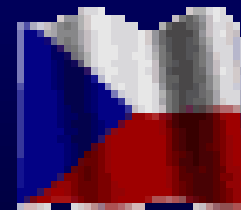
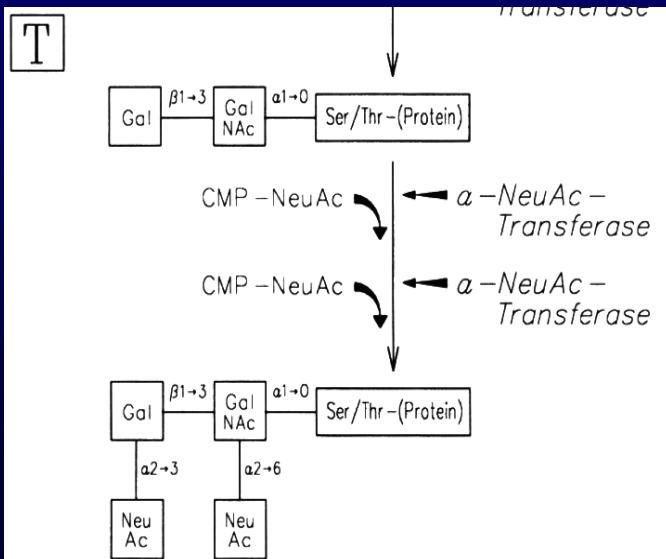
- Antigeny: Le(a),Le(b), aj. / 6
- Gen: *FUT3* 19p13.3
 - terminální části glykolipidů a glykoproteinů, naadsorbovaných na erytrocyty z plazmy /syntetizované v GIT/
 - nemění se po transplantaci hemopoezy
- Historie
 - objeven v roce 1946 /Mourant et al./
- Klinický význam
 - spíše „benigní“ systém, protilátky většinou chladové a fetální krvinky neexprimují Lewis antigeny
 - jen raritně protilátky reagující při 37° C v NAT potenciál mírných HTR

Lewis systém /ISBT

007/



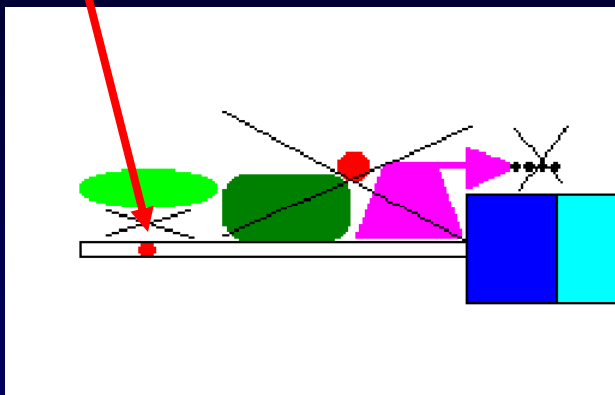
- 1994 v ÚHKT detekována zkřížená reaktivita některých monoklonálních protilátek anti-Le(a) s krvinkami s aktivovaným T-kryptantigenem /Thomsen-Friedenreich, struktura odhalená působením neuraminidázy)



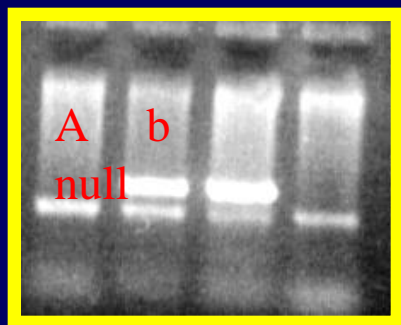
Duffy systém /ISBT 008/

- Antigeny: Fy(a),Fy(b), Fy3 aj. / 6
- Gen: *DARC* 1q23.2
 - glykoprotein s funkcí receptoru chemokinů
 - receptory pro některé typy plasmodií /původci malárie/
 - rozdíl mezi kavkazskou /Fy(aa,ab,bb)/ a černošskou populací /zde převažuje Fy(null)/
- Historie
 - objeven v roce 1950 /Cutbush et al./
- Klinický význam
 - protilátky s potenciálem HTR i HON /většinou mírných/

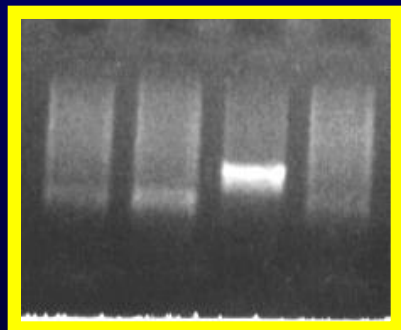
Duffy systém /ISBT 008/



- v ČR opakovaně zachyceny případy Fy(a-b-) fenotypu, raritní v kavkazské populaci /Libich et al., Vox Sang 1978/

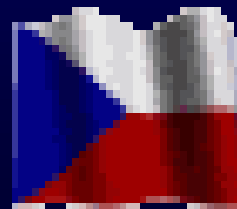


Heterozygot Fy B/null



Homozygot Fy null

- šlo o české a slovenské Romy
- v 2001 v ÚHKT popsán molekulární podklad Fy(null) u Romů – jde o stejnou mutaci /v GATA-1 vazebné oblasti promotoru/ jako v černošské populaci



Kidd systém /ISBT 009/

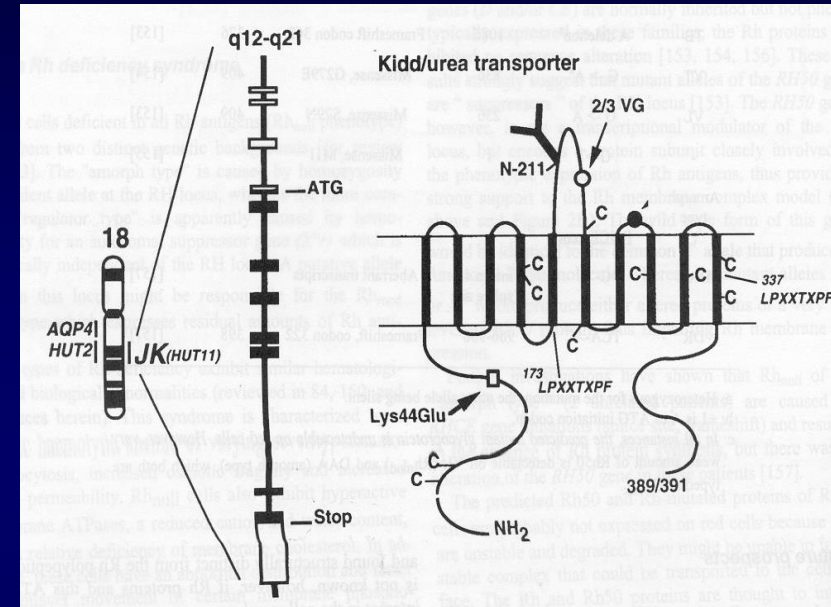
- Antigeny: Jk(a), Jk(b), Jk3 / 3
- Gen: *SLC14A1* 18q12.3
 - glykoprotein s funkcí transportu urey

Historie

- objeven v roce 1951 /Allen et al./ (v séru paní Kidd, „Jk“ ve zkratce jsou iniciály 6.dítěte)

Klinický význam

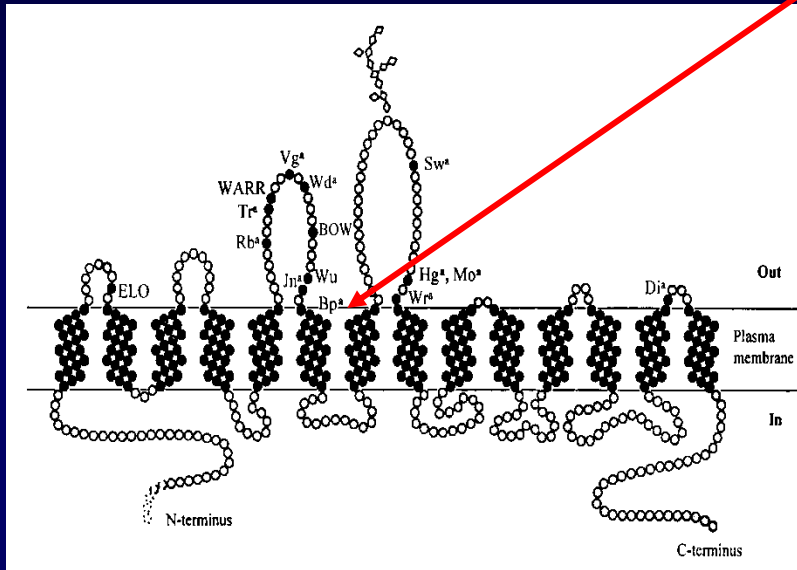
- protilátky IgG, někdy IgG+IgM, s potenciálem aktivovat komplement a působit těžké HTR
- dle studií nejčastější příčina DHTR /v.s. pro obtížnou detekovatelnost protilátek, které mají tendenci relativně rychlého zeslabení
- v případě HON však bývají mírné průběhy, jen raritně těžké



Diego systém /ISBT 010/

- Antigeny: Di(a),Di(b),Wr(a),Wr(b) aj. / 21
- Gen: *SLC4A1* 17q21-q22
 - band 3, významná struktura ery membrány:
 - N-konec vázán na cytoskeleton – podílí se na udržení tvaru a integrity
 - C-konec je aniontovým transportérem
- Historie
 - objeven v roce 1954 /Levine/, detailní popis 1955 /Layrisse et al./ (jméno venezuelské rodiny z kazuistiky HON s touto specifitou)
- Klinický význam
 - anti-Di(a) a anti-Wr(a) s potenciálem těžkých HTR i HON; u ostatních většinou mírné průběhy, nebo málo informací
 - významné biologické role:
 - alterované formy u ovalocytózy; receptor pro Plasmod.falciparum a pro adhezi infik.ery k vaskul.endotheliu; podíl na odstraňování starých erytrocytů z cirkulace, aj.

Diego systém /ISBT 010/



- Jn(a) antigen – DI17, 010.017, „Nunhart“, poprvé detekován v Praze u dárce J.N. během studie frekvence Wr(a) a popsán v 1967 ve spolupráci českých /Dr.M.Kout/ a norských autorů

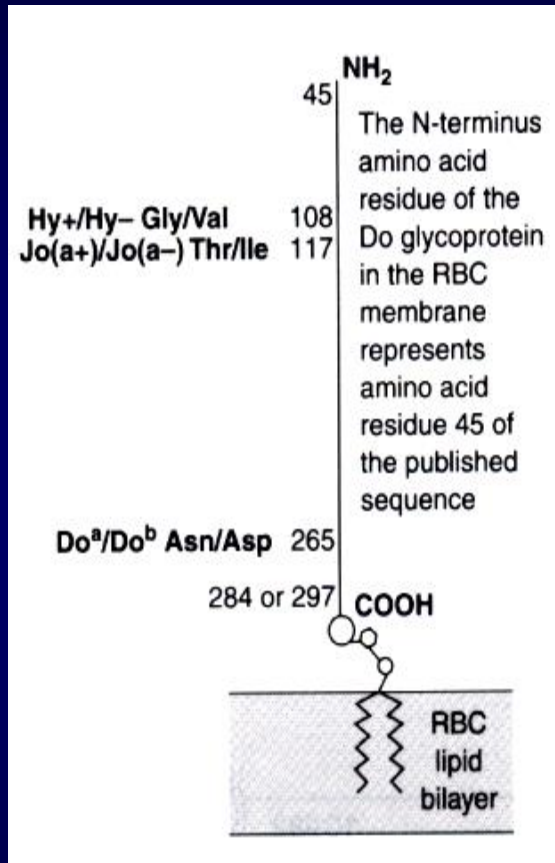


- velký přínos na rozšíření rodiny antigenů Diego systému o celou řadu LFA měly molekulárně-biologické práce Dr.P.Jarolíma v Bostonu a ÚHK T

Dombrock systém /ISBT 014/

- Antigeny: Do(a),Do(b) aj. / 6
- Gen: *ART4* 12p12.3
 - GPI ukotvený glykoprotein ze skupiny ribosyltransferáz
- Historie
 - objeven v roce 1965 /Swanson et al/
- Klinický význam
 - anti-Do protilátky s potenciálem těžkých HTR /i akutních hemolytických/, u ostatních většinou mírné průběhy, nebo málo informací
 - HON: jen zprávy o pozitivních PAT, ale ne klinické projevy

Dombrock systém /ISBT 014/



- Gy(a) antigen – DO03, 014.003, Gregory, poprvé detekován v USA v rodině českého původu

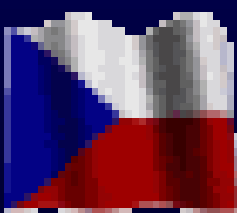
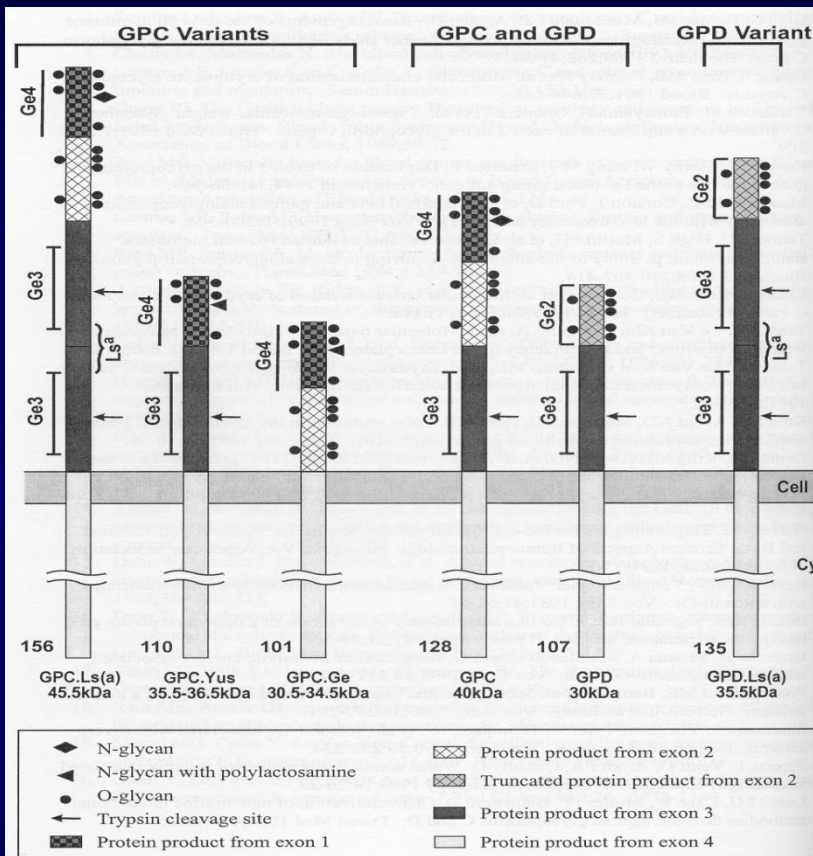
- Gy(a-) je raritní nulový fenotyp Dombrock systému, charakterizovaný tvorbou anti-Gy(a)

- nález anti-Gy(a) v nedávné době /TO Č.Budějovice, potvrzen v ÚHKT a IBGRL/, vedl Dr. Banzetovou a kolegy z nemocnice v ČB k zajímavé molekulárně-biologické a genealogické práci, naznačující pravděpodobnou souvislost s prvně detekovaným antigenem

Gerbich systém /ISBT 020/

- Antigeny: Ge2, Ge3, Ge4 aj. / 8
- Gen: *GYPC* 2q14.3
 - antigeny membránových glykoproteinů GPC a GPD
 - jde o dva produkty téhož genu /GPD je „zkrácená verze“, daná iniciací mRNA translace na jiném místě/
- Historie
 - objeven v roce 1960 /Rosenfield et al/
- Klinický význam
 - anti-Ge protilátky jsou vzácné, tedy je málo informací; jsou zprávy o DHTR /ikterus/ i o bezproblémových vícečetných převodech
 - HON: zprávy o pozitivních PAT, ale i o těžkých HON

Gerbich systém /ISBT 020/



- 2007 byla na TO Liberec a v ÚHKT popsána kazuistika, přinářející cenné informace o imunogenicitě Gerbich antigenů a o klinickém efektu inkompatibilní transfuze
- nízkotitrová anti-Ge protilátka po transfuzi 1 inkompatibilní TU vystoupala na statistické titrační hodnoty
- podání inkompatibilní TU při nízkém titru nemělo klinické projevy, ovšem další podání inkomp. TU při vysokém titru protilátky vyústilo v okamžitou reakci /dušnost, třesavka/

Vel kolekce /ISBT 211/

- Antigeny: Vel, ABTI / 2
- Gen: *dosud neznámý*
 - jde sice o nejdříve popsáný HFA, dosud však biochemicky a molekulárně-geneticky představuje „nerozluštěnou hádanku“
- Historie
 - objeven v roce 1952 /Sussman et al/
- Klinický význam
 - anti-Vel protilátky jsou vzácné anti-HFA, jsou však často třídy IgM a aktivují komplement; byly popsány těžké akutní HTR
 - naopak dosud nebyly popsány v souvislosti s HON
 - 2009 ve spolupráci TO Žilina a ÚHKT popsána poměrně silná anti-Vel, která vůbec nereagovala v Capture systému...podnět k diskusi o riziku u tohoto typu protilátek a moderních laboratorních postupů
 - 2002 kazuistika anti-Vel v těhotenství, analýza charakteru protilátky pomocí ads-PAT



Jr(a) HFA /ISBT 901005/

- **Gen: *dosud neznámý***
 - také jeden z posledních imunohematologických biochemických a molekulárně-genetických „oříšků“
- **Historie**
 - objeven v roce 1970 /Stroup et al/
- **Klinický význam**
 - anti-Jr(a) protilátky jsou vzácné anti-HFA
 - byly popsány HTR s mírným průběhem i transfuze bez komplikací
 - HON – v nedávné době zpráva o fatálním průběhu /hydrops/
- *koncem 20.století v ÚHKT ve spolupráci se slovenskými i českými TO popsán častý výskyt anti-Jr(a) protilátek u romského etna*
- *vzhledem k složité identifikaci u případů anti-HFA je důležité*
„vodítka“, umožňující rychlejší a ekonomičtější identifikaci

