

Jiří Masopust, Martin Písačka

Praktická imunohematologie – erytrocyty

2., přepracované a doplněné vydání





Jiří Masopust, Martin Písačka

Praktická imunohematologie – erytrocyty

2., přepracované a doplněné vydání

Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být reprodukována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude trestně stíháno.

MUDr. Jiří Masopust, MUDr. Martin Písačka

Praktická imunohematologie – erytrocyty

2., přepracované a doplněné vydání

Autoři

MUDr. Jiří Masopust (editor)

Transfuzní oddělení Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem, o. z., Krajské zdravotní, a. s.

MUDr. Martin Písačka

Transfuziologický úsek Ústavu hematologie a krevní transfuze, Praha

Ústav klinické a experimentální hematologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Praha

Recenzenti

MUDr. Martin Kořístka

Lékařská fakulta Ostravské univerzity a Krevní centrum Fakultní nemocnice Ostrava

MUDr. Alena Pejchalová

Lékařská fakulta Masarykovy univerzity Brno a Transfuzní a tkáňové oddělení Fakultní nemocnice Brno

Vydání odborné knihy schválila Vědecká redakce nakladatelství Grada Publishing, a.s.

Obrázky překreslil Jiří Hlaváček. Ostatní obrázky jsou z archivu autorů, pokud není uvedeno jinak.

Cover Photo © Shutterstock, 2022

Cover Design © Grada Publishing, a.s., 2022

© Grada Publishing, a.s., 2022

Vydala Grada Publishing, a.s.

U Průhonu 22, Praha 7

jako svou 8692. publikaci

Šéfredaktorka lékařské literatury MUDr. Michaela Lízlerová

Odpovědná redaktorka BcA. Radka Jančová, DiS.

Jazyková korektura Mgr. Michal Zlatoš

Sazba a zlom Jaroslav Kolman

Počet stran 448

2. vydání (1. vydání v Grada publishing, a.s.), Praha 2022

Vytiskly Tiskárny Havlíčkův Brod a.s.

Názvy produktů, firem apod. použité v knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.

Postupy a příklady v této knize, rovněž tak informace o lécích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorů. Z jejich praktického uplatnění však pro autory ani pro nakladatelství nevyplývají žádné právní důsledky.

ISBN 978-80-271-6693-0 (pdf)

ISBN 978-80-271-3377-2 (print)

**Vydání této publikace podpořila
Společnost pro transfuzní lékařství ČLS JEP.**



Obsah

Předmluva k 1. vydání	11
Předmluva k 2. vydání	12
Úvod	13
1 Obecné principy	15
1.1 Erytrocytové antigeny (antigeny krevních skupin)	15
1.2 Antierytrocytové protilátky (protilátky proti antigenům krevních skupin) ...	23
1.3 Reakce antigenu a protilátky	29
1.4 Polyaglutinabilita, pseudoaglutinace	34
2 Krevní skupiny	39
2.1 AB0 systém (ISBT 001)	39
2.2 H systém (ISBT 018)	53
2.3 Lewis systém (ISBT 007)	56
2.4 Vylučovatelství AB0, H, Lewis	61
2.5 MNS systém (ISBT 002)	63
2.6 P1PK systém (ISBT 003)	70
2.7 Rh systém (ISBT 004)	75
2.8 Lutheran systém (ISBT 005)	92
2.9 Kell systém (ISBT 006) a Kx systém (ISBT 019)	95
2.10 Duffy systém (ISBT 008)	101
2.11 Kidd systém (ISBT 009)	105
2.12 Diego systém (ISBT 010)	108
2.13 Yt systém (ISBT 011, dříve Cartwright)	111
2.14 Xg systém (ISBT 012)	112
2.15 Scianna systém (ISBT 013)	113
2.16 Dombrock systém (ISBT 014)	114
2.17 Colton systém (ISBT 015)	116
2.18 Landsteiner–Wiener systém (ISBT 016)	117
2.19 Chido/Rodgers systém (ISBT 017)	119
2.20 Gerbich systém (ISBT 020)	120
2.21 Cromer systém (ISBT 021)	121
2.22 Knops systém (ISBT 022)	122
2.23 I systém (ISBT 027)	124
2.24 Ii kolekce (ISBT 207)	126
2.25 SID systém (ISBT 038)	127
2.26 Další erytrocytové antigenní systémy	130
2.27 Další erytrocytové antigenní kolekce	130
2.28 Antigeny s nízkou frekvencí výskytu – LFA (série 700)	137
2.29 Antigeny s vysokou frekvencí výskytu – HFA (série 901)	137
2.30 Bg (Bennett–Goodspeed) – HLA asociované antigeny	137

2.31	HTLA (high titer low avidity protilátky)	138
2.32	Membránové abnormality erytrocytů a změny exprese antigenů	138
2.33	Lokalizace lokusů krevních skupin na chromozomech, membránová struktura, CD	138
2.34	Imunogenicitu erytrocytových antigenů mimo AB0	141
2.35	Nejčastěji se vyskytující nepravidelné protilátky (NAT 37 °C)	142
2.36	Klinický význam protilátek proti erytrocytům (výběr)	142
2.37	Funkce molekul krevních skupin	144
3	Imunohematologické techniky – detekce antigenů a protilátek: Principy	155
3.1	Sérologické techniky	155
3.2	Molekulárněgenetické techniky	183
3.3	Průtoková cytometrie	184
3.4	Krevní vzorky	184
3.5	Diagnostická séra	187
3.6	Diagnostické erytrocyty	188
3.7	Kvantifikace protilátek	190
3.8	Buněčné funkční testy v imunohematologii	192
4	Imunohematologická vyšetření	197
4.1	AB0 RhD	197
4.2	Určení dalších antigenů erytrocytů – fenotypování	208
4.3	Genotypování krevních skupin	210
4.4	Přímý antiglobulinový test (PAT)	220
4.5	Screening nepravidelných antierytrocytových protilátek	226
4.6	Identifikace protilátek (určení specifity protilátek)	228
4.7	Titrování protilátek	240
4.8	Test kompatibility	240
4.9	Speciální imunohematologická vyšetření	242
4.10	Kontrola kvality jednotlivých šarží diagnostik	247
4.11	Denní kontrola kvality imunohematologické diagnostiky	249
4.12	Verifikace kvalitativních imunohematologických metod	249
5	Význam imunohematologických vyšetření červené řady pro transfuzi	253
5.1	Předtransfuzní vyšetření	253
5.2	Výběr vhodného transfuzního přípravku	259
5.3	Registr dárců vzácných krevních skupin	272
6	Potransfuzní imunitní reakce červené řady	275
6.1	Dělení	275
6.2	Akutní hemolytická potransfuzní reakce (z imunologických příčin)	275
6.3	Pozdní hemolytická potransfuzní reakce (z imunologických příčin)	280
6.4	Algoritmus imunohematologického vyšetření potransfuzní reakce	282
7	Autoimunitní hemolytické anémie	287
7.1	Klasifikace	288
7.2	Etiopatogeneze	288
7.3	Vlastní mechanismy imunitní destrukce erytrocytů	288

7.4	Průkaz hemolýzy	290
7.5	AIHA s tepelnými autoprotilátkami (WAIHA)	290
7.6	AIHA s chladovými protilátkami (syndrom chladových aglutininů, CAS) ..	296
7.7	Smíšený typ AIHA	298
7.8	Paroxysmální chladová hemoglobinurie (PCH)	299
7.9	Polékové imunitní hemolytické anémie (drug-induced immune hemolytic anemia – DIHA)	301
7.10	Další laboratorní a klinické nálezy u AIHA	305
7.11	Praktický postup vyšetření	305
8	Hemolytické onemocnění plodu/novorozence (HON)	311
8.1	Definice	311
8.2	Kategorie HON	311
8.3	Patofyziologie	312
8.4	Rh HON	314
8.5	AB0 HON	315
8.6	Ostatní HON	316
8.7	Klinika	317
8.8	Diagnostika	317
8.9	Diferenciální diagnostika HON	333
8.10	Terapie – stručný přehled	333
8.11	Profylaxe Rh HON	335
8.12	Prevence imunizace antigeny K, c	337
9	Transfuze a transplantace	341
9.1	Transplantace krvetvorných buněk	341
9.2	Transplantace orgánů	347
Příloha 1	– Laboratorní postupy (vlastní metody)	351
P1	Příprava 3% suspenze erytrocytů	352
P2	Separace transfundovaných a autologních erytrocytů	352
P3	Potvrzení slabé krevní skupiny A či B adsorpcí a elucí	354
P4	Stanovení aglutininů AB0 bez centrifugace	355
P5	Vyšetření volných protilátek anti-A, anti-B v plazmě/séru novorozence	356
P6	Průkaz anti-A ₁	358
P7	Stanovení vylučovatelství skupinových vlastností A, B, H	358
P8	Zkumavkový nepřímý antiglobulinový test (NAT)	361
P9	Zkumavkový nepřímý antiglobulinový test v LISS (LISS-NAT)	362
P10	Zkumavkový nepřímý antiglobulinový test s PEG	363
P11	Rozlišení protilátek anti-D + C a protilátek anti-G	364
P12	Vyšetření chladových protilátek/autoprotilátek	368
P13	Určení specifity chladových autoprotilátek	370
P14	Předeřtí vzorku k odstranění interference chladových protilátek	372
P15	Odlíšení anti-HLA (Bg)	373
P16	Titrování nepravidelných protilátek	374
P17	Zkrácený test kompatibility	375
P18	Adsorpční test antierytrocytových protilátek	376

P19	Vysycování plazmy/séra s použitím vlastních erytrocytů pomocí PEG (autologní adsorpce, autoadsorpce)	377
P20	Alogenní adsorpce	379
P21	Tepelná eluce	380
P22	Vyšetření polékové AIHA – zkumavkový test	381
P23	Vyšetření polékové AIHA – test sloupcové aglutinace	384
P24	Vyšetření bifazických hemolyzinů (Donathův–Landsteinerův test, D-L test)	385
P25	Odlišení pseudoaglutinace (rouleaux) a chladové autoaglutinace	387
P26	Vyšetření polyaglutinability	388
P27	Zmrazení erytrocytů v glycerolu	389
P28	Použití dithiotreitolu	390
Příloha 2 – Příklady z praxe		393
Případ 1		393
Případ 2		394
Případ 3		396
Případ 4		397
Případ 5		399
Případ 6		402
Případ 7		404
Případ 8		406
Případ 9		409
Případ 10		412
Případ 11		414
Případ 12		416
Případ 13		418
Případ 14		421
Případ 15		422
Případ 16		424
Případ 17		426
Případ 18		430
Případ 19		431
Případ 20		431
Literatura		433
Souhrn		436
Summary		437
Seznam zkratk		438
Rejstřík		441

Předmluva k 1. vydání

Jestliže krev je základním stavebním kamenem transfuziologie a výroba transfuzních přípravků jejím architektem, pak imuno hematologie je jejím vykladačem, nastaveným zrcadlem a nástrojem k poznání, sledování a zkoumání pestrých dějů mezi antigeny krevních buněk a protilátkami namířenými proti nim. Ačkoliv by se mohlo zdát, že role imuno hematologie je po více než století každodenních repríz již dávno obehnaná a vyčerpaná, nepřestává být inovativní a rozvíjející se oblastí medicíny.

Imuno hematologie erytrocytů se rozpráhne stále více do šířky i do hloubky. Některé postupy a názory postupně zanikají nebo se ztrácejí v oparu rychle proudící přítomnosti, jiné se z mlhy nevědění zase nečekaně či čekaně vynořují. Neutichají nové poznatky o patofyziologii imuno hematologických dějů. Každoročně jsou objevovány další krevní skupiny. Prapůvodní sérologie se přesouvá od manuální zkumavkové prehistorie přes rozsáhlou automatizaci a nové technologie, z nichž asi dosud největší revoluci znamenalo zhmožnění jednoduchého nápadu v podobě gelového či kuličkového síta, až k nastupující molekulárněgenetické budoucnosti.

Imuno hematologie pro nás zůstává – a doufáme, že i pro některé naše čtenáře – stále tou tajemnou, záhadnou, inspirující a impresivní kráskou.

Jiří Masopust
Ústí nad Labem, srpen 2016

Předmluva k 2. vydání

Ke druhému vydání naší učebnice nás nevedla touha po zviditelnění se, ale poptávka čtenářské odborné obce po rozebraném nákladu prvního vydání. Nebudeme lhát, že nás zájem potěšil, ale zároveň v nás vyvolal obavu z prostého opakování se. Nakonec se ukázalo, že imunohematologie je stále živým organismem s některými umírajícími, ale i s mnoha vznikajícími buňkami jejího poznání. Oněch uplynulých 6 let přineslo některé nové pohledy, ukázalo potřebu doplnění, úprav, někdy i oprav jednotlivých kapitol. Přibylo dalších 7 krevněskupinových systémů a přes 30 antigenů. Do praxe se včlenily některé nové metody, došlo i k úpravám některých diagnostických postupů.

Zároveň jsme mohli splatit dluh z prvního vydání v podobě přidané kapitoly Transfuze a transplantace týkající se nejednoduchého imunohematologického přístupu k transplantovaným pacientům a přílohy Příklady z praxe, která popisuje běžné případy, ale i nádhernou spletnost pátrání po konečném výsledku imunohematologických případů.

Jiří Masopust
Ústí nad Labem, říjen 2022

Úvod

Záměr autorů publikovat učebnici praktické imunohematologie erytrocytů byl vyvolán nikoliv jen zdánlivou skutečností, že žádná původní domácí publikace zabývající se touto problematikou v podobném rozsahu neexistuje. Byli vedeni pokornou snahou stvořit první českou moderní imunohematologickou učebnici, která kromě teoretických poznatků předkládá také řadu praktických doporučení a postupů.

Publikace nepřináší převratné, nevídané, neslýchané či internetem neobjevené informace. Na obsahově rozumné ploše pootvívá dveře teoretických i praktických témat imunohematologie erytrocytů se snahou o přiblížení, připomenutí a výčet krevně-skupinových vlastností a charakteristik, interakcí mezi erytrocytovými antigeny a protilátkami namířenými proti nim a jejich klinického významu v lidském organismu, možností, předností a úskalí metod a postupů používaných v imunohematologických laboratořích. Samostatné kapitoly jsou věnovány imunohematologickým aspektům transfuzí, potransfuzním imunitním reakcím červené řady, autoimunitním hemolytickým anémiím či hemolytickému onemocnění plodu a novorozence. Bez zbytečných obsahových girland je do textu přisypána jako obohacující koření řada tabulek, schémat a obrázků. Jednotlivé kapitoly zakončují krátké zkušební testy, které nemají čtenáře znejistět či pokořit, nýbrž lehce zábavnou příchutí podpořit strávení právě probraného tématu.

Učebnice se snaží oslovit široké spektrum čtenářů – od studentů, zdravotních laborantů, bioanalytiků až po lékaře zabývající se ve své praxi imunohematologickou tematikou. Doufáme, že bude jejich dobrým pomocníkem při řešení každodenních praktických pracovních úkolů a případných problémů.

1 Obecné principy

Uvádíme obecné principy významné pro imunohematologii, pro další studium doporučujeme učebnice imunologie a genetiky.

1.1 Erytrocytové antigeny (antigeny krevních skupin)

Celkový počet (2021): 378; z toho 345 ve 43 systémech, 14 v 5 kolekcích, 16 v sérii LFA (antigeny s nízkou frekvencí výskytu) a 3 v sérii HFA (antigeny s vysokou frekvencí výskytu). S novými poznatky a citlivějšími metodami počty definovaných antigenů narůstají (roku 2010 bylo definováno 321 antigenů a 33 systémů). Nové antigeny a případně i nové systémy jsou oficiálně „inaugurovány“ na pravidelných jednáních pracovní skupiny (WP on Red Cell Immunogenetics and Terminology), konaných při kongresech International Society of Blood Transfusion. Je vysoce pravděpodobné, že v době tisku této publikace bude počet známých antigenů již vyšší.

1.1.1 Definice

Antigen (Ag) je struktura membrány krevní buňky definovaná lidskou aloprotilátkou – tedy protilátkou produkovanou imunizovanou osobou, které daný znak na membráně chybí.

1.1.2 Biochemické složení

a) Proteiny či glykoproteiny (proteinové antigeny) – specifické aminokyselinové sekvence membránových (glyko)proteinů typu 1, 2, 3 a 5 (typ 4 nemá extramembránové domény, a tudíž nemá antigenní vlastnosti); rozdíly jsou ve škále přítomnost/chybění celé bílkoviny (RhD) až změna jediné aminokyseliny v řetězci (většina ostatních antigenů); existují proteiny, které procházejí membránou 1× nebo vícekrát nebo jsou navázány na glykosylfosfatidylinositol (GPI).

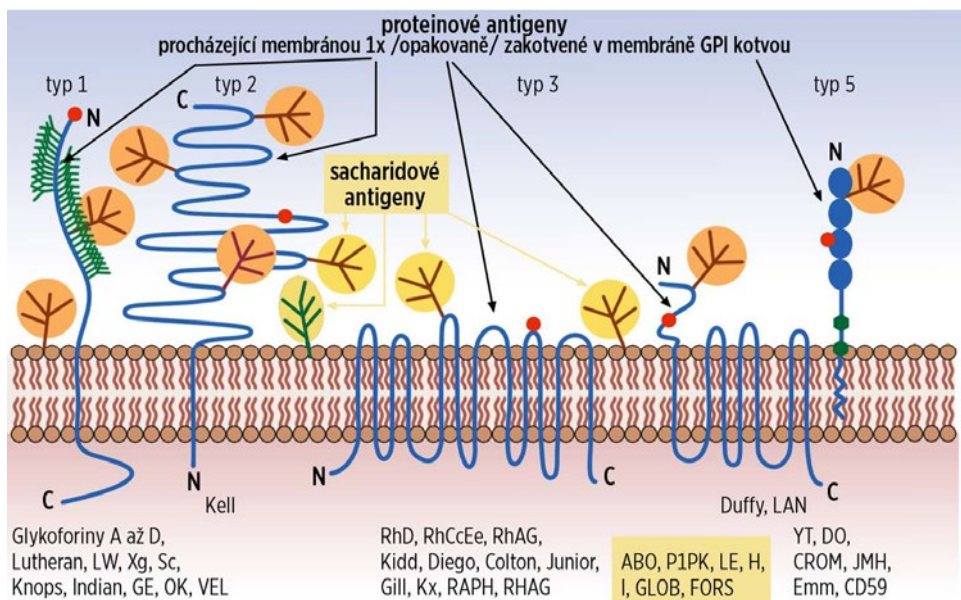
b) Terminální sacharidové/karbohydrátové oblasti glykosylačních řetězců glykoproteinů a glykolipidů (sacharidové antigeny) (viz obr. 1.1).

1.1.3 Základní genetik

Chromozomy se nacházejí v buněčném jádře v párech, jsou tedy diploidní.

Homozygotní jedinec (homozygot): genové alely na obou chromozomech páru jsou **identické** (eventuálně mají identickou funkci u glykosyltransferáz).

Heterozygotní jedinec (heterozygot): genové alely na dvou chromozomech páru jsou **rozdílné**.



Obr. 1.1 Struktury erythrocytové membrány s antigenními vlastnostmi (upraveno podle: Řeháček V, Masopust J, et al., 2013)

Dominantní alela: alela páru dominuje nad druhou alelou; exprimována je pouze dominantní alela, tj. kóduje příslušný protein. **Příklad:** alely $A/O \rightarrow$ fenotyp A.

Recesivní (potlačená) alela: je exprimována, tj. projeví se její efekt pouze v případě, že je přítomna na příslušných chromozomech v páru a osoba je tak pro tyto alely homozygotní. **Příklad:** alely O/O (nefunkční glykosyltransferázy) $\rightarrow$ fenotyp O.

Kodominantní alely: exprimují se 2 rozdílné alely. **Příklad:** alely $M/N \rightarrow$ fenotyp MN.

Němé (amorfní) alely: nevytvářejí žádný produkt v případě proteinových antigenů; v případě sacharidových antigenů nevytvářejí žádnou glykosyltransferázu.

Genotyp: kombinace genových alel, které se nacházejí na páru chromozomů.

Fenotyp: produkt alel, tj. vytvořené bílkoviny/glykosylační řetězce, v případě imunohematologie tedy krevní skupina, kterou detekujeme.

Exony: sekvence nukleotidů dané alely kódující finální protein.

Introny: sekvence nukleotidů dané alely umístěné mezi exony, ale nepřepisující se do finálního proteinu.

Promotor: sekvence DNA, na kterou se váže některá součást transkripčního aparátu, obvykle lokalizovaná na začátku genu. Změny v této oblasti regulují expresi daného genu (zeslabení, až úplné chybění).

Genové mutace – mění pořadí nukleotidů oproti normální sekvenci:

Bodová mutace – změna v rozsahu jednoho nukleotidu.

Delece – vynechání (ztráta) nukleotidu nebo několika nukleotidů v původní sekvenci. Jedná-li se o vynechání nukleotidů v násobku 3, tedy tzv. in-frame delece, má to za následek chybění aminokyseliny (nebo několika aminokyselin) v polypeptidickém řetězci. Chybění jiného počtu nukleotidů způsobí posun čtecího rámce, tzv. frameshift,

který vede ke vzniku předčasného terminačního kodonu a tím k tvorbě zkráceného nefunkčního proteinu. Jindy může naopak dojít k posunutí stop-kodonu a vzniku delšího proteinu s případným ovlivněním jeho funkce (např. evropská alela A_2). Deletovány mohou být i celé exony, popřípadě i geny (např. *RHD*).

Inzerce (adice) – vložení nukleotidu nebo několika nukleotidů do původní sekvence, což má za následek přidání aminokyseliny (nebo několika aminokyselin) do polypeptidického řetězce (jedná-li se o vložení nukleotidů v násobku 3, tedy tzv. in-frame inzerce). Přidání jiného počtu nukleotidů způsobí posun čtecího rámce, tzv. frameshift, viz výše (Delece).

Substituce – záměna jednoho nukleotidu za jiný.

Duplikace – zdvojení exonu nebo několika exonů daného genu.

Mutace missense (mutace měnící smysl) – záměna nukleotidu (substituce), která způsobí, že ve vznikajícím proteinu je jedna aminokyselina v řetězci nahrazena aminokyselinou jinou, což může, ale nutně nemusí mít za následek špatnou funkci proteinu.

Mutace nonsense (nesmyslná mutace) – záměna nukleotidu (substituce), která způsobí vznik předčasného terminačního kodonu a tím tvorbu zkráceného nefunkčního proteinu.

Alternativní sestřih (splicing) – vlivem různých typů mutací v oblastech intronů vznikají různé izoformy finálních proteinů (jsou vynechány rozdílné exony).

Genová konverze – sekvence v jednom genu je částečně nahrazena sekvencí z jiného genu.

Původní sekvence

A-A-A-G-G-G-C-C-C-T-T-T

Delece

A-A-A-G-_-G-C-C-C-T-T-T

Inzerce

A-A-A-G-G-T-G-C-C-C-T-T-T

Substituce

A-A-A-G-A-G-C-C-C-T-T-T

1.1.4 Terminologie krevních skupin

Systémy krevních skupin

Soubor příbuzných fenotypů definovaných lidskými protilátkami (na principu reakce antigen-protilátka) se společnými vlastnostmi:

- známou biochemickou podstatou,
- definovanou chromozomální lokalizací,
- identifikovaným a sekvenovaným genem (1 lokus nebo 2 či více úzce spojených genů).

V systému může být jen jeden antigen (např. H, I), ale i desítky antigenů (Rh, MNS).

Podkladem fenotypu je genetická informace – genotyp.

Je známo téměř 50 genů (některé systémy, např. Rh, MNS, mají více genů), cca 1700 alel.

Antitické antigeny: obvykle pár (ojediněle i více) antigenů kódovaných různými alelami jednoho genu. Např. v MNS systému může jedinec zdědit od jednoho rodiče alelu, která kóduje antigen M, nebo antigen N (ale ne oba z 1 genu). Tj. v místě genu MN

(GYPA) daného jedince může být alela buď pro antigen M, nebo pro antigen N. Dalšími takovými antitetickými páry jsou např. antigeny K a k, Jk^a a Jk^b, C a c, S a s apod.

Kolekce antigenů = série 200

Soubor dvou a více antigenů se sérologickou, biochemickou, eventuálně genetickou příbuzností, ale zatím nesplňujících všechna kritéria systému. Výjimkou je li kolekce (ISBT 207), kde je jediný Ag (i), protože dříve zařazený Ag I vytvořil nově systém I (ISBT 027) (podkladem těchto antigenů nejsou antitetické alely).

Pokud dojde k potřebnému doplnění informací, kolekce se mění na systém; zůstane-li po změně několik antigenů z původní kolekce nedefinovaných, kolekce zůstává; zůstane-li pouze jeden antigen, kolekce se ruší a antigen se řadí do série (viz níže).

Série antigenů

Antigeny zatím neodpovídající definovaným systémům a kolekcím.

LFA – ISBT série 700

Antigeny s nízkou frekvencí výskytu (low frequency antigens).

Výskyt méně než 1 % v populaci (obvykle výrazně méně než 1 %); viz podkapitola 2.28.

HFA – ISBT série 901

Antigeny s vysokou frekvencí výskytu (high frequency antigens).

Výskyt vyšší než 90 % v populaci (obvykle více než 99 %); viz podkapitola 2.29.

1.1.5 Terminologie antigenů

HTLA (high titer low avidity)

Antigeny definované protilátkami s vysokým titrem a nízkou aviditou (silou vazby), reakce jsou slabé, variabilní i nereprodukovatelné (zřejmě způsobeno slabou expresí antigenů). Plazma/sérum reaguje s inkompatibilními erytrocyty až do vysokého ředění, avšak všechny pozitivní reakce jsou slabé, včetně těch s neředěnou plazmou/sérem.

Jedná se o starší označení, navíc není zcela přesné, protože ne všechny protilátky proti antigenům daného systému mají vysoký titr a nízkou aviditu; viz podkapitola 2.31.

Endogenní a exogenní antigeny

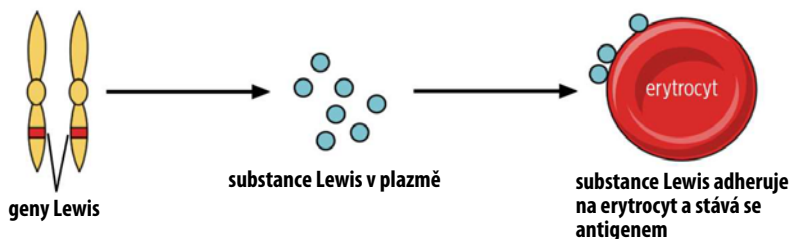
Antigeny endogenní: syntéza probíhá v erytrocytech, jsou zakotveny v membráně, patří sem většina systémů krevních skupin.

Antigeny exogenní: syntéza probíhá v jiných buňkách než erytrocytech, jsou adsorbovány na povrch erytrocytů (obr. 1.2), patří sem 2 systémy – Lewis a Chido/Rodgers.

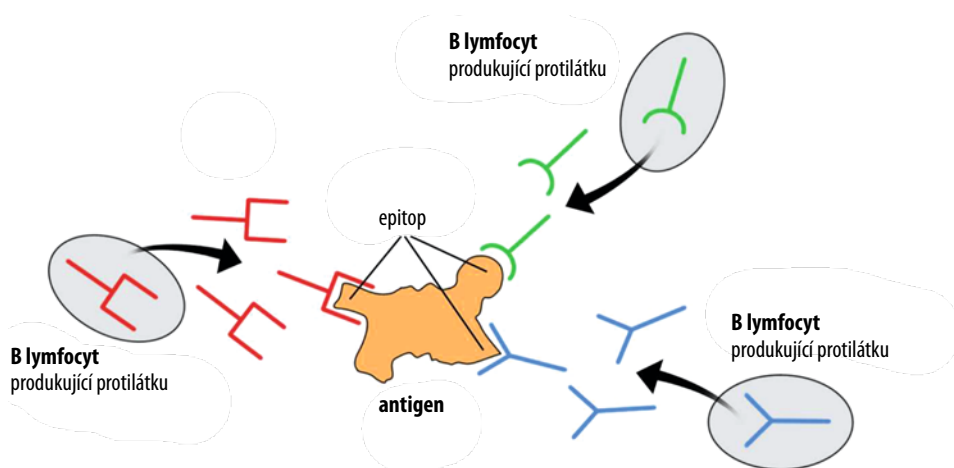
Epitop (antigenní determinanta)

Oblast antigenu, která reaguje s protilátkou (obr. 1.3).

Uskupení několika aminokyselin v závislosti na prostorovém uspořádání celého proteinu, odpovídající vazebnému místu jedné protilátky (u bílkovinných antigenů o velikosti 3–5 aminokyselin; u cukerných oblastí o velikosti jednoho oligosacharidu v terminální části glykosylujících řetězců, označuje se jako imunodominantní cukr).



Obr. 1.2 Příklad exogenního antigenu



Obr. 1.3 Schematické znázornění epitopů (zde antigen se 3 různými epitopy)

1.1.6 Terminologie pro zápis fenotypu a genotypu

Antigeny

a) „Klasická“

Písmena: A, B, M, N, C, c, S, s, K, k aj.

Zkratky s použitím horních či dolních indexů: C^w , Jk^a , Jk^b , Fy^a , Fy^b , A_1 , A_2 aj. Kombinace písmen a čísel: P1, JK3, LU6 aj.

b) ISBT

Antigenní systém má jednak alfabetický symbol (1–5 velkých písmen) a jednak symbol numerický (trojmístné číslo, v pořadí podle data definování, vzestupně).

Příklady: AB0 ... 001, RH ... 004, KEL ... 006, FY ... 008, JK ... 009 aj.

Antigen v systému má svůj numerický symbol (trojmístné číslo).

Příklady: antigen Jk^a ze systému Kidd: numericky 009001, kombinovaně JK1 (nadbytečné nuly se nepoužívají).

V rámci jednoho systému se může používat více typů značení: např. v Kell systému: K, k, Kp^a , Js^b , K_0 , K18, K19, VLAN aj.

V praxi se běžně používá „klasická“ terminologie; viz tabulka 2.53.

Fenotyp

a) „Klasická“

Označení antigenu a dosažený výsledek (pozitivní/negativní, + nebo –): např. C+, Jk^a+ U alelických párů antigenů s odlišením v horním indexu se používá zkrácený zápis:

Příklad: D+C+c-E-e+; M-N+S-s+; Jk(a+b-); Fy(a-b+).

Běžný zápis fenotypu však vypadá takto: D (obvykle se zapisuje společně s krevní skupinou AB0), Ce (event. CCee); N; s; Jk^a+ Jk^b-; Fy^a- Fy^b+

b) ISBT

Příklad: RH: 1,2, -3, -4,5; MNS: -1,2, -3,4; JK: 1, -2; FY: -1,2.

Genotyp

a) „Klasická“

Používají se kurzivou psané symboly antigenů.

Příklad: gen *K*, *k*; *Fy^a*; *RHce*.

b) ISBT

Příklad: *KEL*01*, *KEL*02*; *FY*01* nebo *FY*A*; *RHCE*ce*.

Haplotyp

Kombinace alel krevních skupin, které se dědí společně (typické např. pro Rh systém a MNS systém – viz podkapitoly 2.5 a 2.7).

Alely na jednotlivých chromozomech se oddělí lomítkem: např. *MS/Ns*, eventuálně *MNS*1,3/2,4*; *DCe/DcE*.

„Nulové“ fenotypy (absence všech antigenů daného systému)

a) „Klasická“

0_h, Rh_{null}, K₀, Lutheran-null, Colton-null aj.

b) ISBT

Pokud osoby s nulovým fenotypem produkují specifickou protilátku reagující se všemi antigeny „svého“ systému, lze použít zápis např. Scianna-null: SC: -1-2-3 nebo SC: -3.

„Nulové“ genotypy

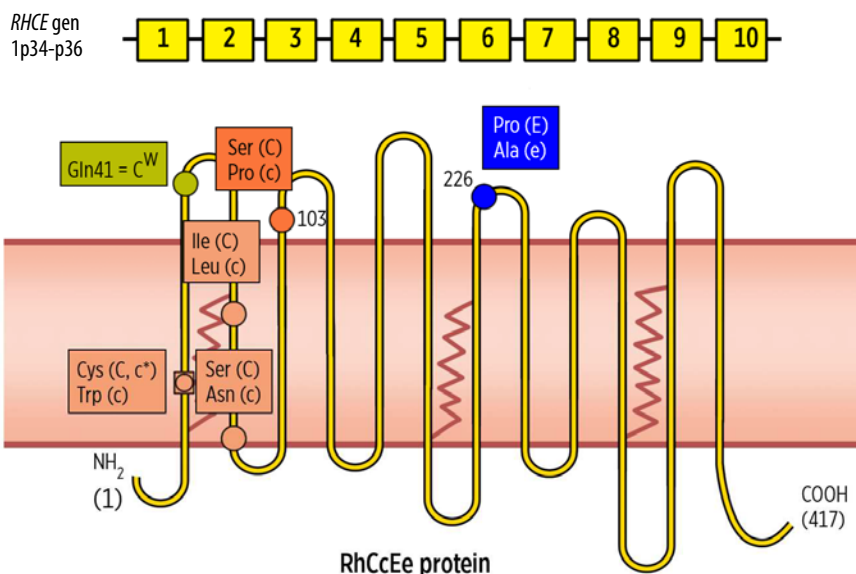
Alely se zapisují symbolem systému, eventuálně výchozí alely (je-li známa), písmenem N a chronologickým pořadím (je-li více genetických podkladů): *SC*01N.01*, *SC*01N.02* aj. Pozn. Frekvence uváděné u jednotlivých populací jsou přibližné, v rámci dané populace mohou kolísat. Významné odchylky jsou v textu (tabulkách) zdůrazněny.

1.1.7 Molekulární mechanismy vzniku rozdílných fenotypů

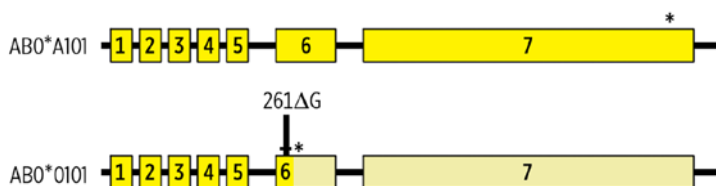
a) **Bodová mutace** (obr. 1.4): záměna aa „missense“ (C/c, E/e, C^w, K/k aj.), stop kodon – „nonsense“ (Gy(a-) aj.).

b) **Inzerce/delece – „frame-shift“** (obr. 1.5): 0 v systému AB0.

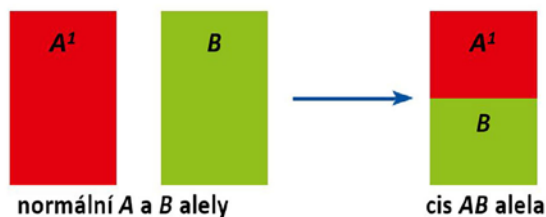
c) **Genové přestavby:** delece genu (D-), crossing-over (obr. 1.6), genové konverze (hybridní geny a proteiny ... Rh a MNS varianty aj.; obr. 1.7).



Obr. 1.4 Příklad bodové mutace – na pozici 226 je záměna aminokyselin prolin/alanin podkladem pro antigeny E/e; na pozici 103 je záměna aminokyselin serin/prolin podkladem pro antigeny C/c apod.



Obr. 1.5 Příklad inserce/delece – delece jednoho nukleotidu v A₁ sekvenci u ABO*O1.01 v pozici 261 má za následek vznik předčasného „stop kodonu“ a vytvoření pouhého fragmentu transferázy bez enzymové funkce



Obr. 1.6 Příklad crossing-over – alely A i B jsou vedle sebe na 1 chromozomu, obě alely se dědí současně, pak mohou mít např. rodiče A₁ [A¹O] a A₁B [A¹B/O] potomka O [OO]

D ^{IV} - IV		E233Q 697 G->C
D ^V - V		E233K 697 G->A
D ^V - VI		RHD-CE(5; F223V...V238M)-D
D ^V - VII		RHD-CE(5; F223V...V245L)-D
D ^{VI} - I		RHD-CE(4-5 226P)-D
D ^{VI} - II		RHD-CE(4-6)-D
D ^{VI} - III		RHD-CE(3-6)-D
D ^{VII}		L110P 329 T->C
DAR (ARRO-1)		T201R...F223V...J342T 602 C->G...667 T->G...1025 T->C
DBT - I		RHD-CE(5-7)-D
DBT - II		RHD-CE(5-9)-D
DCS		RHD-CE(5; F223V...226P)-D

Obr. 1.7 Příklad genové konverze – geny *RHD* a *RHCE* jsou na 1. chromozomu v těsné blízkosti a v opačné (5'3') orientaci, proto mohou vznikat hybridní geny, kde jsou vyměněny odpovídající sekvence DNA (v rozsahu od velké části genu zahrnující několik exonů /DVI/ až po výměnu pouze části jednoho exonu /DCS/)

1.1.8 Cis a trans pozice

Jeden gen působí na druhý a dochází ke snížení či zvýšení počtu antigenních míst („oslabení“ či „zesílení“ antigenu). Jsou-li oba geny umístěny na stejném chromozomu daného páru, jedná se o pozici cis (cis efekt), pokud jsou umístěny na opačných chromozomech daného páru, jedná se o pozici trans (trans efekt).

Příklad: V případě C v pozici trans (*Dce/(d)Ce*) dochází k „oslabení“ antigenu D, naopak při antigenu C v pozici cis (*DCe/(d)ce*) k „zesílení“ antigenu D.

Souhrn

1. Rozlišují se antigeny sacharidové a proteinové.
2. Systémy krevních skupin tvoří antigeny se známou biochemickou podstatou, chromozomální lokalizací a genem.
3. LFA se vyskytují v populaci s frekvencí < 1 % a HFA s frekvencí > 90 %.
4. Většina erytrocytových antigenů patří mezi endogenní antigeny, tj. syntéza probíhá v erytrocytech a jsou zakotveny v jejich membráně.
5. Genotyp je kombinace dvou genových alel, které se nacházejí na páru chromozomů.
6. Fenotyp je produkt alel, tj. vytvořená bílkovina nebo touto bílkovinou vytvořený sacharidový řetězec. Je jí např. krevní skupina, kterou detekujeme.

1.2 Antierytrocytové protilátky (protilátky proti antigenům krevních skupin)

Jsou to imunoglobuliny (Ig).

1.2.1 Imunoglobulinová molekula

Tetramer složený ze 2 identických lehkých (krátkých, **L** = light chain) a 2 identických těžkých (dlouhých, **H** = heavy chain) řetězců (označeno podle jejich relativní molekulové hmotnosti; jsou to polypeptidy) ve tvaru písmene Y. Lehké i těžké řetězce mají svou variabilní (**V**) a konstantní (**C**) část (oblast). Na konci oblasti V je hypervariabilní část, která ve spojení lehkého a těžkého řetězce vytváří vazebné místo pro antigen (CDR) (obr. 1.8).

Řetězce jsou tvořeny doménami o velikosti cca 110 aminokyselin, disulfidickým můstkem je vytvořena smyčka asi 60 aminokyselin.

Variabilní část (oblast): liší se mezi jednotlivými protilátkami složením aminokyselin, na aminových koncích řetězců. Variabilní části protilátky jsou zodpovědné za vazbu k antigenu. Díky variabilitě těchto oblastí existují různé varianty protilátek.

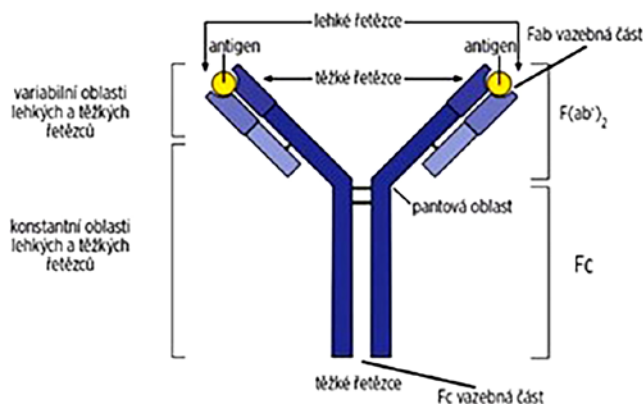
Konstantní část (oblast): je neměnná, na karboxylovém konci.

Disulfidické můstky: spojují řetězce.

Lehké řetězce: kappa (κ) a lambda (λ).

Těžké řetězce: α , γ , δ , ϵ , μ . Podle typu těžkého řetězce rozdělujeme protilátky do pěti tříd, tzv. izotypů. Konstantní oblasti těžkých řetězců jsou identické u všech protilátek stejného izotypu, ale liší se u protilátek různých izotypů. Variabilní oblast těžkého řetězce se liší u protilátek produkovaných různými B lymfocyty, ale jsou stejné u protilátek produkovaných jednotlivým B lymfocytom nebo klonem jednoho B lymfocytu. Na těžkých řetězcích Ig se vyskytují pantové oblasti, které zvyšují vazebné vlastnosti protilátkových molekul.

Některé imunoglobulinové molekuly se spojují řetězci J a vytvářejí dimery nebo pentamery (viz také podkapitola 1.2.2).



Obr. 1.8 Molekula imunoglobulinu

Molekulu protilátky lze rozdělit na:

Fab fragment (fragment antigen binding): dvě části obsahující rozvětvená ramena (celý lehký a část těžkého řetězce), vážou antigen, jsou nositeli protilátkové specifity.

Fc fragment (fragment crystallizable): zbývající část těžkých řetězců, zajišťuje molekule Ig její specifické biologické vlastnosti, váže se na receptory některých buněk imunitního systému (např. Fc receptory monocytů a makrofágů). Obsahuje také vazebná místa pro složky komplementu.

1.2.2 Typy protilátek

Třídy a podtřídy

Třídy (tab. 1.1 a 1.2; obr. 1.9):

IgM,

IgG,

IgA: v imunohematologii se uplatňují jen výjimečně,

IgD, IgE: v imunohematologii se neuplatňují.

Podtřídy:

IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2.

Tab. 1.1 IgG a IgM

IgG	IgM
malá molekula (150 000 daltonů)	velká molekula (900 000 daltonů)
inkompletní protilátka	kompletní protilátka
klinicky důležitá	klinicky méně důležitá (s výjimkou anti-A, anti-B)
může procházet placentou	nemůže procházet placentou
obvykle tepelná, optimální teplota reakce je 37 °C	obvykle chladová, optimální teplota reakce < 20 °C (proto jen vzácně způsobuje hemolýzu <i>in vivo</i>)

Dělení protilátek podle teploty

- Tepelné:** optimálně reagují při 37 °C; většinou třídy IgG; způsobují destrukci erytrocytů při tělesné teplotě.
- Chladové:** optimálně reagují při teplotách pod 20 °C; většinou třídy IgM; navazují se na erytrocyty v částech těla vystavených nízké teplotě (např. v zimě).
- Bifazické:** vážou se na antigen při nízkých teplotách a při teplotách kolem 37 °C dochází k hemolýze erytrocytů (viz podkapitola 7.8).

Další viz podkapitola 1.3.

Kompletní a inkompletní protilátky (obr. 1.10)

- Kompletní protilátky:** třídy IgM, propojí dva erytrocyty v solném prostředí.
- Inkompletní protilátky:** třídy IgG, nemohou způsobit přímou aglutinaci, propojení dvou erytrocytů se dosáhne za pomoci dodatečných faktorů (např. použitím AGH nebo snížením povrchového napětí erytrocytů vedoucím ke zkrácení vzdálenosti mezi buňkami apod.).

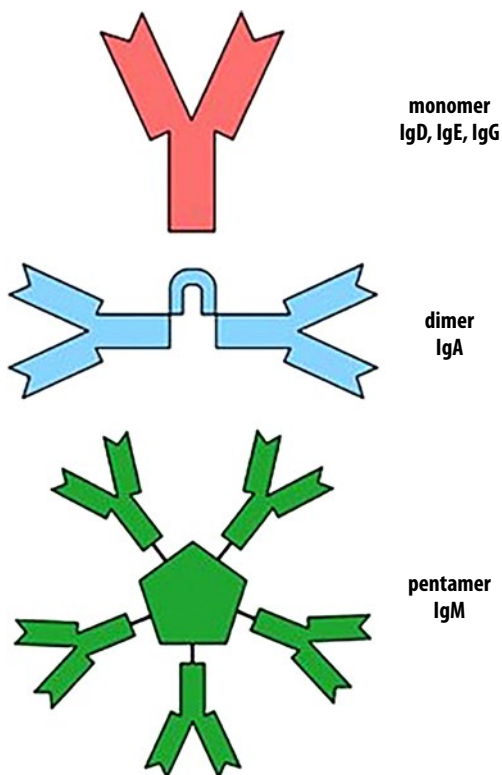
Tab. 1.2 Třídy Ig a jejich funkce

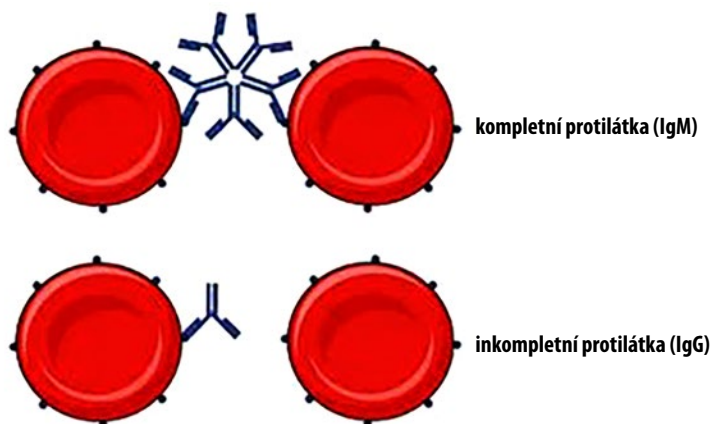
Izotyp	Těžký řetězec	Lehký řetězec	Konfigurace	Počet vazebných míst	Fixace komplexu	Reakce s Fc receptory	Průchod placentou	Destrukce erytrocytů
IgM	μ	κ, λ	pentamer	10^1	+++	L	–	ano
IgG1	$\gamma 1$	κ, λ	monomer	2	+++	N, M, L, E, T	++	ano ²
IgG2	$\gamma 2$	κ, λ	monomer	2	+	L, T	+/-	vzácně
IgG3	$\gamma 3$	κ, λ	monomer	2	+++	N, M, L, E, T	++	vždy
IgG4	$\gamma 4$	κ, λ	monomer	2	–	N, L, T	+	ne
IgA1	$\alpha 1$	κ, λ	monomer	2	–	M	–	vzácně
IgA2	$\alpha 2$	κ, λ	dimer	4	–	M	–	vzácně
IgD	δ	κ, λ	monomer	2	–		–	ne
IgE	ϵ	κ, λ	monomer	2	–	B, E, L	–	ne

B = bazofily, E = eozinofily, L = lymfocyty, M = makrofágy, N = neutrofil, T = trombocyty,

¹ Prakticky je využitelných pouze 5, ostatní jsou prostorově blokována.

² V případě navázání dostatečného množství molekul IgG1 na erytrocyty.

**Obr. 1.9** Monomer, dimer, pentamer



Obr. 1.10 Kompletní a inkompletní protilátka

Přirozené, imunní a pasivně přenesené protilátky

a) Přirozené: není přítomen žádný imunizační podnět související s alogenními erytrocyty (jako je transfuze, těhotenství apod.). Zřejmě jejich tvorbu způsobuje vystavení organismu antigenům prostředí, bakterií nebo virů (tvoří se pod vlivem antigenů, které jsou strukturou podobné krevněskupinovým antigenům – většinou pocházejí ze střevních bakterií); obvykle optimálně reagují při nižších teplotách a jsou třídy IgM.

b) Imunní:

- příčiny: po styku s antigenem, který není přítomen v organismu daného jedince – těhotenství, transfuze, transplantace, injekce imunogenního materiálu;
- frekvence: u zdravých dárců je velmi nízká, u chronicky transfundovaných pacientů (s talasemií, srpkovitou anémií) může dosahovat až 50 %; obecně se uvádí frekvence potransfuzní aloimunizace červené řady 2–10 %; u pacientů s již vytvořenými protilátkami je 3–4× vyšší riziko tvorby dalších protilátek jiné specifity;
- primární imunizace: organismus se doposud s daným antigenem nesetkal;
- sekundární imunizace: organismus už byl daným antigenem imunizovaný a došlo k dalšímu imunizačnímu podnětu tím samým antigenem.

Vlastní imunitní odpověď může být různě dlouhá (dny až týdny), záleží na daném jedinci, antigenu i na dávce antigenů; sekundární odpověď bývá rychlá; mnoho antigenů je slabě imunogenní – jedinec proti nim netvoří protilátky; existují i tzv. „nonrespondéři“, kteří na daný imunizační podnět nereagují. Obvykle nejlépe reagují při 37 °C a jsou třídy IgG.

Vliv chorob na tvorbu aloprotilátek

- Vyšší riziko tvorby aloprotilátek po opakovaných transfuzích: autoimunitní choroby (např. AIHA s tepelnými protilátkami, systémový lupus erythematosus), akutní myeloidní leukemie, aplastická anémie, solidní zhoubné nádory, diabetes mellitus.
- Nižší riziko tvorby aloprotilátek po opakovaných transfuzích: chronická lymfocytová leukemie, hemodialyzovaní pacienti.

Jsou však studie, které neprokazují asociaci mezi tvorbou aloprotilátek a chorobami a za primární faktor tvorby aloprotilátek považují genetické predispozice.

Tvorba imunních protilátek u dětí v prvních měsících života

Obvykle se aloprotilátky netvoří, ale byly zaznamenány případy vytvořených aloprotilátek po opakovaných transfuzích (např. anti-E, anti-K apod.).

- c) **Pasivně přenesené:** podáním imunoglobulinu (nejčastěji po profylaktickém podání anti-D), dárkové plazmy, lymfocytů z transplantovaného orgánu nebo hematopoetických buněk.

Pravidelné a nepravidelné protilátky

- a) **Pravidelné:** vyskytují se pravidelně – očekávaně – v lidské plazmě/séru; jsou to protilátky anti-A, anti-B.
- b) **Nepravidelné:** všechny ostatní protilátky kromě anti-A, anti-B; dále je dělíme na alogenní a autologní protilátky.

Alogenní a autologní protilátky

- a) **Alogenní protilátka (aloprotilátka):** protilátka proti antigenu, který u daného jedince není přítomen; protilátka může reagovat pouze s erytrocyty nesoucími daný antigen, ale ne s erytrocyty jedince, který tyto protilátky vytvořil.
- b) **Autologní protilátka (autoprottilátka):** protilátka proti antigenu, který nese na svých erytrocytech daný jedinec; protilátka často reaguje s většinou diagnostických i dárkových erytrocytů.

Afinita protilátky

Vyjadřuje sílu asociace (vazby) mezi určitým epitopem antigenu a vazebným místem určité protilátky.

Avidita protilátky

Vyjadřuje sílu interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem, tj. pevnost vazby antigen-protilátka. Je funkcí afinity všech vazebných míst protilátek a antigenních determinant (epitopů), tj. je dána afinitou protilátky k antigenu a počtem zároveň se uplatňujících vazebných míst. Platí, že když se komplexní antigen nesoucí mnoho epitopů smíchá s protilátkami nesoucími mnoho paratopů, interakce antigen-protilátka na jednom místě zvýší pravděpodobnost reakce na dalším místě. Protilátky ve vysoké koncentraci, ale s nízkou aviditou mohou mít menší klinický význam než menší množství protilátky s vysokou aviditou.

Stanovení avidity: principem stanovení avidity je zjištění, do jaké míry naruší denaturační činidlo (např. urea) pevnost vazby mezi antigenem a protilátkou. Protilátky s nízkou afinitou jsou z vazby na antigen působením činidla uvolněny a odstraněny promývacím cyklem. Protilátky s vyšší afinitou odolávají působení denaturačního činidla a z vazby se tak snadno neuvolní.

AGH

Antiglobulinové sérum (serum antiglobulinum humanum), sekundární protilátky, které se vážou na primární protilátky nebo na složku komplementu.

a) Monospecifické:

- **anti-IgG** = sekundární protilátka, která se naváže na Fc konec primární IgG navázané na jednom erytrocytu a zároveň na Fc konec IgG navázané na jiném erytrocytu,
- **anti-C3d** = protilátka, která se váže na C3d aktivovanou složku komplementu navázanou na sousedících erytrocytech,
- **anti-IgA, anti-IgM,**
- **anti-C3c.**

b) Polyspecifické: obsahuje **anti-IgG** a **anti-C3d**.

1.2.3 Klinická významnost krevněskupinových protilátek

Mohou způsobovat:

- a) potransfuzní reakci (potransfuzní hemolytickou reakci, aloimunizaci),
- b) hemolytické onemocnění plodu/novorozence,
- c) autoimunitní hemolytickou anémii.

Závisí na:

- a) **optimální teplotě reakce:** tepelné vs. chladové protilátky (viz podkapitola 1.2.2),
- b) **imunoglobulinové třídě a podtřídě:** viz podkapitola 1.2.2,
- c) **schopnosti vázat komplement:** IgM, které vážou komplement, mohou způsobit intravaskulární hemolýzu, protože po fixaci komplementu dojde k aktivaci celého komplementového systému; protilátky, které způsobují intravaskulární hemolýzu, jsou: anti-A, anti-B, anti- Vel , anti-P, anti-P1, anti-Tj^a (anti-PP1P^k), anti-Le^a i anti-Le^b (výjimečně). Většina protilátek třídy IgM jsou chladové protilátky, které často mají svůj hemolytický účinek omezen. Některé protilátky třídy IgG rovněž vážou komplement, např. anti-Jk^a a anti-Jk^b. Tyto protilátky jsou aktivní při 37 °C a mohou rovněž způsobovat intravaskulární destrukci erytrocytů,
- d) **urychlené tvorbě protilátek** po opakované antigenní stimulaci: sekundární imunitní odpověď (protilátky nejsou detekovatelné, po opětovném kontaktu s antigenem se prostřednictvím paměťových lymfocytů rychle tvoří velké množství protilátek dané specificity).

Souhrn

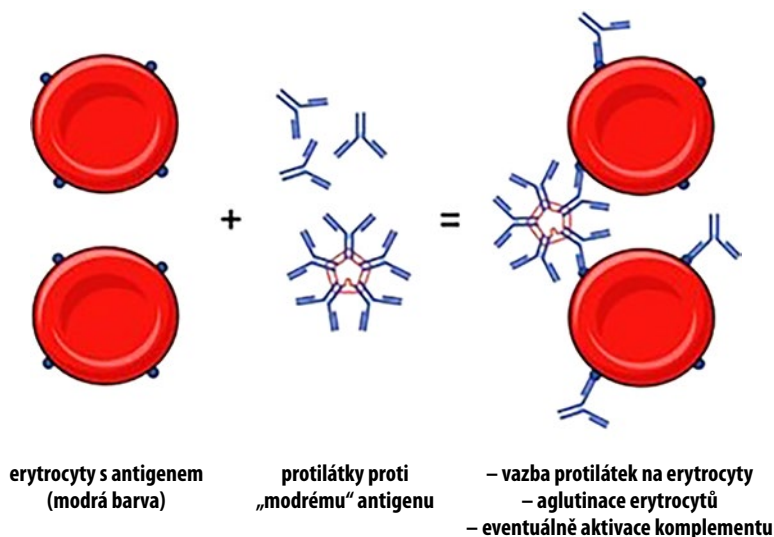
1. V imunohematologii se uplatňují protilátky třídy IgM a IgG, výjimečně také IgA.
2. Protilátky rozdělujeme podle teploty, při které optimálně reagují, na tepelné, chladové a bifazické.
3. Inkompletní protilátky k tomu, aby propojily erytrocyty, potřebují ovlivnit reakci např. přidáním AGH, snížením povrchového napětí erytrocytů aj.
4. Existují protilátky přirozené, imunní a pasivně přenesené.
5. Alogenní protilátka působí proti cizímu, autologní proti vlastnímu antigenu.

1.3 Reakce antigenu a protilátky

Chemická reakce (obr. 1.11) malého místa glykoproteinové molekuly protilátky (na Fab zakončení) – paratopu s vazebnými místy – s epitopy na povrchu membrány erytrocytu.

Epitop je malá oblast antigenu, která reaguje s vazebným místem příslušné protilátky.

Paratop je oblast variabilní části protilátky, jež se specificky váže na epitop antigenu.



Obr. 1.11 Reakce antigen-protilátka

Tuto vazbu ovlivňují následující faktory:

a) Teplota

Polární vazba antigen-protilátka (výměna elektronů mezi donorskou a akceptorskou molekulou) – ve vodném prostředí dochází k tvorbě vodíkových můstků. Tato reakce je exotermní, a tudíž silnější za nižších teplot. V této vazbě se uplatňují hlavně sacharidové antigeny.

Hydrofobní vazba antigen-protilátka – optimální při vyšších teplotách. V této vazbě se uplatňují především proteinové antigeny.

Bifazické protilátky: viz podkapitola 1.2.2.

b) Iontová síla prostředí

Oba typy protilátkových vazeb (polární a hydrofobní) jsou ovlivňovány ionty v reakčním prostředí – tyto totiž vytvářejí „obaly“ kolem opačně nabitých oblastí antigenů a protilátek a znesnadňují jejich interakci.

Běžným diluentem pro reakce je izotonický fyziologický roztok.

Pokud se použije roztok s nižším obsahem Na^+ a Cl^- iontů (low ionic strength solution – LISS), dosáhne se potřebných vazeb antigenů a protilátek rychleji.

c) pH

Většina protilátkových reakcí probíhá optimálně při hodnotách pH kolem 7 – za této situace mají protilátky slabě pozitivní náboj, což je vzhledem k negativnímu náboji erytrocytů optimální. Při výraznějším snížení pH může dojít až k disociaci protilátkové vazby (toto se využívá při kyselé eluci), což by mohlo vést k falešně negativním výsledkům. K udržení optimálního pH pro reakce se doporučuje provádět laboratorní testy v prostředí pufrovaného fyziologického roztoku (PBS). Ojedinelé typy protilátek pro správnou reaktivitu vyžadují kontrolovanou úpravu pH (acidifikace séra je třeba k detekci některých protilátek anti-M).

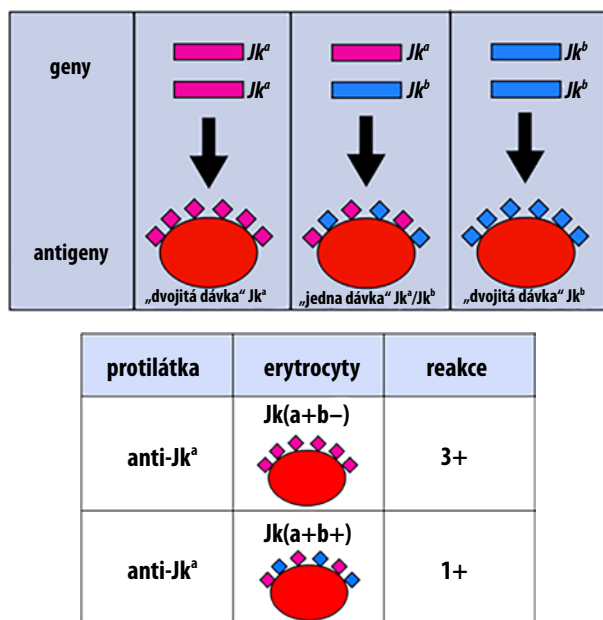
d) Kvalitativní a kvantitativní vlastnosti antigenů a protilátek

Dostupnost antigenu pro vazbu protilátky je závislá na jeho **vzdálenosti** od povrchu membrány a na jeho případném zakrytí/odkrytí jinými strukturami.

Třída, podtřída a glykosylace protilátky mají vliv na její velikost a „ohebnost“, faktory ovlivňující její cestu „lesem“ struktur na vnější straně membrány k cílovému antigenu.

Hustota exprese antigenu na membráně také ovlivňuje výsledek reakce, stejně jako **koncentrace protilátek**. Pro optimální výsledky laboratorních testů je potřebný nadbytek protilátek nad antigeny. Pro IgG protilátky v LISS je empiricky stanoven minimální potřebný poměr plazma/sérum : erytrocyty 40 : 1, pro méně citlivý test (např. v prostředí PBS) musí být k zachycení stejně slabé protilátky v reakci 2× až 4× větší objem plazmy/séra.

Fenomén prozóny: slabá až falešně negativní reakce při extrémním nadbytku protilátek, kdy protilátky obsadí všechny antigeny na jednom erytrocytu a nezbyvá antigen,



Obr. 1.12 Efekt dávky – princip

který by využila „přemostující“ protilátka. Naředění vyšetřovaného materiálu v tomto případě vede k zesílení reakcí.

Efekt dávky (obr. 1.12): protilátka vykazuje výrazně silnější pozitivní reakci s erytrocyty s homozygotní než heterozygotní expresí komplementárního antigenu (viz také kapitoly 2 a 4).

Příklad: u fenotypu MM (genotypu *MM*) je na erytrocytech přítomno větší množství antigenu M než u heterozygotů MN (*MN*), síla reakce protilátky anti-M s erytrocyty MM je např. 3+, s erytrocyty MN 1+. Podobně u fenotypu Jk(a+b-) či Jk(a-b+) je přítomno větší množství („dvojitá dávka“) antigenu Jk^a, případně Jk^b než u heterozygotů Jk(a+b+) – viz obr. 1.12.

Nezřídka protilátky reagují pouze s erytrocyty s homozygotní expresí komplementárního antigenu.

1.3.1 Důsledky interakce antigen-protilátka *in vivo*

Funkcí protilátek je odstraňovat „cizí“ elementy z „vlastního“ organismu. Při destrukci erytrocytů působením protilátek jsou dosud popsány 3 mechanismy:

- aktivace komplementové kaskády – vede jak k intravaskulární, tak extravaskulární hemolýze,
- fagocytóza erytrocytů s navázanými IgG protilátkami s následnou extravaskulární hemolýzou,
- přímé ovlivnění stability membrány vazbou protilátek.

Komplementová kaskáda

Aktivace proteinů komplementu, která funguje na principu zymogen/enzym, slouží primárně k obraně organismu proti patogenům (obr. 1.13).

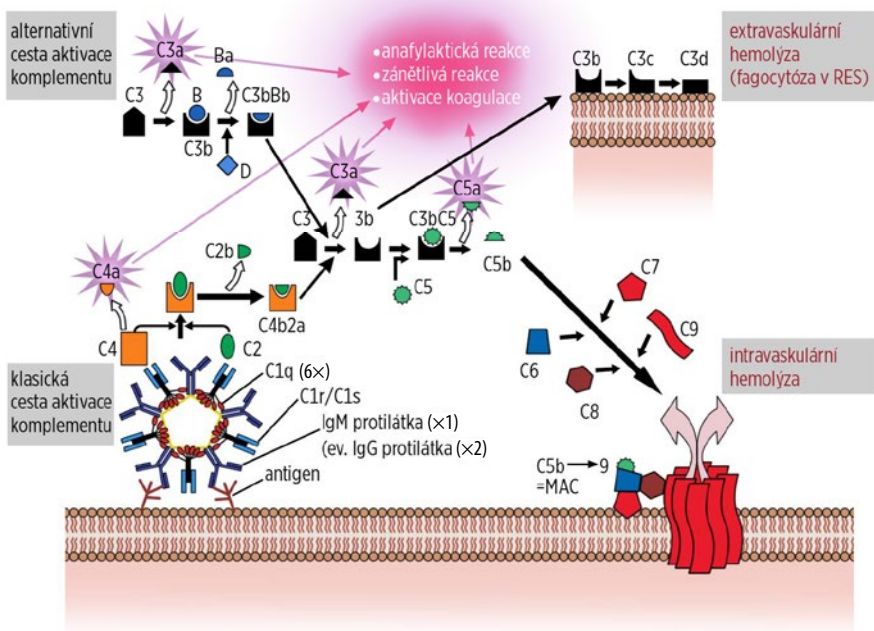
Klasická cesta aktivace komplementu: je zahajována reakcí antigen-protilátka.

Alternativní cesta: aktivátorem jsou přímo povrchy mikrobiálních patogenů, nádorových buněk, různých membrán aj. bez účasti protilátek.

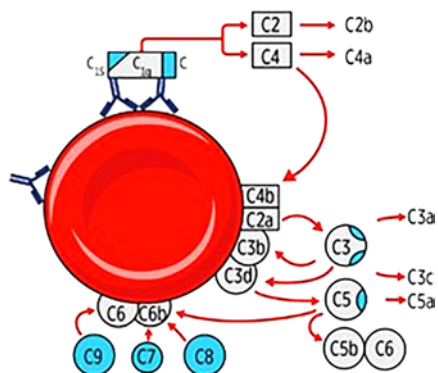
Při aktivaci komplementové kaskády (obr. 1.14 a 1.15) při vazbě protilátek na antigeny erytrocytové membrány jsou **účinnější protilátky třídy IgM**, protože se díky své pentamerické struktuře mohou jednotlivé podjednotky téhož imunoglobulinu navázat na antigeny v těsné blízkosti, a tím splnit podmínku iniciální fáze aktivace. Při této fázi se totiž musí ocitnout dva Fc konce imunoglobulinových molekul, jejichž Fab konce jsou navázány na antigeny, v těsné blízkosti a mezi nimi dochází k aktivaci 6 podjednotek C1q spolu s podjednotkami C1r a C1s. Vzniklý komplex následně aktivuje složky C2 a C4, které dále působí aktivaci složky C3.

Masivní aktivace: např. u inkompatibility AB0 dochází k překonání regulačních mechanismů a k interakci složek komplementu C5, C6, C7, C8 a C9.

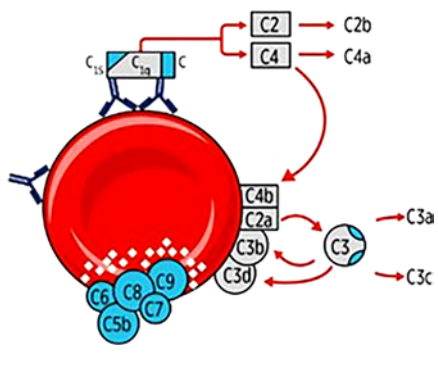
Protilátka (vázající komplement) se naváže na antigen, na protilátku se naváže složka C1. Složka C1 se aktivuje a následně aktivuje složku C4, která se štěpí na C4a a C4b; C4b se naváže na erytrocytovou membránu a aktivuje C2; C2 se štěpí na C2a a C2b; C2a se váže na erytrocytovou membránu. Dojde k aktivaci C3. Pak se aktivují C5, C6, C7, C8 a C9. Tyto aktivované složky vytvoří komplex, který se zabuduje do buněčné membrány a vytvoří v ní otvor, kterým dochází ke komunikaci s extracelulárním prostředím a následně k ruptuře membrány (lýza buňky). Během aktivace komplementu



Obr. 1.13 Schéma kaskády aktivace komplementu a jejích biologických důsledků (upraveno podle: Řeháček V, Masopust J, et al., 2013)



Obr. 1.14 Komplementový systém – aktivace až k C9



Obr. 1.15 Komplementový systém – aktivace až k C9 s intravaskulární hemolýzou

jsou uvolňovány fragmenty C4a, C3a a C5a, které mají anafylaktické, prozánětlivé a prokoagulační účinky a jsou zodpovědné za možný rozvoj šokového stavu, DIC, disseminované intravaskulární kouagulace (disseminated intravascular coagulopathy), a renálního selhání při akutní potransfuzní reakci.

Mírnější aktivace: např. non-AB0 inkompatibility, AIHA aj. Po navázání protilátky na antigen probíhá aktivace komplementu stejně jako u masivní aktivace, ale dochází k jejímu zastavení ve fázi aktivace složek C3, přičemž C3b složka adhezuje na povrch

erytrocytů, je postupně degradována na složky C3c a C3d a působí opsonizačním efektem – indukuje fagocytózu a extravaskulární destrukci erytrocytů.

Pro aktivaci komplementu, kromě jiného, jsou důležité vápníkové ionty (Ca^{2+}). Po odstranění vápníku (např. odběrem krve do EDTA) k aktivaci komplementu nedojde.

Komplement ztrácí aktivitu zahřátím (30 minut při 56 °C) = inaktivace; ale i při nízké teplotě (2–3 dny při 4 °C).

Aktivaci komplementu mohou bránit některé plazmatické **inhibitory**, například:

C1 inhibitor = blokuje aktivaci C1 složky.

Proteiny **RCA** (regulators of complement activation), jiným názvem CCP (complement control proteins) = svou interakcí se složkami komplementu (např. C3b, C4b, C2a) v raných fázích rozvoje komplementové kaskády brání vzniku konvertáz.

Intravaskulární a extravaskulární hemolýza

Intravaskulární hemolýza

Protilátky, které vážou komplement a vedou k aktivaci celého komplementového systému, počínaje složkou C1 až po C9, jsou schopny indukovat poškození buněčné membrány. Vytvořený MAC (membrane attack complex) je schopen proděravět erytrocytovou membránu a způsobit únik hemoglobinu z erytrocytu (cytolýza). Hemolýza takto nastává přímo v krevním oběhu.

Tento efekt způsobují zejména komplement vázající protilátky třídy IgM. Laboratorní testy (*in vitro*) při 37 °C vykazují obvykle hemolýzu. Znamená to, že hemolýza *in vitro* je velmi důležitým vodítkem!

Extravaskulární hemolýza

V případě destrukce erytrocytů nepřímým způsobem probíhá hemolýza extravaskulárně ve slezině nebo v játrech. Za tento způsob destrukce jsou zodpovědné dva rozdílné procesy:

A. Destrukce ve slezině (lienální hemolýza)

Erytrocyty s navázanými protilátkami třídy IgG se vážou k Fc receptorům na membráně makrofágů. Tyto receptory reagují s Fc částí protilátek IgG, odtud jejich název. Erytrocyty, které adherují k makrofágům, jsou cytotoxicky destruovány vně makrofágové membrány nebo jsou fagocytovány. Tento proces se odehrává převážně ve slezině. Nedochozí k aktivaci komplementu.

B. Destrukce v játrech (intrahepatální hemolýza)

Protilátky vážou komplement, dochází k jeho aktivaci až po C3. Nenastává přímá lýza erytrocytů. Na jejich membráně zůstává navázaný C3b. Na makrofázích je receptor pro C3b, ke kterému tyto erytrocyty adherují, což následně vede k fagocytóze. C3b se postupně degraduje na C3c a C3d. Tento proces se odehrává v játrech.

V játrech mohou být destruovány i erytrocyty s navázanými protilátkami třídy IgM, které neaktivují komplement.

Fagocytóza senzibilizovaných erytrocytů

Senzibilizací označujeme „označkování“ erytrocytů IgG protilátkami a/nebo C3 složkou komplementu. Monocyty a makrofágy v monocytomakrofágovém systému (MMS)

jsou vybaveny receptory pro rozpoznání tohoto „označkování“ (Fc receptory reagují s Fc koncem protilátkové IgG molekuly, CR1 a CR3 rozpoznávají na membráně naadherované C3 složky komplementu).

Protilátkami indukovaná destrukce erytrocytů – imunitní hemolýza

Vazba protilátek na erytrocyty má za následek destrukci erytrocytů, přičemž mechanismy této destrukce a její intenzita se v jednotlivých případech liší – v závislosti na kombinaci dalších determinujících faktorů. Těmito faktory jsou jednak **parametry protilátky** (kvantita, specificita, třída, podtřída, glykosylace molekuly Ig aj.), jednak **vlastnosti antigenu** (síla a erytrocytová/tkáňová/plazmatická specificita exprese antigenu) a konečně **účinnost efektorových mechanismů hemolýzy** (pohotovost k aktivaci komplementové kaskády, eventuálně (ne)schopnost její účinné regulace, „citlivost“ membrány ke komplementové hemolýze, účinnost monocytů a makrofágů v MMS při extravaskulární hemolýze – stav daných orgánů, polymorfismy Fc a CR receptorů, ovlivnění léčbou aj.). Protilátková destrukce erytrocytů má za přímý následek pokles jejich počtu (nedostatečná terapeutická odpověď na transfuze u aloprotilátek, anemizace u působení autoprotilátek) a kromě toho dochází k systémovým i lokálním reakcím, způsobeným uvolněním nejrozličnějších biologicky aktivních molekul v průběhu aktivace komplementu a rozpadu buněk (cytokiny, vazoaktivní látky, aktivátory koagulace aj.).

Klinické projevy: od téměř bezpříznakového průběhu přes mírnější anémie, zvýšenou potřebu transfuzní substituce (může být komplikovaná u vzácných fenotypů), mírné zhoršení zdravotního stavu (může být ale kritické pro pacienty s malou vitální rezervou) až po fatální (smrtelné akutní potransfuzní reakce, hydrops a úmrtí plodu *in utero*, fulminantní AIHA).

Přímé ovlivnění vlastností membrány působením vazby protilátek

Antiglykoforinové protilátky vazbou na sousedící molekuly GPA způsobují přechodnou změnu uspořádání membránového fosfatidyletanolaminu a vznik kation-prostupných (Ca^{2+}) lipidových pórů, destabilizaci membrány a rozpad erytrocytů. Uvedený mechanismus se uplatnil u klinicky velmi těžké AIHA, jeho uplatnění však není vyloučeno i u aloimunitních inkompatibilních stavů.

1.4 Polyaglutinabilita, pseudoaglutinace

1.4.1 Polyaglutinabilita

Modifikované či jinak abnormální erytrocyty nemocného se shlukují s většinou plazem/sér kromě vlastní plazmy/vlastního séra bez ohledu na krevní skupinu.

Rysy erytrocytů

- Aglutinují s plazmou/sérem většiny dospělých.
- Neaglutinují s pupečnickovým sérem.
- Neaglutinují s vlastní plazmou/sérem.
- Rozdílně aglutinují s lektiny.

Na těchto erythrocytech se nalézají tzv. kryptantigeny T, Th, Tk, Tx, Tn, které za normálního stavu membrány nejsou dostupné.

V plazmě/séru většiny osob jsou přítomny protilátky (většinou IgM) proti těmto kryptantigenům, pravděpodobně jako anamnestické protilátky po běžných infekcích.

Antigen T: na erythrocytech je normálně maskovaný = překrytý antigeny M a N (přesněji jejich N-acetylneuraminovou kyselinou).

Antigen Tn: je hlouběji uložený než antigen T.

Antigeny T, Tn, Tk přítomné na epitelových buňkách jsou také markery zhoubných nádorů (jsou vyjádřeny na rakovinových buňkách).

Typy polyaglutinability

A. Získané

- **1. typu T** = mikrobiální, fenomén Hübenerův-Thomsenův-Friedenreichův

Princip: aktivace T a Tk (Th, Tx) receptoru virovými či bakteriálními enzymy (jejich působením se odkryjí kryptantigeny – T, Th, Tk, Tx...)

Příčina:

in vitro = mikrobiální kontaminace krve ve zkumavce (cca po 3–4 dnech skladování),

in vivo = sepse či jiné těžké infekce

Patří sem i průkaz získaného antigenu B u osob krevní skupiny A působením bakterií. Zřejmě souvisí s hemolyticko-uremickým syndromem (hlavně pneumokoková infekce).

Mechanismus:

- a) působením enzymů – neuraminidázy (eventuálně sialidázy) – dochází k odštěpení N-acetylneuraminové kyseliny z antigenu M, eventuálně antigenu N – odhalí se antigen T (*Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, pneumokoky aj.),
- b) působením endo-beta-galaktosidázy se odhalí antigen Tk (*Bacteroides fragilis*, *Candida albicans*, pneumokoky u dětí aj.),
- c) Th receptor = dochází k odštěpení sialoglykoproteinu (*Corynebacterium aquaticum* aj.).

Každá plazma/sérum kromě pupečnickové krve obsahuje přirozené protilátky anti-T (vytvářeny neustálou stimulací bakteriální flórou – kontakt nebo symbióza), tyto plazmy/séra tudíž shlukují erythrocyty s demaskovaným antigenem T (i v negativní kontrole).

Imunodominantní cukr antigenu T = β -D-galaktóza.

Jiný možný mechanismus: adsorpce bakterie či produktů bakterií na erythrocyty tak, že jsou aglutinovány séry, která obsahují specifické protilátky.

Perzistující Tx: raritně popsána u MDS.

- **2. typu Tn** = nemikrobiální

Princip: aktivace Tn receptoru (odkrytí kryptantigenu Tn)

Příčina: myelodysplazie, preleukemické stavy, AML. Vzácně se objevuje i u zdravých jedinců.

Mechanismus: výsledek inkompletní biosyntézy COOH částí MN glykoproteinu, způsobené somatickou mutací klonu nebo klonů hemopoetických prekurzorových buněk = chybí T transferáza nezbytná pro konverzi antigenu Tn na antigen T. Syntéza M a N je blokována ve fázi Tn.

Anti-Tn je ve většině dospělých plazem/sér.

V krvi jsou přítomny 2 populace erytrocytů – některé klonů produkují normální buňky, některé Tn+ buňky (obraz smíšeného pole).

Imunodominantní cukr antigenu Tn = α -N-acetylgalaktosamin, biochemicky blízký antigenu A, tudíž některé protilátky anti-A mohou zkříženě reagovat (aglutinace A- Tn+ erytrocytů).

Klinika: může být přítomna hemolytická anémie, leukopenie, trombocytopenie.

B. Geneticky podmíněné (vrozené)

- Cad (Sda++) – viz podkapitola 2.25,
- CDA II (kongenitální dyserythropoetická anémie typu II) neboli HEMPAS (Hereditary Erythroblastic Multinuclearity with a Positive Acidified Serum lysis test) – erytrocyty s abnormální membránou, zvýšené množství antigenu i, normální I a snížené množství antigenu H, ve dřeni až 90 % erytroblastů s 2–7 nukleoly; způsobeno mutací genu *SEC23B*,
- NOR (P1PK4) – velmi vzácné, příčinou je mutace genu *A4GALT*, viz podkapitola 2.6,
- Hyde Park: někdy se vyskytuje hemoglobin M Hyde Park.

Imunodominantní cukr = N-acetylgalaktosamin.

Klinika: Hyde Park = cyanóza způsobená akumulací methemoglobinu.

HEMPAS = hemolytická anémie.

C. Nejasné

VA polyaglutinabilita: velmi vzácná; erytrocyty nejsou aglutinovány lektiny *Arachis hypogaea* ani *Dolichos biflorus*, ale lze nalézt obraz smíšeného pole s lektinem *Helix pomatia* (viz podkapitola 3.1.4). Polyaglutinabilita může být trvalá a vést k hemolýze.

Tr polyaglutinabilita: extrémně vzácná; dává specifickou kombinaci reakcí s lektiny.

Laboratorní vyšetření

K rozlišování jednotlivých kryptantigenů se většinou používají různé typy aglutinujících lektinů (tab. 1.3), vzácněji monoklonální protilátky.

Tab. 1.3 Lektiny a kryptantigeny – rozlišení

Lektin	T	Th	Tk	Tx	Tn	Sd(a++)	Hyde Park	Tr
<i>Arachis hypogaea</i>	+	+	+	+	-	-	w	+
<i>Vicia hircanica</i>	+	+	+		-	-	+	
<i>Vicia cretica</i>	+	+	-	-	-	-	w	
<i>Vicia villosa</i>	+	-	-		+	+	+	+
<i>Griffonia simplicifolia</i>	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Medicago disciformis</i>	+	+	-	-	-		+	
<i>Dolichos biflorus</i> (jen B a O)	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Salvia sclarea</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Salvia horminum</i>	-	-	-	-	+	+	w	+
<i>Leonurus cardiaca</i>	w	-	-	-	-	+	-	
<i>Glycine soja</i>	+	-	-	-	+	+	+/-	

w = weak (slabá aglutinace); +/- = reaguje pouze u silně vyjádřených případů

1.4.2 Pseudoaglutinace

Jiným názvem penízkovatění, rouleaux.

Shlukování erytrocytů bez přítomnosti protilátky. Napodobuje aglutinaci, ale tvoří se sloupce = aglomeráty – pod mikroskopem jsou viditelné jen shluky, ale žádné volné erytrocyty.

Erytrocyty jsou bikonkávní diskovité útvary s negativně nabitým buněčným povrchem, což způsobuje jejich vzájemné odpuzování, jakmile se k sobě vzájemně přiblíží. Díky jejich elektrickému náboji nedochází v krevním oběhu k jejich agregaci. Avšak pokud dojde u erytrocytů ke snížení elektrického náboje, zmenší se rovněž odpuzovací síly a erytrocyty se mohou navzájem shlukovat svými plochými stranami.

Etiologie

Dysproteinemie a paraproteinemie, případně makroglobulinemie, zhoubné tumory, jaterní a renální choroby, systémový lupus erythematosus, chronická leukemie, aplastická anémie, infekce, chronický hnisavý proces, sepse, spáleniny, revmatoidní artritida... Infuzní roztoky (hydroxyetylškrob, dextran apod.).

Laboratorní vyšetření

Odlišení od autoaglutinace promytím erytrocytů ve fyziologickém roztoku (viz Příloha 1, metoda P25).

SOUHRN

1. Reakce antigenu a protilátky závisí především na teplotě, iontové síle prostředí, pH, kvalitativních a kvantitativních vlastnostech antigenů a protilátek.
2. K destrukci erytrocytů působením protilátek dochází aktivací komplementové kaskády, fagocytózou erytrocytů, přímým ovlivněním stability membrány.
3. Intravaskulární hemolýza je způsobena aktivací celého komplementového systému.
4. Extravaskulární hemolýza probíhá ve slezině (vazbou IgG k makrofágům) nebo v játrech (vazba a aktivace komplementu).
5. Při aktivaci komplementové kaskády při vazbě protilátek na antigeny membrány erytrocytu jsou účinnější protilátky třídy IgM.
6. Fenomén prozóny, tj. slabá až falešně negativní reakce při extrémním nadbytku protilátek, vyžaduje naředění vyšetřovaného materiálu.
7. Polyaglutinabilita může být získaná, vrozená nebo nejasného původu.
8. Rozlišuje se získaná polyaglutinabilita mikrobiální (typu T) a nemikrobiální (typu Tn).
9. Pseudoaglutinace, tj. shlukování erytrocytů bez přítomnosti protilátky, je způsobena především abnormálními proteiny či četnými chorobami

KONTROLNÍ OTÁZKY

(Existuje vždy jedna nebo více správných odpovědí.)

1. Erytrocytové antigeny jsou:

- a) uloženy uvnitř erytrocytu
- b) glykoproteiny
- c) lipoproteiny
- d) sacharidy
- e) obvykle strukturou membrány erytrocytů

2. Systémy krevních skupin mají:

- a) známou biochemickou podstatu
- b) stejný fenotyp
- c) vždy minimálně 2 antigeny
- d) definovanou chromozomální lokalizaci
- e) identifikovaný a sekvenovaný gen

3. Platí, že:

- a) haplotyp je kombinace alel krevních skupin, které se dědí společně
- b) mezi molekulární mechanismy vzniku rozdílných alel u systémů krevních skupin patří bodové mutace, inserce, delece a genové přestavby
- c) existují antigeny exogenní a endogenní
- d) epitop je oblast protilátky, důležitá pro vazbu antigenu
- e) „nulový“ fenotyp je typický především pro systém MNS

4. V imunohematologii se uplatňují především třídy protilátek:

- a) IgA
- b) IgM a IgG
- c) IgA a IgM
- d) IgA a IgE
- e) IgG a IgD a IgE

5. Protilátky můžeme rozdělit na:

- a) tepelné a chladové
- b) tepelné, chladové a bifazické
- c) kompletní a tepelné
- d) pravidelné a nepravidelné
- e) přirozené, imunní a pasivně přenesené

6. Hemolýza:

- a) intravaskulární: je způsobena aktivací komplementu po složku C3
- b) extravaskulární: je způsobena aktivací komplementu po složku C9
- c) při destrukci ve slezině nedochází k aktivaci komplementu
- d) závisí na parametrech protilátky, vlastnostech antigenu a účinnosti efektorových mechanismů hemolýzy
- e) je způsobena pouze protilátkami třídy IgG

7. Polyaglutinabilita:

- a) uplatňuje se tu nejčastěji antigen T a Tn
- b) je způsobena shlukováním erytrocytů bez přítomnosti protilátky
- c) erytrocyty aglutinují s plazmou/sérem většiny dospělých
- d) často aglutinují s pupečnickovým sérem
- e) většinou neaglutinují s vlastní plazmou/sérem

2 Krevní skupiny

2.1 AB0 systém (ISBT 001)

2.1.1 Výskyt na buňkách a v tkáních

Krevní buňky: na erytrocytech a jiných krevních buňkách, kromě granulocytů; zřejmě jsou i na kmenových a progenitorových buňkách. Na trombocyty jsou adsorbovány z plazmy.

Ostatní buňky, tkáně: na většině epitelových a endotelových buněk (ledviny, srdce, pankreas, plíce).

V plazmě, tělních tekutinách a sekretech.

2.1.2 Antigeny

Celkem 4 antigeny:

AB01	AB02	AB03	AB04
A	B	A,B	A ₁

Tab. 2.1 Základní dělení skupin AB0

AB0 skupina	Antigeny na erytrocytech	Protilátky v plazmě	Genotyp
0	žádné	anti-A, -A ₁ , -B, -A,B	0/0
A	A (+A ₁)	anti-B	A/A a A/0
B	B	anti-A, -A ₁	B/B a B/0
AB	A + B, A,B (+A ₁)	žádné	A/B

Antigen A₁ jen u podskupiny A₁, A₁B – viz níže.

Podskupiny

V AB0 systému (tab. 2.1) rozlišujeme podskupiny (u fenotypů A i B) lišící se kvantitativním i kvalitativním zastoupením příslušných antigenů. Nejčastější jsou podskupiny A₁ a A₂, ostatní podskupiny A i B mají velmi slabou expresi antigenů a jsou velmi vzácné. Podskupiny B se vyskytují hlavně v Africe a východní Asii. V praxi se podskupiny běžně nestanovují ani u pacientů ani u dárců krve. Praktický význam to má především u zachytu nepravidelné protilátky anti-A₁ (viz tab. 2.2 a kapitola 2.1.10), případně u diskrepancí při vyšetření krevní skupiny AB0 (viz tab. 2.2 a 2.3; obr. 2.1).

A₁

Transferáza A₁ je nejúčinnější a dokáže zpracovat všechny typy prekurzorových řetězců – 2, 3 a 4. A₁B vykazuje slabší reakce s anti-A₁ než A₁, což je dáno tím, že 2 transferázy „soutěží“ o řetězce H.

A₂

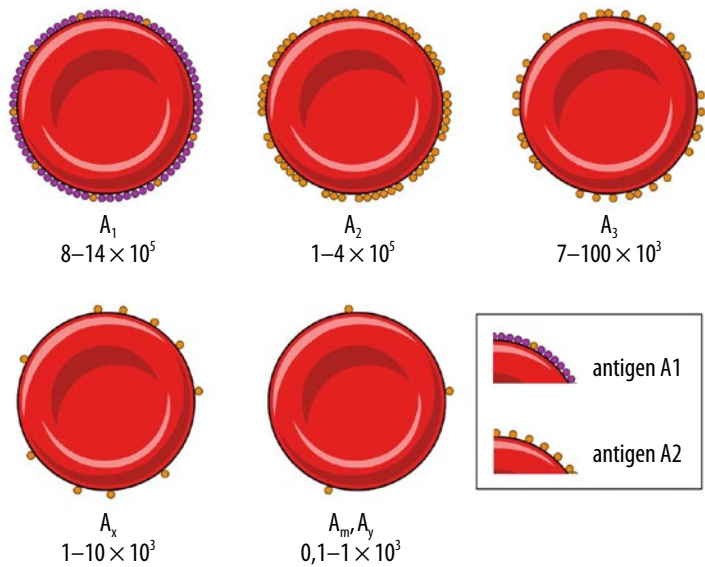
Transferáza A₂ je méně účinná a dokáže využít jen struktury s prekurzorovým řetězcem typu 2. Zbylé řetězce (typu 3 a 4) zůstávají ve formě antigenů H a z pohledu imunitního systému jde o „mozaiku“.

A₂ se liší od A₁ nejen kvantitativně, ale i kvalitativně.

Tab. 2.2 Podskupiny A (typické reakce)

Podskupina	Reakce s diagnostickým sérem				Antigeny na erytrocytu	Přítomnost protilátek v plazmě			Vylučovatelsví antigenu (sekretoři)
	anti-A	anti-A,B	anti-A ₁	anti-H		anti-A	anti-B	anti-A ₁	
A ₁	4+	4+	2–4+	–/+	A + A ₁	–	+	–	H, A
A _{int}	4+	4+	1–2+	2–3+	A + A ₁	–	+	–	H, A
A ₂	4+	4+	–	2+	A	–	+	1–2(8) ¹ %	H, A
A ₃	2+ ^{SP}	2+ ^{SP}	–	3–4+	A*	–	+	někdy	H, A*
A _{end}	SP	SP	–	3+	A*	–	+	někdy	H
A _x	– ² /±	1–2+	–	4+	A*	–	+	pravidelně	H, (A*)
A _m	– ² /±	–/±	–	4+	A*	–	+	–	H, A
A _y	– ² /w	–	–	4+	A*	–	+	–	H, A
A _{el}	–/±	–/±	–	4+	A*	–/+ ³	+	pravidelně	H

* malé množství; (*) velmi malé množství; ± slabé reakce; SP – smíšené pole; w – velmi slabé reakce; A_{int} – A intermediate;
¹ v závislosti na citlivosti metody; ² erytrocyty adsorbují anti-A; ³ pozitivní jen někdy



Obr. 2.1 Podskupiny A – počet antigenních míst. Od A₁ po A_m klesá přítomnost antigenu A a stoupá přítomnost antigenu H.

Tab. 2.3 Podskupiny B (typické reakce)

Podskupina	Reakce s diagnostickým sérem			Přítomnost protilátek v plazmě		Vylučovatelství antigenu
	anti-B	anti-A,B	anti-H	anti-A	anti-B	
B ₃	1+ ^{SP}	2+ ^{SP}	3–4+	+	–	H, B
B _x	–/±	1–2+	3–4+	+	+ (slabé)	H, (B*)
B _m	–/±	–/±	3–4+	+	–	H, B
B _{el}	–	+	3–4+	+	někdy (slabé)	H

* může být velmi malé množství; ± = slabé reakce; SP = smíšené pole

2.1.3 Výskyt krevních skupin v populaci

Základní 4 fenotypy nacházíme ve většině populace, jsou však zřetelné geografické a etnické rozdíly ve frekvencích (tab 2.4).

Tab. 2.4 Výskyt krevních skupin ABO

Krevní skupina	Populace	Frekvence
A	kavkazská (Evropa) (nejméně Island a Pobaltí)	32–53 % Západ ▷ Východ
	nejvíce u Atlantiku – Skandinávie, Inuité, Laponci	50–60 %
	jihoaustralští domorodci (příbuzní s japonskými Ainu)	až 77 %
	některé severoamerické indiánské kmeny (Blood and Black Foot)	až 80 %
	Česká republika	40–44 %
A ₂	v Laponsku převaha podskupiny A ₂ , ve východní Asii vzácný výskyt, v České republice 80 % A₁, 20 % A₂	
A ₃	kavkazská	<<0,1 %
0	kavkazská (Evropa)	30–56 %
	indiáni Střední a Jižní Ameriky	až 100 %
	Česká republika	30–34 %
	v Evropě vysoký výskyt u Basků, v Irsku, Skotsku, Sardinii, na Islandu a Korsice (50–56 %), nejčastější z ABO je v domorodých populacích Afriky a Austrálie (cca 60 %)	
B	nejčastější v centrální Asii	40 %
	východní a jihovýchodní Asie	30 %
	kavkazská (Evropa) (nejvíce Pobaltí a Rusko, nejméně Baskové)	7–24 % Západ < Východ
	Česká republika	15–18 %
	vzácná mezi Inuity (2 %), prakticky se nevyskytuje u australských domorodců; v původní romské populaci je nejčastější skupinou	
AB	Bangladéš	16 %
	kavkazská (Evropa) (nejméně Baskové – 1 %)	1–9 %
	Česká republika	8–9 %
	prakticky se nevyskytuje u australských domorodců	

Tab. 2.4 pokračování

Krevní skupina	Populace	Frekvence
A _{int}	častější v černošské populaci	5–8 % (v Jihoafrické republice téměř 14 %)
	kavkazská	cca 2 %
A _{end}	kavkazská	<<0,01 %
A _{finn} *	ve Finsku podle oblastí	0,02–0,1 %
A _{bantu} *	černošská populace v USA a jižní Africe	4 %
	Křováci a Hotentoti	8 %

* varianty A_{end}

Důvody geografických a etnografických rozdílů frekvencí jsou pravděpodobně v rozdílné vnímavosti jednotlivých fenotypů k infekčním epidemiím během migrace a vývoje jednotlivých populací.

2.1.4 Genetika a molekulární genetika

Gen *ABO* má tři základní alely, kodominantní *A* a *B* a recesivní *O*. Je lokalizován na chromozomu 9.

Tyto alely kódují glykosyltransferázy zodpovědné za syntézu antigenů *A* a *B* a za absenci této glykosylace u fenotypu *O* (homo-(di-)zygocie – obě alely pro nefunkční transferázy). Konečné formy antigenů tohoto systému jsou také ovlivňovány produkty genů kódujících fukosyltransferázy podílející se na výstavbě prekurzorového *H* řetězce: *H* (*FUT1*), *Secretor* (*FUT2*) a *Lewis* (*FUT3*) (tab. 2.5).

Tab. 2.5 Geny některých krevních skupin souvisejících s *ABO* a glykosyltransferázy

Lokus (gen)	Alela	Transferáza
<i>FUT1</i> (<i>H</i>)	<i>H</i>	α1,2- _L -fukosyltransferáza
	<i>h</i>	žádná
<i>FUT2</i> (<i>Se</i>)	<i>Se</i>	α1,2- _L -fukosyltransferáza
	<i>se</i>	žádná
<i>ABO</i>	<i>A</i>	α1,3-N-acetyl-D-galaktosaminyltransferáza
	<i>B</i>	α1,3- _D -galaktosyltransferáza
	<i>O</i>	žádná
<i>FUT3</i> (<i>Le</i>)	<i>Le</i>	α1,3/4- _L -fukosyltransferáza
	<i>le</i>	žádná

Gen *ABO* se skládá ze 7 exonů, nukleotidové sekvence charakteristické pro *A* a *B* jsou v exonu 7, substituce zodpovědné za nefunkční *O* alely jsou v exonech 6 a 7. Genotypová rozmanitost v *ABO* systému přesahuje rozdílnost fenotypovou (např. „evropská“ alela **A101* je jen u 20 % Japonců s fenotypem A₁, ostatní mají „japonskou“ **A102* alelu

kódující v pozici 156 záměnu leucinu za prolin – fenotypy však jsou nerozlišitelné). Dosud byly definovány desítky alel s rozdílnými bodovými mutacemi a/nebo hybridními přestavbami (např. pro podskupinu A_2 alely $ABO^*A2.11$, $ABO^*A2.12$, $ABO^*A2.13$, $ABO^*A2.16$, ... $ABO^*A2.20$ kódující různé záměny aminokyselin s výskytem v různých populacích) (tab. 2.6).

Některé raritní genové přestavby („crossing over“) mohou vést i k fenotypovým projevům, kdy nálezy neodpovídají obvyklým schémátům v ABO dědičnosti (fenotypy B(A), A(B), cisAB), případně ke stavům podobným jako po nestejnokupinové transfuzi (A_{mos} a B_{mos} fenotypy) – viz také podkapitola 1.1.7.

Tab. 2.6 Fenotypy a genotypy ABO

Fenotyp	Genotyp
A_1	A^1/A^1 nebo A^1/A^2 nebo A^1/O
A_2	A^2/A^2 nebo A^2/O
B	B/B nebo B/O
A_1B	A^1/B (A^1B/O)*
A_2B	A^2/B (A^2B/O)*
0	O/O

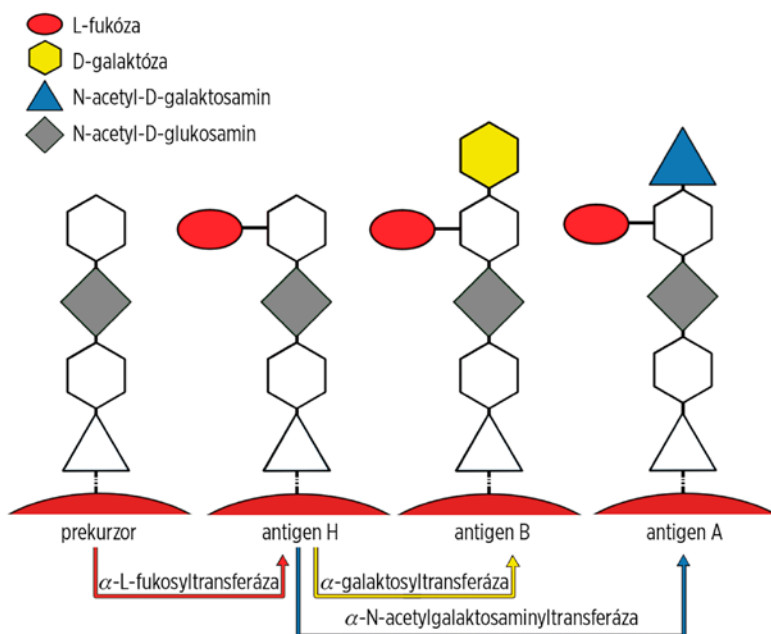
* cis forma

Mohou se vyskytovat **chiméry (mozaiky)**: jsou přítomny populace erytrocytů s různými krevními skupinami; např. geneticky jde o krevní skupinu 0, ale je přítomna i populace erytrocytů krevní skupiny A. Např. u varianty A_{mos} lze prokázat 2 populace erytrocytů: 0 a A_2 , v plazmě není anti-A.

2.1.5 Chemické složení

Antigeny = terminální oligosacharidy široké palety glykosylačních řetězců glykoproteinů a glykolipidů (obr. 2.2).

Prekurzorový H řetězec zůstává nepokrytý u skupiny 0. Je označován jako antigen H (historický název, který nahradil původní substanci 0, vzniklý z „heterogenní“ – tj. prokazovaný u více skupin: 0, A_2 , B aj.; v CD nomenklatuře jde o CD173).



Obr. 2.2 Biochemie antigenů systému ABO

Prekurzorový H řetězec vzniká přidáním terminální L-fukózy na disacharidové řetězce tzv. „peripheral core“ struktury, které se vyskytují ve více formách. Erytrocytů se týkají 4 typy lišící se v typu karboxylových vazeb a/nebo preterminálního monosacharidu (obr. 2.3):

Typ 1: $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$

Typ 2: $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$

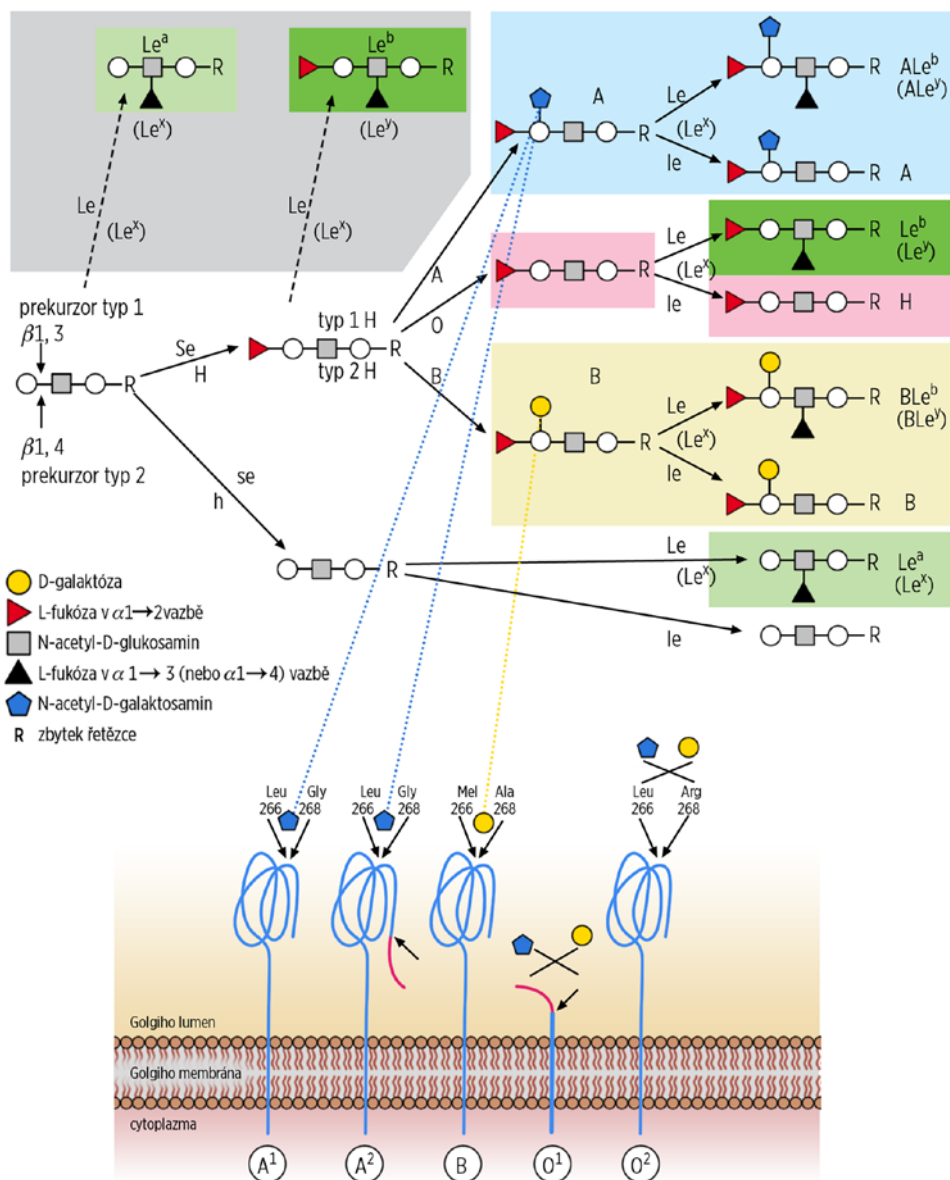
Typ 3: $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{R}$

Typ 4: $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$

Gal – D-galaktóza; GalNAc – N-acetyl-D-galaktosamin; GlcNAc – N-acetyl-D-glukosamin; R – další pokračování řetězce; v případě erytrocytových struktur to jsou glykoproteiny (60–70 % s N-glykosidickou vazbou – band 4.5, 3 a 15–25 % s O-glykosidickou vazbou, RHAG aj.) a glykolipidy (15–20 % větvené polyglykosylceramidy a 5 % lineární i větvené glykosfingolipidy).

Imunodominantním monosacharidem navázaným na H prekurzor u skupiny A je N-acetyl-D-galaktosamin, u skupiny B D-galaktóza.

Vzhledem k existenci více prekurzorových struktur a více navzájem kompetujících transferáz je glykosylační proces výstavby antigenů A, B, H složitý a zatím ne zcela charakterizovaný. Navíc jde o syntézu ovlivnitelnou okolními vlivy – při stresové erytropoéze u hematologických neoplazií dochází k zeslabování, až mizení antigenů, u ABO inkompatibilních transplantací bývají pozorovány atypické sérologické nálezy (zejména u podskupin) aj.



Obr. 2.3 Schéma biosyntézy antigenů krevních systémů ABO, H, Lewis (upraveno podle: Řeháček V, Masopust J, et al., 2013)