

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Porovnání fenotypu a genotypu erytrocytárních
antigenů s použitím serologických a microarray metod**

**Vedoucí diplomové práce: MUDr. Vít Řeháček
Konzultant: MUDr. Martin Písačka**

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016

Bc. Jana Králová

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové

Bc. Jana Králová

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování panu primáři MUDr. Vítu Řeháčkovi a konzultantu MUDr. Martinu Písačkovi za pomoc, konzultace a cenné rady při psaní diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu v NRL pro imuno hematologii ÚHKT v Praze za pomoc s praktickou částí. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým blízkým, kteří mě v celém studiu vytrvale podporovali.

1 Obsah

1	OBSAH.....	3
2	ABSTRAKT.....	5
3	ABSTRACT.....	6
4	ÚVOD.....	7
5	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	8
6	TEORETICKÁ ČÁST	9
6.1	SYSTÉMY KREVNÍCH SKUPIN	9
6.1.1	AB0 systém (ISBT 001) a H systém (ISBT 018).....	9
6.1.2	MNS systém (ISBT 002).....	12
6.1.3	Systém P1Pk (ISBT 003).....	14
6.1.4	Rh systém (ISBT 004).....	15
6.1.5	Lutheran systém (ISBT 005).....	23
6.1.6	Kell systém (ISBT 006).....	24
6.1.7	Lewis systém (ISBT 007).....	26
6.1.8	Duffy systém (ISBT 008).....	27
6.1.9	Kidd systém (ISBT 009).....	28
6.1.10	Diego systém (ISBT 010).....	30
6.2	VYŠETŘOVÁNÍ ERYTCYTOVÝCH ANTIGENŮ	31
6.2.1	Sérologické techniky.....	31
6.2.2	Molekulárně biologické techniky.....	31
7	PRAKTICKÁ ČÁST.....	41
7.1	SÉROLOGICKÉ METODY	41
7.1.1	Vzorky dárců krve.....	41
7.1.2	Vzorky pacientů.....	42
7.1.3	RhD.....	42
7.2	MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ METODY	43
7.2.1	Purifikace DNA.....	43
7.2.2	BLOODchip® Reference (Glass array).....	44
7.2.3	ID CORE XT™	44
8	VÝSLEDKY.....	45
8.1	SOUBOR „DÁRCI KRVE“	45
8.1.1	Souhrn.....	45
8.1.2	Zajímavosti	46
8.2	SOUBOR „PACIENTI“	48
8.2.1	Souhrn.....	48
8.2.2	Komentáře k neshodám.....	50
8.3	KOMENTÁŘE K NESHODÁM – SKUPINA „RHD“	59
8.3.1	Souhrn.....	59
8.3.2	Hodnocení RhD.....	61
9	DISKUSE	69
10	ZÁVĚR.....	71
11	POUŽITÉ ZKRATKY	73
12	REFERENČNÍ SEZNAM.....	75
13	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	80
14	SEZNAM TABULEK	81
15	SEZNAM PŘÍLOH.....	81
	PŘÍLOHY	82

2 Abstrakt

Práce se zabývá genotypováním erytrocytových antigenů pomocí microarray technik. Porovnává výsledky genotypů z microarray metod s fenotypy získanými pomocí sérologických technik. Hlavním cílem práce je zhodnotit míru shodných výsledků (fenotyp – genotyp) a využitelnost microarray technik v imunohematologické laboratoři. Testování probíhalo v Národní referenční laboratoři pro imunohematologii Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze v období od ledna 2014 do prosince 2015. Pro genotypizaci byly použity metody BLOODchip Reference a ID CORE XT™ od firmy Progenika Biopharma S. A. Sérologicky byl fenotyp vyšetřen metodami sloupcové aglutinace v gelových kartách firem Grifols a BioRad. Do studie bylo zahrnuto 78 vzorků dárců diagnostických erytrocytů, 62 vzorků pacientů, kde nebylo možno sérologicky určit přítomnost některých antigenů, a 28 pacientů s diskrepančním výsledkem při stanovení RhD antigenu. Genotypizace dárcovských vzorků umožnila záchyt variantních a zeslabených antigenů, které nebylo možné detekovat sérologicky. U vzorků dárců byla zjištěna 100% shoda mezi výsledky sérologie a genotypování. U patientských vzorků byla zjištěna větší variabilita v porovnání genotypovacích a sérologických technik. U vzorků polytransfundovaných pacientů, nebylo možné zjistit výsledek sérologickou metodou z důvodu přítomnosti dvojí populace erytrocytů. Naproti tomu genotypování přineslo požadované výsledky. U patientských vzorků s diskrepančním sérologickým výsledkem u RhD antigenu přispělo použití microarray metod k určení konkrétního typu RhD antigenu. V některých případech však musely být vzorky pro došetření odeslány k sekvenaci. Microarray technologie jsou významným přínosem pro imunohematologické testování, nicméně vzhledem k časové a finanční náročnosti zatím nemohou nahradit sérologická stanovení v rutinním provozu.

Klíčová slova

Imunohematologie, Erytrocytový antigen, Microarray metody, Sérologické metody, Fenotyp, Genotyp, Genotypování

3 Abstract

The diploma thesis deals with the erythrocyte antigens genotyping using microarray techniques. It compares the results of microarray methods with the phenotypes obtained by serological techniques. The aim of the theses is to evaluate the degree of identical results (phenotype - genotype) and the applicability of microarray techniques in the immunohematology laboratory. The testing was carried out in the National Reference Laboratory, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, in the period January 2014 – December 2015. Methods BLOODchip Reference and ID CORE XT™, Progenika Biopharma S. A., were used for genotyping. Serological determination of phenotypes was performed using Grifols and BioRad gel agglutination techniques. The study encompassed 78 samples of healthy donors of diagnostic red blood cells, 62 patient samples with no possibility to determine the presence of certain antigens by serological methods, and 28 patient samples with the discrepant result of RhD determination. Genotyping of the donors' samples enabled to record variant and weak antigens not detectable by serological methods. Donor samples displayed 100% conformity of serological and genotyping results. Considerable variability in patients' samples was found in comparism of genotyping and serological techniques. The results were not possible to detect predominantly in multi-transfused patient samples because of the presence of double population of red blood cells. On the contrary, genotyping provided requested results. Using microarray technique contributed to the determination of the particular RhD antigen in patient samples with discrepant RhD results. However, some samples had to be sent by the reason of the additional investigation by sequencing method. Microarray technologies significantly contribute to the immunohematology testing but for the time being cannot fully substitute routine serological tests by reason of higher time and cost requirements.

Keywords

Immunohematology, Red Blood Cell Antigen, Microarray methods, Serological methods, Fenotype, Genotype, Genotyping

4 ÚVOD

Sérologické metody tvoří základ imunohematologických vyšetřovacích technik. V současné době se však i v tomto oboru začínají uplatňovat metody založené na molekulární biologii. S vývojem těchto metod stoupá i jejich dostupnost a počty laboratoří, které je zavádějí do svého rutinního provozu.

Základem genotypu erytrocytových antigenů jsou převážně jednonukleotidové polymorfismy. Vzhledem k velkému počtu antigenů přítomných na povrchu erytrocytů je tedy potřeba analyzovat přítomnost většího počtu polymorfismů. Microarray metody poskytují možnost analýzy široké palety polymorfismů během jedné reakce. Finanční i časová náročnost těchto technik je úměrná objemu informací, které z nich lze získat. Tyto metody jsou vhodné pro testování genotypu erytrocytových antigenů u dárců krve i pacientů. V případě vyšetření pacientů bývá někdy obtížné až nemožné určit přítomnost antigenů sérologickými technikami z důvodu senzibilizace erytrocytů protilátkami či v důsledku vysokého počtu podaných transfuzních přípravků.

Před uvedením do praxe je nutno validovat a verifikovat nové postupy pomocí známých vzorků a porovnáním výsledků. Právě srovnáváním výsledků sérologických a microarray metod se zabývá tato diplomová práce.

5 ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Práce se zabývá porovnáním fenotypu získaného pomocí sérologických technik, s genotypem z microarray metod BLOODchip Reference a ID CORE (Grifols, Progenika Biopharma, S.A.).

Cíle práce:

- Zhodnotit míru shodných výsledků (fenotyp = genotyp)
- V případě neshody mezi technikami odhalit příčinu a analyzovat následný vyšetřovací postup
- Zhodnotit využitelnost microarray technik v imunohematologické laboratoři

V neposlední řadě by práce měla zhodnotit, zda je možné, aby genetické metody plně nahradily sérologické testování erytrocytových antigenů.

6 Teoretická část

Do erytrocytové membrány jsou zabudovány struktury označované jako antigeny krevních skupin. Tyto antigeny plní v buňce různé funkce, např. udržují tvar krvinky, mají enzymatickou aktivitu, ovlivňují adhezi atd. Aktuálně je známo více než 320 antigenů, které se řadí do 33 systémů, tzv. krevních skupin. (1, 2)

6.1 Systémy krevních skupin

6.1.1 AB0 systém (ISBT 001) a H systém (ISBT 018)

Díky přirozenému výskytu a jedinečným vlastnostem aglutininů anti-A a anti-B je tento systém z transfuzního hlediska nejvýznamnějším systémem krevních skupin. Protilátky proti antigenům, které nejsou na krvinkách dané osoby, mají velmi často hemolytický potenciál a v případě inkompatibilní transfuze mohou působit velmi závažné potransfuzní reakce. (1)

6.1.1.1 Biochemie

Antigeny jsou tvořeny terminálními oligosacharidy na membráně erytrocytů a dalších krevních buněk. Vyskytují se také na většině epitelových a endotelových buněk, v tělních tekutinách a sekretech. Antigeny tohoto systému jsou nepřímými produkty tří základních alel AB0 a H genu. Tyto alely kódují glykosyltransferázy, které zodpovídají za syntézu antigenů A a B, ev. absenci glykosylace v případě fenotypu 0. (1)

Gen H umožňuje vznik H-transferázy. Ta připojuje fukózu ke galaktóze v základním oligosacharidovém řetězci a dává tak vznik prekurzorovému H řetězci nebo H antigenu. Vlivem genu A dochází k syntéze transferázy A, která katalyzuje připojení N-acetyl-galaktosaminu (GalNAc) k H antigenu. Obdobně funguje i gen B, jehož transferáza připojuje k antigenu H sacharid D-galaktózu (Gal). Gen 0 kóduje nefunkční protein, tudíž nemá transferázovou aktivitu a proto nedochází k připojení žádného sacharidu na H antigen. (1, 2)

Zvláštním případem jsou jedinci s fenotypem Bombay. Ti mají genotyp hh, tudíž jim zcela chybí antigen H. Sérologicky se pak projevují jako skupina 0, avšak v plazmě je přítomna navíc ještě klinicky významná protilátka anti-H. (2)

6.1.1.2 Podskupiny

V AB0 systému může docházet k různému kvalitativnímu i kvantitativnímu zastoupení jednotlivých antigenů, které se označují jako podskupiny. Zdrojem rozdílů jsou mutace a různá aktivita transferáz. Nejčastější podskupiny tvoří antigeny A₁ a A₂. Transferáza A₁ je účinnější (1 milion antigenů na erytrocytu) a zpracovává více typů prekurzorových řetězců (typy 2, 3, 4). Oproti tomu transferáza A₂ zpracuje jen řetězec typu 2. Zbylé řetězce (3 a 4) tak zůstanou ve formě H antigenu. Na erytrocytu s fenotypem A₂ je tak pouze 100 000 - 400 000 antigenů. Osoby s podskupinou A₂ mohou tvořit nepravidelnou protilátku anti-A₁. (ve 2 % A₂, v 25 % A₂B a ve většině případů zeslabených A). (1) Mezi další typy podskupin patří A₃, A_{end}, A_x, A_m, A_y, A_{el}, A_{int}. Sérologická charakteristika těchto podskupin je shrnuta v Tabulce 1.

Podskupina	Reakce erytrocytů s protilátkou		Přítomnost protilátky v séru	
	Anti-A	Anti-A, B	Anti-A	Anti-A1
A ₃	d.p.	d.p.	ne	někdy
A _{end}	d.p.	d.p.	ne	někdy
A _x	-/w	+	někdy	často
A _m	-/w	-/+	ne	ne
A _y	-	-	ne	ne
A _{el}	-	-	někdy	ano

Tabulka 1 - Sérologická charakteristika podskupin A₁ (d.p. = dvojí populace buněk; „w“ = weak slabá aglutinace, „+“ = pozitivní; „-“, = negativní), Převzato: zdroj č. 3

Podskupiny B jsou velmi raritní. Některé mohou tvořit nepravidelnou protilátku anti-B (B_x, B_{el}). U dalších dvou podskupin nebyla dosud popsána tvorba protilátky (B₃, B_m). (1, 3)

Mezi získané změny patří například zeslabení antigenu A v případech pacientů s akutní myeloidní leukémií. V některých případech lze laboratorně detekovat tvorbu získaného antigenu B. Dochází k tomu při střevních infekcích. Bakteriální enzymy (deacetylázy) přeměňují GalNAc na galaktosamin, který je podobný galaktóze (antigenu B) a reaguje s některými anti-B protilátkami. (1)

6.1.1.3 Sekretorství

V přítomnosti aktivního genu FUT2 (neboli Se) dochází k tvorbě H, A a B antigenů v solubilní formě. Tyto antigeny jsou přítomny v sekretech gastrointestinálního, genitourinálního a respiračního traktu, mateřském mléce, potu, slzách a amniové

tekutině. Osoby, které mají ve svém genu minimálně jednu Se alelu, se nazývají „sekretoři“. V případě přítomnosti dvou recesivních alel (se/se) se jedná o „non-sekretory“. (1,2)

Konečné formy antigenů jsou ovlivněny produkty genů pro fukosyltransferázy, které se podílejí na vzniku prekurzorového H řetězce: H (FUT1), Secretor (FUT2), Lewis (FUT3). Alely A a B jsou kodominantní, zatímco 0 je ve vztahu k nim recesivní. (1, 2)

6.1.1.4 Frekvence

Frekvence zastoupení jednotlivých krevních skupin se liší dle geografie a etnického složení populace. Přesné údaje o procentuálním zastoupení se liší dle použitých zdrojů. (1)

6.1.1.5 Molekulární genetika

AB0 lokus je lokalizován na 9. chromozomu (9q34.1-q34.2). Obsahuje 7 exonů o délce 18 kbp. Sedmý exon je nejdelší a obsahuje většinu kódující sekvence. V exonu 6 leží delece v případě přítomnosti alely 0. (4, 7)

Sekvence alely 0 je identická se sekvencí A₁. Jedinou výjimkou je delece guaninu na pozici 261, která způsobí předčasný vznik stop kodonu a zastavení translace. Tento polymorfismus nese označení 0₁. Další alelou je 01v (01-variant), která rovněž obsahuje delecí G261 a zároveň 9 dalších substitucí, kterými se liší od alely A₁. (8) Tento polymorfismus nese až 91% původních obyvatel Brazílie. Další variantou je alela 02, postrádající delecí G261, jež se liší od A₁ dvěma rozdílnými nukleotidy. Na pozici 176 je kódován místo argininu glycin (stejně jako u B-transferázy) a v místě 268 je naopak místo glycinu arginin. Tato substituce je pravděpodobně zodpovědná za nefunkční katalytickou aktivitu. (3, 8)

Alely A a B se od sebe liší sedmi nukleotidovými substitucemi. Čtyři z nich mají za následek změnu v translaci do aminokyselin (R176G, G235S, L266M, G268A). Zásadní význam mají poslední dvě, které determinují specifitu výsledné glykosyltransferázy. (4,5,7).

Alela podskupiny A2 na rozdíl od alely A₁ obsahuje delecí jednoho ze tří cytosinů v pozici 1059-1061 (CCC>CC). Ta způsobí posun stop kodonu, což vede k prodloužení genového produktu o 21 aminokyselin na C-terminálním konci proteinu. Zároveň alela A2 obsahuje substituci C467T, což vede k záměně leucinu za prolin na pozici 156. Tuto substituci obsahuje v japonské populaci i subtyp alely A₁ (*A102). (3)

Lokus H obsahující 3 exony o délce zhruba 5 kbp leží na 19. chromozomu (19q13.3). Na této pozici leží i gen FUT2 pro Se lokus, který se skládá ze 2 exonů o celkové délce zhruba 25 kbp. (6)

Table 2. Comparison of Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences of the ABO Alleles Identified by PCR-SSCP

Allele	nt (aa)	Nucleotide and Amino Acid Position																		
		261	297	467 (156)	526 (176)	641 (214)	646 (216)	657	669 (223)	681	703 (236)	771	796 (266)	803 (268)	798-804	829 (277)	871 (291)	930	1054 (352)	1059-61
*A101	G A C C T T C G G G C C G			(Pro)	(Arg)	(Met)	(Phe)		(Glu)		(Gly)		(Leu)	(Gly)	GGGGGGG	G	G	G	C	CCC
*A105	— — — — — — — — — — — — — — —			(Leu)																CC (→)
*A106	— — — — — — — — — — — — — — —																			T (Trp)
*A107	— — — — — — — — — — — — — — —																			G (Gly)
*C101	— — — — — — — — — — — — — — —			(Leu)										C (Ala)						
*A108	— — — — — — — — — — — — — — —					A (Ile)														
*A109	— — — — — — — — — — — — — — —														GGGGGGG (→)					
*A110	— — — — — — — — — — — — — — —			(Leu)		A (Ile)			A											
*O201	del (→)	G	—	—	—	A	—	—	A	—	T	—	—	—	—	A	—	—	—	—
*R101	— G	—	G (Gly)	—	—	T	—	—	A (Ser)	T	—	—	—	—	—	A (Met)	—	—	—	—
*B101	— G	—	G (Gly)	—	—	T	—	—	A (Ser)	—	A (Met)	A (Ala)	C	—	—	—	—	A	—	—
*B104	— G	—	G (Gly)	—	—	T	—	—	A (Ser)	—	A (Met)	A (Ala)	C	—	—	A (Asn)	A	—	—	—
*B105	— G	—	G (Gly)	G (Arg)	—	T	—	—	A (Ser)	—	A (Met)	A (Ala)	C	—	—	—	A	—	—	—
*B106	— G	—	G (Gly)	—	—	T	T (Asp)	—	A (Ser)	—	A (Met)	A (Ala)	C	—	—	—	A	—	—	—

Only the difference from the nucleotide and amino acid sequences of *A101 are indicated. *O201 and *B101, responsible for common ABO phenotypes,^{2,3} are also indicated.

Abbreviations: nt, nucleotide; aa, amino acid; →, start of frame shift due to single-base deletion or insertion.

Obr. 1 - Porovnání nukleotidových a aminokyselinových sekvencí alel AB0 identifikovaných pomocí PCR-SSP (Zdroj č. 4)

6.1.2 MNS systém (ISBT 002)

Do tohoto systému spadají antigeny M, N, S, s, U a přes 40 dalších antigenů. Základem těchto antigenů jsou glykoproteiny obsahující kyselinu sialovou. Proto se označují jako sialoglykoproteiny. Glykoforiny GPA a GPB zajišťují elektronegativní potenciál a integritu erytrocytů, jejich interakci s dalšími buňkami, jsou receptorem pro cytokiny a patogeny. (2) Konkrétním příkladem patogenu je parazit, způsobující malárii, Plasmodium falciparum. (10).

Glykoforiny A i B jsou transmembránové proteiny skládající se ze 3 domén. Glykoforin A má extracelulární (72 AK), membránovou (23 AK) a intracelulární doménu (36 AK). GYPB obsahuje v intracelulární doméně pouze 6 AK, v membránové 20 AK a v extracelulární 44 AK. (3) Antigeny tohoto systému jsou exprimovány především na erytrocytech (cca 1 milion kopií na erytrocyt v případě glykoforinu A a 0,2 milionu

kopii na erytrocyt u glykoforinu B). (1) Zároveň jsou však přítomny i na renálním endotelu či epitelových buňkách. (15)

6.1.2.1 Frekvence

Frekvence fenotypů v kavkazské populaci je přibližně: M+N+ (50 %), M+N- (28 %), M-N+ (22 %), S+s+ (44 %), S-s+ (45 %), S+s- (11 %). (3)

Nejčastější výskyt M+ (přes 90 %) je u Inuitů, některých indiánských kmenů, u obyvatel jižní Asie a Indonésie, zatímco nejnižší výskyt M+ osob je u domorodců Austrálie, Nové Guineje a oblasti Pacifiku. Frekvence S+ pozitivních osob je téměř nulová ve východní Asii, na Tchaj-wanu a u australských domorodců. V černošské populaci se objevuje fenotyp S-s- a v závislosti na rozsahu delece GYPB také U- (popř. U+ var). (1)

6.1.2.2 Genetika

Antigeny jsou produktem dvou párů alelických genů *GYP A* a *GYP B* ležících na dlouhém raménku 4. chromozomu (4q28.2-q13.1). (9) Antigeny M, N jsou definovány genem *GYP A*, který udává vznik glykoforinu A. Gen *GYP A* se skládá ze 7 exonů o délce větší než 60 kbp. Obsahuje dvě kodominantní alely M a N, které jsou výsledkem tří SNP (59C>T, 71G>A, 72G>T). Odpovídající antigeny M a N se tak od sebe liší dvěma aminokyselinami (Ser20Leu, Gly24Glu). Alela *MNS*01* pro antigen M kóduje na dvacáté pozici serin a na čtyřiadvacáté pozici glycin. Alela *MNS*02* pro antigen N kóduje na těchto pozicích leucin a glutamát. (3, 20)

Antigeny S, s jsou kódovány genem *GYP B* udávajícím vznik glykoforinu B. Tento gen obsahuje 5 exonů o délce větší než 58 kbp. Kodominantní alely vznikají jedním SNP (143C>T). Antigeny S/s se liší v jedné aminokyselině (Thr48Met). Alela *MNS*03*, pro antigen S, kóduje na 29. pozici methionin. Referenční alela *MNS*04*, pro antigen s, kóduje na stejné pozici threonin. (3, 20)

Do této skupiny je řazen i vysokofrekvenční antigen U. Ten může chybět (v důsledku delece genu *GYP B*) na erytrocytech Afroameričanů s genotypem S-s-U-. Jemu korespondující protilátkou je anti-U. (1)

6.1.2.3 Sérologie

Protilátky anti-M jsou častější, mnohdy "přirozené" – suspektně poinfekční, zatímco anti-N jsou vzácnější. Většinou jsou třídy IgM, reagují při nižších teplotách a nejsou klinicky významné. Reagují-li však v nepřímém antiglobulinovém testu při 37 °C, mohou působit potransfuzní reakci či hemolytické onemocnění novorozence (HON). Protilátky reagují silněji s erytrocyty s homozygotním zastoupením daného antigenu než s heterozygoty. (1)

Protilátky anti-S, anti-s většinou bývají třídy IgG, optimálně reagují při 37 °C v nepřímém antiglobulinovém testu. Jsou považovány za klinicky významné a mají potenciál působit HON či potransfuzní reakce. (1,2)

Antigeny tohoto systému patří do skupiny antigenů destruovatelných působením proteolytických enzymů (např. papain, bromelin, ficin). Při použití enzymu dojde k destrukci extramembranózní části glykoforinu, čímž se sníží vzájemné odpuzování jednotlivých krvinek. Zároveň dojde k odhalení antigenů, ležících v blízkosti buněčné membrány, které byly původně zakryty glykoforiny. (1)

6.1.2.4 Raritní fenotypy

Delece v oblasti genu GYPA při současném zachování funkčnosti genu GYPB je označována jako En(a-). Pokud dojde zároveň i k deleci GYPB, nazýváme tento genotyp M^K. (1) Vlivem interakcí GYPA s bílkovinou band 3 dochází v těchto případech také k deficitu tzv. HFA (high frequency antigen = vysokofrekvenční antigen) Wright b (W^{r^b}). (3)

6.1.3 Systém P1Pk (ISBT 003)

Do tohoto systému jsou od roku 2012 řazeny tři antigeny: P1, Pk a P1PK4. (1)

Antigeny jsou strukturně podobné antigenům AB0 systému, u kterého záleží na působení alelických transferáz a následném připojení monosacharidů k prekurzorovým řetězcům. (2) V kavkazské populaci má antigen P1 frekvenci 80 %, vyšší je u Afričanů, nižší naopak u Asiatů. (1)

Syntéza antigenů tohoto systému je podmíněna přítomností enzymu α -1,4 Galaktosyltransferáza, která je podmíněna genem A4GALT. (12) Tento gen leží na 22. chromozomu v oblasti (22q11.3-22q13.2), obsahuje 4 exony, přičemž pro tento

antigenní systém je zásadní 3. a poslední exon. (11) Transferáza připojuje galaktózu na laktosylkeramid, čímž vzniká antigen P^k. Pokud dojde k připojení galaktózy na paraglobosid, vznikne antigen P1. (12) Referenční alela *A4GALT*P1.01* kóduje fenotyp P1+P^k+ (P₁). Pro fenotyp P2 neboli P1-P^k+ je nutná přítomnost alel *A4GALT*P2.01* nebo *A4GALT*P2.02*. Obě obsahují nukleotidovou změnu na pozici 42 (42C>T) v oblasti exonu 2a. Výsledný transkript těchto alel (GU902278) determinuje výsledný fenotyp P1 nebo P2 tím, že otevírá čtecí rámec, který zahrnuje i exony 1 a 2a. (11, 12)

Protilátky jsou aktivní při nízkých teplotách, většinou třídy IgM a klinicky nevýznamné (raritně jsou příčinou mírné pozdní potransfuzní reakce, nezpůsobují HON). (1) Významná je autoprotilátka anti-P1 třídy IgG, často nazývaná jako Donath-Landsteinerův hemolyzin, která může být příčinou těžké hemolýzy u pacientů s autoimunitní hemolytickou anémií (u paroxysmální chladové hemoglobinurie). (2)

6.1.4 Rh systém (ISBT 004)

V roce 1940 provedli lékaři Landsteiner a Wiener experiment imunizace králíků pomocí krvinek opice *Macacus Rhesus*. V séru králíků pak byla detekována protilátka, reagující s většinou opičích i lidských erytrocytů. Tato protilátka dostala název anti-Rhesus. Odtud tedy pochází název „Rh“. (1, 2) S postupem času a vývojem imunohematologie se tento systém stal jedním z nejpolymorfnějších systémů krevních skupin a v současné době do něho řadíme přes 50 antigenů. Původní označení jedinců Rh pozitivní/negativní dnes odpovídá označení přítomnosti antigenu D, tudíž užíváme pojmy RhD pozitivní/negativní. (1)

Některé Rh proteiny plní funkci transmembránových přenašečů. Proteiny RhCcEe a RhD zajišťují přenos CO₂, zatímco Rh glykoproteiny transportují amonné ionty. (22) Molekulárním podkladem jsou dva geny se dvěma genovými produkty, které jsou součástí membránového Rh komplexu. Nejvýznamnějšími antigeny tohoto systému jsou C, c, D, E, e. (2)

Expresí Rh proteinů je podmíněna přítomností proteinu RhAG (Rh asociovaný glykoprotein), který obsahuje 40 % sekvenční homologie s Rh proteiny. Dohromady pak tvoří tetramerický komplex na membráně erytrocytu. Společně s RHD a RHCE tvoří Rh proteinovou rodinu. (16) Výsledný Rh komplex je tvořen antigeny z rodiny Rh proteinů a dalšími Rh souvisejícími proteiny. Tato skupina zahrnuje proteiny LW, IAP,

GPB, Duffy glykoprotein, bílkovinu pásu 3. LW glykoprotein neboli adhezivní molekula ICAM4 (intracellular adhesion molecules) slouží jako ligand pro integrin LFA-1 (lymphocyte-function-associated antigen-1). (14) Integrin asociovaný protein (IAP) označovaný jako CD47 je členem imunoglobulinové rodiny a funguje jako marker pro makrofágy. Generuje negativní signál zabraňující fagocytóze erythrocytu. Dalším proteinem je glykoforin B (GPB) nesoucí antigeny S, s, U. U 60-70 % Rh_{null} erythrocytů je redukována exprese GPB, především antigenu U. Duffy glykoprotein má souvislost pouze částečnou. V případě Rh_{null} chybí jen antigen Fy5. Částečnou souvislost má i bílkovina pásu 3 (Band3) neboli anion exchanger (AE1) nesoucí antigeny systému Diego. (3)

Popisování Rh antigenů se řídí několika pravidly. Základním je numerická ISBT klasifikace. Další možností je tzv. Fischerův třígenový systém popisující tři páry alel a tedy 8 možných haplotypů (DcE, dce, DcE, Dce, dcE, dCe, DCE, dCE). Poslední variantou je Wienerův „faktorový“ systém, popsáný v Tabulce 2. (1)

Geny	Antigeny	Haplotyp (Wienerův systém)
RHD, RHcE	D, C, e	R ₁
RHce	c, e	R
RHD, RHcE	D, c, E	R ₂
RHD, RHce	D, c, e	R ₀
RHcE	C, e	r [‘]
RHcE	c, E	r ^{‘‘}
RHD, RHCE	D, C, E	R _z
RHCE	C, E	r ^y

Tabulka 2 - Komplexy Rh genů s korespondujícími antigeny a Wienerovým faktorovým systémem (převzato: zdroj č.2)

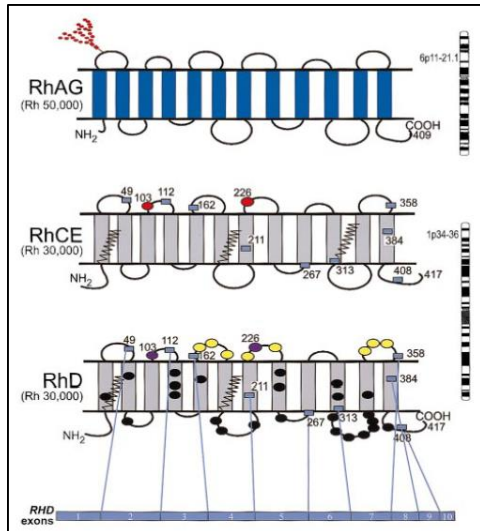
6.1.4.1 Genetika

Rh proteiny jsou kódovány dvěma opozitně orientovanými geny RHD a RHCE ležícími v oblasti 1p36.13-p34.3. (3) Oba tedy leží na prvním chromozomu, každý obsahuje 10 exonů a jsou od sebe odděleny genem SMP1. RhD a RhCcEe proteiny prochází dvanáctkrát buněčnou membránou a vytvářejí 6 extracelulárních domén. Vzájemně se od sebe liší v 31-35 aminokyselinách.(2)

Oba geny se mohou navzájem ovlivnit. Pokud jsou oba geny na stejném chromozomu a jeden ovlivní zvýšení či snížení množství antigenu kódovaného druhým genem, jedná se o „cis efekt“. Pakliže každý z těchto genů leží na jiném homologním chromozomu,

mluvíme o „trans efektu“. Typickým příkladem je zeslabení antigenu D, pokud se nachází alela C v trans pozici k alele D (Dce/dCe). (2)

Příbuzný gen RHAG leží v oblasti 6p11-21 a stejně jako oba předchozí obsahuje 10 exonů. (14)



Obr. 2 - Model topologie proteinů RhAG, RhCE a RhD (Zdroj č. 14)

6.1.4.2 RhD

Antigen D je charakterizován souborem epitopů na povrchu extramembranózní části RhD proteinu. Příčinou fenotypu RhD negativní je delece RHD genu. To platí pro většinu osob kavkazské populace. V dalších populacích (africká, asijská) bývá gen přítomen, ale obsahuje alterace, které znemožňují expresi výsledného antigenu. (1) Právě absence celého proteinu je příčinou silné imunogenicity. Imunitní systém RhD negativních osob tak dobře rozpoznává RhD pozitivní erythrocyty, jež mají navíc celý protein. Až 80 % RhD negativních osob vytváří po kontaktu s D pozitivními erythrocyty protilátky anti-D. (1)

Za stavu normální exprese se na jednom erythrocytu nachází 10 000 - 30 000 antigenů RhD. Počet je závislý na homo/heterozygocii pro tento antigen a na dalším feno/genotypovém uspořádání, především na pozici genu pro antigen C. (1)

Frekvence RhD⁺ fenotypů se mezi populacemi liší. V kavkazské populaci má tento fenotyp 82-88 % populace, v černošské populaci je to cca 95 %, v oblasti Pacifiku, ve východní Asii a u některých indiánských kmenů je frekvence téměř 100 %. (1)

6.1.4.3 Atypické formy RhD

Sérologickými technikami je možné zachytit atypické formy D antigenu. Jednu skupinu tvoří variantní (ev. parciální) RhD způsobené bodovou mutací či genovou přestavbou vedoucí ke ztrátě jednoho či více epitopů. Jde tedy o kvalitativní změnu. Osoby, jejichž erythrocyty mají tento fenotyp, mohou tvořit protilátky alo-anti-D proti epitopům, které jim samotným chybějí. (1, 14) Další formou je slabý antigen D (D weak) vyznačující se sníženým počtem antigenů na erythrocytu. Jedná se tedy o kvantitativní, nikoli kvalitativní změnu. Proto osoby s fenotypem D weak většinou nemají tendenci vytvářet protilátky anti-D. (1)

DEL (Del) je označení pro extrémní zeslabení antigenu D natolik, že je sérologickými technikami nedetekovatelný. Je možné jej prokázat pouze elučními studii nebo pomocí DNA diagnostiky. Gen DEL bývá v cis pozici s alelou *RHCE*Ce*. Vyskytuje se především ve východní Asii (Japonsko, Čína). (1)

Nejčastější D weak v evropské a kavkazské populaci tvoří typy 1, 2, 3, 4.0/4.1. Jejich molekulární podstata je popsána v tabulce č. 3. U těchto typů nebyly zaznamenány případy aloimunizace. Výjimky tvoří D weak typ 15, typ 7 a typ 4.2 (DAR), u kterých byla popsána množnost tvorby anti-D protilátek. (3)

Nejčastější a klinicky nejvýznamnější je varianta D^{VI}, u které byly popsány těžké hemolytické potransfuzní reakce i HON. Charakteristika základních variantních D fenotypů je popsána v tabulce č. 4. Síla exprese D variant je velmi rozdílná. Od téměř normálních počtů kopií (např. D^{III}, D^{III}) až po výraznou redukci (např. D^{VItypeI}). (3)

Název	Nukleotidová změna	Proteinová sekvence	Exon	RHCE
D weak typ 1	809T>G	RHD Val270Gly	6	Ce
D weak typ 2	1154G>C	RHD Gly385Ala	9	cE
D weak typ 3	8C>G	RHD Ser3Cys	1	Ce
D weak typ 5	446C>A	RHD Ala149Asp	3	cE
D weak typ 15	845G>A	RHD Gly282Asp	6	cE

Tabulka 3 - Nejčastější typy slabého RhD: Nukleotidové změny, proteinové sekvence, poloha v exonu, asociovaný haplotyp RHCE (převzato: zdroj č. 3)

Název	Nukleotidová změna	Proteinová sekvence	Exon	RHCE
D II	1061C>A	Ala354Asp	7	
D IVa (RH30+)	186G>T 410C>T 455A>C 1048G>C	Leu62Phe Ala136Val Asn152Thr Asp350His	2,3,7	
D VI typ I (BARC-)	505A>C 509T>G 514A>T 544T>A 577G>A 594A>T 602C>G 667T>G 697G>C 712G>A 733G>C 744C>T 787G>A 800A>T	Met169Leu Met170Arg Ile172Phe Ser182Thr Glu193Lys Lys198Asn Thr201Arg Phe223Val Glu233Gln Val238Met Val254Leu silent Gly263Arg Lys267Met	4, 5	cE
D VI typ II (BARC+)	505A>C 509T>G 514A>T 544T>A 577G>A 594A>T 602C>G 667T>G 697G>C 712G>A 733G>C 744C>T 787G>A 800A>T 916G>A 932A>G	Met169Leu Met170Arg Ile172Phe Ser182Thr Glu193Lys Lys198Asn Thr201Arg Phe223Val Glu233Gln Val238Met Val254Leu silent Gly263Arg Lys267Met Val306Ile Tyr311Cys	4, 5, 6	Ce
D VII (RH:40)	329T>C	Leu110Pro	2	
DFR1	505A>C 509T>G 514A>T	Met169Leu Met170Arg Ile172Phe	4	
DCS1	667G>T 676G>C	Phe223Val Ala226Pro	5	
DHMi	848C>T	Thr283Ile	6	
DNB	1063G>A	Gly355Ser	7	
DAR3.1 (weak partial D 4.0)	602C>G 667T>G 819G>A	Thr201Arg Phe223Val silent	4, 5, 6	
DAR4 (weak D 4.1)	48G>C 602C>G 667T>G 819G>A	Trp16Cys Thr201Arg Phe223Val silent	1, 4, 5, 6	

Tabulka 4 - Nejčastější typy variantního RhD: Nukleotidové změny, proteinové sekvence, poloha v exonu, asociovaný haplotyp RHCE (převzato: zdroj č. 3)

6.1.4.4 RHCE

Antigeny C/c a E/e jsou kódovány genem RHCE. Rozdíl mezi antigeny C a c spočívá v šesti SNP a následném polymorfismu 4 AK, z nichž extramembranózní je pouze Ser103Pro. Polymorfismus antigenů E a e spočívá v jediné substituci působící na jednu AK změnu (Pro226Ala). (1)

Referenční alela *RHCE*01* (neboli *RHCE*ce*) pro haplotyp „ce“ obsahuje tzv. referenční nukleotidy 307C a 676G v exonech 2 a 5. Tato sestava nukleotidů kóduje v pozici 103 prolin a v místě 226 alanin. Další alelou je *RHCE*02* (neboli *RHCE*Ce*) se změnou nukleotidů oproti referenční alele: 48G>C, 178C>A, 203A>G, 307C>T s aminokyselinovými změnami Trp16Cys, Leu60Ile, Asn68Ser, Pro103Ser. Pro fenotyp „cE“ je nutná přítomnost alely *RHCE*03* (*RHCE*cE*) se SNP 676G>C v exonu 5, jehož výsledkem je záměna AK v pozici 226 (Ala226Pro). Poslední možností je kombinace „CE“ s alelou *RHCE*04* (*RHCE*CE*) s polymorfismy v exonech 1, 2, 5 (48G>C, 150C>T, 178C>A, 201A>G, 203A>G, 307C>T, 676G>C). (3) Základní přehled je shrnut v Tabulce 5. (17)

Fenotyp	Alela	SNP	AK změna
ce	RHCE*01	307C 676G	103Pro 226Ala
Ce	RHCE*02	48G>C, 178C>A 203A>G 307C>T	Trp16Cys Leu60Ile Asn68Ser Pro103Ser
cE	RHCE*03	676G>C	Ala226Pro
CE	RHCE*04	48G>C 150C>T 178C>A 201A>G 203A>G 307C>T 676G>C	Trp16Cys Leu60Ile Asn68Ser Pro103Ser Ala226Pro

Tabulka 5 - Polymorfismy a AK substituce u základních alel RHCE genu. (převzato: zdroj č. 17)

6.1.4.5 Atypické formy Rh fenotypů

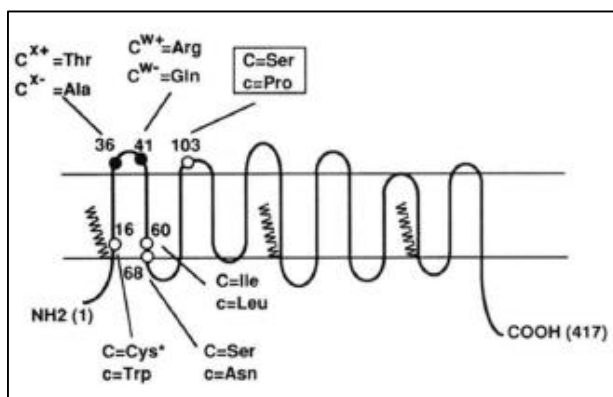
Forma D-- se vyznačuje absencí všech RhCcEe proteinů. Jejím podkladem je homozygocie pro abnormální Rh haplotypy, u kterých došlo k mutacím nebo přestavbám v RHCE genu. Absence RhCcEe antigenů může být příčinou výrazného zesílení exprese RhD antigenu. (19)

Typickým příkladem je fenotyp Rh_{null}. Daniels popisuje dva základní druhy tohoto fenotypu: amorfní a regulátorový. Amorfní typ má svůj podklad v mutaci RHCE genu,

kteřá zabraňuje transkripci a translaci výsledných proteinů. U regulátorového typu je na vině mutace v genu RHAG, která znemožňuje expresi RhAG proteinu. Některé mutace v genu RHAG vedou k nízké úrovni exprese Rh antigenů (fenotyp Rh_{mod}). Tyto antigeny lze prokázat jen nejcitlivějšími technikami. (3, 19)

6.1.4.6 Další Rh antigeny

Antigeny C^w a C^x jsou výsledkem nukleotidových změn v prvním exonu genu RHCE, nejčastěji v kombinaci s alelou RHCE*Ce. Antigen C^w (RH:8) byl poprvé popsán v roce 1946 a své jméno získal díky časté asociaci s antigenem C. „W“ je podle příjmení pacienta (Willis), na jehož erythrocytech byl tento antigen popsán. Pro označení antigenu C^x (RH:9) byl použito následující písmeno v abecedě po „W“. (17) V kavkazské populaci se C^w vyskytuje s frekvencí okolo 2%, zatímco C^x je mnohem raritnější (cca 0,1%). V severní a střední Evropě, především ve Finsku, je incidence vyšší. Genetickým podkladem pro antigen C^w je SNP 122A>G a následná změna AK na pozici 41 (Gln41Arg). Pro antigen C^x je podkladem SNP 106G>A s aminokyselinovou změnou Ala36Thr. (18) Tyto změny aminokyselin způsobují konformační alterace výsledného proteinu, jejichž výsledkem mohou být kvalitativní i kvantitativní abnormality antigenu C. Nejčastěji se oba antigeny vyskytují v přítomnosti komplexu DCe, ale byly popsány i případy kombinací dCe, dCE a DCE. Velmi raritní je kombinace C^w+C-c+. Protilátka anti-C^w má potenciál způsobovat HON i HTR. Protilátka anti-C^x je mnohem vzácnější, ojedinele byly popsány případy mírných HON. (3)



Obr. 3 - Rh protein - lokalizace C^w a C^x asociovaných polymorfismů (Zdroj č. 18)

Dalším příkladem atypické formy RHCE je antigen VS (e^S , RH:20). Jeho zastoupení je v evropské populaci raritní, zatímco v populaci černošské se vyskytuje až ve 40 %. Genetickým podkladem je polymorfismus v pátém exonu genu RHCE 733C>G s následnou aminokyselinovou změnou Leu245Val. (16) Následkem je konformační změna proteinu, asociovaná se zeslabením antigenu e (značen jako e^S). Antigen VS je produkován haplotypy Dce^S, dce^S a d(C)ce^S. V prvních dvou případech byla identifikována pouze jedna (výše popsaná) mutace. Zároveň se zde vyskytuje kromě antigenu VS také antigen V (RH:10). Haplotyp d(C)ce^S neboli r^S obsahuje hybridní gen RHD-CE-D^S. Ten se skládá z exonů 1, 2, 3 (části), 9, 10 genu RHD a exonů 4-7 genu RHCE. Tento gen pak kóduje následující aminokyselinové substituce: Leu62Phe (exon 2), Ala137Val (exon 3), Leu245Val (exon 5) a Gly336Cys (exon 7). Přítomnost serinu na pozici 103 ve druhém exonu je pravděpodobně zodpovědná za expresi antigenu C a jeho zeslabení je ovlivněno tryptofanem na pozici 16. Haplotyp d(C)ce^S v kombinaci s haplotypem DcE má za následek zeslabení antigenu D. Příčinou je vzájemná trans pozice antigenů D a C. Protilátky anti-VS a anti-V nejsou klinicky závažné a většinou jsou detekovatelné antiglobulinovými testy. (3)

6.1.4.7 Diagnostika

Pro detekci základních antigenů (C, c, D, E, e) jsou v sérologii užívány především příslušné přímo aglutinující IgM protilátky. Pro zachycení slabých forem RhD jsou vhodné anti-D IgG protilátky reagující v antiglobulinovém testu. K určení variantních D antigenů jsou užívány panely monoklonálních protilátek zaměřených na různé epitopy (anti-epitopová specifita). (1)

V současné době se v diagnostice Rh systému stále více uplatňují genotypovací metody. Jsou zásadní především pro potvrzení typů slabých D (D weak), jejichž nositelé mohou dostávat D pozitivní transfuzní přípravky a těhotným ženám nemusí být podán anti-D imunoglobulin (profylaxe). Další možností je přesné určení D variantních antigenů. Osoby s D variantou by měly dostávat pouze D negativní transfuzní přípravky, aby nedošlo k jejich imunizaci. Transfuzní přípravky odebrané osobám s D variantou musí být označeny jako „D pozitivní“. (1)

6.1.4.8 Protilátky

Rh protilátky spadají do skupiny klinicky významných protilátek. Většinou se tvoří po imunizaci (transfuzí, těhotenstvím). Převážně jsou třídy IgG a reagují při 37°C v nepřímém antiglobulinovém testu. Ve většině případů jde o aloprotilátky (alo-anti-D, -C). (2) Rh struktury však také bývají terčem tepelných autoprotilátek u AIHA (autoimunní hemolytická anémie), typicky auto-anti-e, -Ce. (1) Neaktivují komplement, ale mají potenciál působit hemolytické potransfuzní reakce a HON. (2) Schopnost detekovat Rh antigeny je vyšší u enzymově opracovaných erytrocytů. (1)

6.1.5 Lutheran systém (ISBT 005)

Do tohoto systému je aktuálně řazeno 19 antigenů a všechny jsou lokalizovány na dvou glykoproteinech (CD239). Tyto glykoproteiny jsou rozdílnými transkripty jednoho genu (gen *LU*) a mají imunoglobulinovou strukturu. Zároveň patří mezi receptory a adhezivní molekuly (ligandy pro laminin). (1, 16)

Antigeny jsou po narození slabě vyvinuté a s věkem zesilují. Uplatňují se v adhezi, migraci, diferenciaci a proliferaci buněk, při uvolňování zralých erytrocytů do periferní krve. Glykoprotein Lu má vyšší expresi na maligních buňkách. Frekvence Lu^a má v kavkazské a africké populaci zastoupení okolo 5-8 % (v ostatních populacích je raritní). Antigen Lu^b se naopak řadí mezi HFA ve všech populacích. (1) Raritně se vyskytuje tzv. nulový fenotyp (Lutheran null). Ten bývá způsoben třemi typy genetických mechanismů:

- homozygocí pro nefunkční *LU* gen,
- heterozygocí pro geneticky nezávislý dominantní regulátorový gen (*In/Lu/*),
- hemizygotitou pro X-vázaný regulátorový gen *XS2*. (16)

Genetickým podkladem pro vznik těchto antigenů je SNP A274G. Při vzniku antigenu Lu^a je na pozici 77 kódován histidin, zatímco u Lu^b leží na této pozici arginin. (20)

Klinický význam protilátek anti-Lu není příliš velký. Mohou způsobit mírné pozdní potransfuzní reakce, ale nejsou spojovány s HON kvůli slabé expresi na fetálních krvinkách. Většinou jsou třídy IgM a lépe reagují při nižších teplotách. (1,2)

6.1.6 Kell systém (ISBT 006)

Tento systém je tvořen více než 30 glykoproteinovými antigeny (CD238), které se od sebe liší strukturou proteinu. Svůj název získal podle první popsané kazuistiky – pacientovo příjmení bylo Kelleher. (1)

Kell glykoproteiny se uplatňují při aktivaci peptidů a vazokonstrikci. Patří do skupiny M13, která zahrnuje zinek-dependentní metaloproteinázy. (23) Glykoproteiny Kell mají funkci endothelin-3-konvertujícího enzymu, jehož působením vzniká aktivní endothelin-3. Ten působí jako silný cévní konstriktor. (12) Antigeny tohoto systému jsou exprimovány převážně na erythrocytech a Sertoliho buňkách, v menší míře na buňkách lymfoidních orgánů, kardiálního i příčně pruhovaného svalstva, sleziny či appendixu. (24). Kell protein obsahuje 732 AK a je v pěti oblastech glykosylován. Je spojen disulfidickou vazbou s Kx proteinem, jenž je produktem X-vázaného genu XK. Kx je transmembránový protein (membránu protíná celkem 10 krát) a slouží jako ko-transportér neurotransmiterů a Na⁺ a Cl⁻ iontů. (1) Pokud tento protein (v důsledku mutace či delece genu XK) chybí, jsou všechny antigeny Kell výrazně zeslabené. Imunizované osoby pak mohou vytvářet protilátky anti-Kx a anti-Km. Tento fenotyp je označován jako McLeodův syndrom. Bývá pozorován u akantocytózy a svalových či neurologických nemocí. (2) Delece části chromozomu X, která obsahuje gen KX, může rovněž zahrnovat i gen, zodpovědný za vznik X-vázané chronické granulomatózy (CGD). Hledání kompatibilní transfuze je v těchto případech téměř nemožné. U chlapců s CGD a syndromem McLeod je doporučeno nepodávat transfuzní přípravky. (16) Dalším typem mutace je K_{null} fenotyp, který se vyznačuje chyběním všech glykoproteinů Kell systému. Je způsoben mutací inaktivující *KEL* gen. (3)

Nejvýznamnější alelické páry tvoří:

- K (*KEL1* neboli Kell; asi 9 % populace) a k (*KEL2* neboli Cellano; přes 99 % populace)
- Kpa (*KEL3* neboli Penny) a Kpb (*KEL4* neboli Rautenberg)
- Jsa (*KEL6* neboli Sutter) a Jsb (*KEL7* neboli Matthews)

6.1.6.1 Genetika

KEL gen se nachází na 7. chromozomu (7q33), obsahuje 19 exonů o délce více než 21 kbp. Tento gen je vysoce polymorfní. Antigeny K/k se liší jednou substitucí SNP (578C>T), a tudíž změnou jedné aminokyseliny (Thr193Met). Alela *KEL*01.01* (fenotyp Kell) kóduje na pozici 193 methionin, zatímco pro referenční alelu *KEL*02* (fenotyp cellano) je zde threonin. Vysoká imunogenicita antigenu Kell je připisována chybějícímu glykosylačnímu řetězci. Polymorfismus v podobě změny AK na pozici 193 totiž mění sekvenci oblasti glykosylační vazby. Další polymorfismy zahrnují Kp^b/Kp^a SNP (841C>T) způsobující změnu AK na pozici 281 (Arg281Trp), Js^b/Js^a SNP (1790T>C) se změnou AK na místě 597 (Leu597Pro). Pro vysokofrekvenční antigen Kp^b to znamená cytosin na pozici 841 a pro vysokofrekvenční Js^b thymin na pozici 1790. (3, 16, 20)

Vzácně se vyskytuje nulový fenotyp K₀, u kterého chybí všechny antigeny systému Kell. Osoby s tímto fenotypem mohou po imunizaci vytvářet protilátku anti-K(u), která reaguje se všemi antigeny Kell systému (kromě fenotypu K₀). Byl popsán i fenotyp K_{mod}, pro nějž je typická velmi slabá exprese antigenů Kell systému. Další zeslabení, ovšem týkající se pouze antigenu Kell, se objevuje u Kell weak fenotypu. Jeho alela *KEL*01.02* obsahuje substituci nukleotidu c.577T>A, což má za následek AK změnu Thr193Ser. (17) Sérologickými technikami je možné zachytit zeslabení Kell antigenu také v případě současné positivity antigenu Kp^a. Důvodem je pravděpodobně konformační změna glykoproteinu způsobená substitucí Arg>Trp. U osob s genotypem K+k+Kp(a+,b+) bývá časté zeslabení antigenu k. Příčinou je vazba k-Kp^a ležící na jedné alele a zároveň K-Kp^b na druhé alele. (25)

6.1.6.2 Sérologie

Antigeny systému Kell jsou po antigenu D nejsilnějšími imunogeny. Mohou být inaktivovány některými chemikáliemi jako na příklad dithiothreitol nebo 2-aminoethylisothiouranium bromid, které redukují disulfidické vazby. (16)

Protilátky jsou klinicky významné s potenciálem působit těžké potransfuzní reakce a HON (protilátka anti-Kell působí imunitní destrukci erytroidních progenitorů). Tyto protilátky jsou především třídy IgG a vznikají následkem imunizace, ale byly popsány i případy "přirozených" poinfekčních protilátek. Řadí se do skupiny tzv. tepelných

protilátek a dobře reagují v nepřímém antiglobulinovém testu. Vzhledem k vysoké imunogenicitě je doporučována transfuzní kompatibilita u dívek a žen ve fertilním věku. (1,2) Podle doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství (STL) musí být všechny transfuzí přípravky krve v ČR otypovány na Kell antigen. (52)

6.1.7 Lewis systém (ISBT 007)

Dva hlavní antigeny tohoto systému Le^a a Le^b nejsou alelické (jako většina ostatních antigenů) a jejich vznik je podobný vzniku antigenů u ABO systému. Jejich syntéza probíhá v plazmě, sekretech a endodermálních tkáních. Lewis substance z plazmy adhezuje na erythrocyty a vytváří tak Lewis antigeny (ty chybějí na erythrocytech novorozenců z důvodu nefunkčních transferáz). Síla antigenu se může měnit v těhotenství či v souvislosti s onemocněními zažívacího traktu (např. infekce *Helicobacter pylori*). Antigeny Lewis systému fungují jako buněčné ligandy pro E-selektiny. (1, 2)

Produktem genu Le *FUT3* (19p13.3) je fukosyltransferáza. Ta mění řetězec H-prekurzoru typu 1 (za vzniku Le^a) a/nebo H řetězec typu 1 (za vzniku Le^b). Konečný fenotyp závisí i na účinnosti genu Se (*FUT2*). (1)

Pro fenotyp $Le^{(a+,b-)}$ je zásadní přítomnost alely Le (gen *FUT3*) a zároveň inaktivita *FUT2* (*se/se*), tedy ABH nonsekretor. U fenotypu $Le^{(a-,b+)}$ je to opět alela Le a zároveň aktivita genu *FUT2* (ABH sekretor), který přeměňuje H-prekurzor na H-řetězec. Tyto dva fenotypy $Le^{(a+,b-)}$ a $Le^{(a-,b+)}$ jsou ve většině populací nejfrekventovanější. V přítomnosti homozygocie alely „*le*“ vzniká fenotyp $Le^{(a-,b-)}$. Varianta $Le^{(a+,b+)}$ je v kavkazské a africké populaci raritní. Základem je slabá exprese *FUT2* genu, jejímž výsledkem je fakt, že ne všechny H-prekurzor bude přeměněn na H-řetězec. Nezměněný H-prekurzor ta může být využit pro syntézu antigenu Le^b . (1)

Protilátky se řadí mezi tzv. chladové, které reagují při nižších teplotách. Nejsou považovány za klinicky významné, avšak byly popsány i raritní případy protilátek reagujících při 37 °C v antiglobulinovém testu a/nebo aktivující komplement, které by mohly být příčinou potransfuzní reakce (spíše u anti- Le^a). (1, 2)

6.1.8 Duffy systém (ISBT 008)

První protilátka byla detekována v séru polytransfudovaného hemofilika (pan Duffy) v roce 1950. (1) Antigeny tohoto systému exprimuje mnoho druhů buněk v lidském těle (ledvinný epitel, buňky sleziny, kostní dřeň a fetální jaterní buňky. (26) Duffy glykoprotein (CD234) bývá často označován názvem DARC (Duffy-Antigen Chemokine Receptor), který poukazuje na jeho hlavní funkci. Slouží totiž jako receptor pro chemokiny, například IL-8 (inteleukin 8). Zároveň usnadňuje průnik některých původců malárie do erytrocytu (např. *Plasmodium vivax*). Plasmodium se naváže na N-terminální extracelulární doménu Duffy glykoproteinu prostřednictvím DBP (Duffy binding protein, Duffy-vážíci protein) a poté vstoupí do buňky erytrocytu. (21) V malarických oblastech je tak rozšířen fenotyp $Fy^{(a-b)}$, jenž zajišťuje rezistenci erytrocytů k malarické infekci a slouží tak jako přirozený obranný mechanismus. (1) Tento Fy_{null} fenotyp je způsoben homozygocíí pro nulovou alelu mutací v GATA-1 vázané oblasti promotoru Duffy genu. Mutace zabraňuje navázání erytrocyt-specifického GATA-1 transkripčního faktoru. Výsledkem je potlačení exprese Duffy antigenů na erytroidní tkáni, zatímco exprese na ostatních buňkách zůstává zachována. To je důvod, proč jedinci s tímto fenotypem nevytvářejí aloprotilátky anti-Fy (anti-Fy^b ti, kteří mají mutaci GATA na *FY*B*, anti-Fy^a ti, kteří mají mutaci na *FY*A*). (16)

6.1.8.1 Genetika

Duffy lokus je lokalizován na 1. chromozomu (1q23.2). Gen *DARC* obsahuje 2 exony o délce přesahující 1,5 kbp. O výsledné podobě antigenu rozhoduje SNP ve 125. pozici (125A>G) a následně vzniklá AK s pořadovým číslem 42 (Asp42Gly). (20) Referenční alela *FY*02* kóduje antigen Fy^b. Slabý typ Fy^a (Fy^a^{weak}) je kódován alelami *FY*01W.01* a *FY*01W.02*. První z nich je způsobena substitucí 256C>T a následnou změnou AK (Arg89Cys). Druhá obsahuje stejnou substituci a zároveň substituci 298G>A, způsobující záměnu AK na pozici 100 (Ala100Thr). Častější zeslabení antigenu je pozorováno u Fy^b. Zde byly popsány 4 možné alely. První dvě jsou specifikovány jako Fy^x. Alela *FY*02W.01* má genetický podklad změn shodný s alelou *FY*01W.02*. Další možnost Fy^x obsahuje kromě již zmíněných substitucí 265C>T a 298G>A ještě 145G>T (Ala49Ser). Poslední dvě alely pro Fy^(b+w) mají svůj podklad v substitucích 266G>A a 901C>T. (3, 17) Fy^x je vůči Fy^a v kodominantním postavení, zatímco vůči Fy^b je recesivní. Z toho vyplývají i sérologické reakce při typování antigenů. (3)

Mutace v oblasti GATA boxu je způsobená substitucí thyminu za cytosin v pozici -46 (-46T>C). Jejím následkem je nemožnost navázání GATA-1 erytroidního transkripčního faktoru. Tato mutace je zodpovědná za většinu $Fy^{(a-b)}$ fenotypů v černošské populaci, ale také u některých českých Romů či Židů Aškenazi. Existují však i další typy mutací, které způsobují nulový fenotyp. Antigeny systému Duffy a jejich frekvence výskytu v kavkazské populaci: $Fy^{(a+b)}$ 49 %; $Fy^{(a+b)}$ 17 %; $Fy^{(a-b)}$ 34 %.

6.1.8.2 Sérologie

V laboratorních testech dochází k destrukci Fy antigenů při použití enzymů. Známý je i efekt dávky u homozygotních typů. V případě kombinace genotypu Fy^a/Fy^x jsou pozorovány slabší až negativní reakce s některými anti- Fy^b séry. (3)

Protilátky mají charakter IgG, reagují v NAT při 37 °C, bývají směsí aloprotilátek a mohou aktivovat komplement. Bývají málo časté, avšak mají potenciál působit potransfuzní reakce, ojediněle i HON. (1,2)

6.1.9 Kidd systém (ISBT 009)

První protilátka anti- Jk^a byla detekována v séru Američanky (paní Kidd). Nosičem antigenů je glykoprotein o velikosti 389 AK. Jeho funkcí je membránový transport urey. (1) Antigeny Kidd systému jsou jedním ze dvou typů lidských membránových transportérů urey a jsou označovány jako UT-B (urea transporter B). Zásadní funkci má UT-B v ledvinových sběrných kanálcích, kde udržuje koncentraci urey mezi jejich lumen a intersticiem. Aktivně vychytává ureu do buněk proti koncentračnímu gradientu a tím zabraňuje ztrátám vody z organismu zapříčiněných vysokou koncentrací urey v moči. (27) U osob, jejichž eryocyty postrádají Kidd glykoprotein, byla pozorována snížená schopnost koncentrovat močovinu. Polymorfismus $Jk^{a/b}$ nemá na funkci transportéru vliv. (28)

Protein antigenu Kidd prostupuje buněčnou membránou celkem 10krát, přičemž na třetí extracelulární smyčce je navázán N-glykan. N- i C- terminální části jsou orientovány do intracelulárního prostoru. Antigeny Kidd jsou součástí i dalších buněk a tkání (např. leukocyty, ledviny, mozek, srdce). (27)

Frekvence v kavkazské populaci $Jk^{(a+, b+)}$ je přes 50 %. Vzácně se vyskytuje fenotyp $Jk^{(a-, b-)}$ neboli Jk null. Osoby s tímto fenotypem mohou tvořit protilátku anti- Jk^3 . (1)

Populace/Antigen	Kavkazská	Afroamerická	Asijská
Jk^a	77 %	92 %	73 %
Jk^b	74 %	49 %	76 %

Tabulka 6 - Populační zastoupení antigenů Jk^a a Jk^b (převzato: zdroj č. 1)

6.1.9.1 Genetika

Kidd systém tvoří alelický pár kodominantních antigenů Jk^a a Jk^b . Je určen genem SLC14A1 (Solute carrier family 14, member 1) lokalizovaným na 18. chromozomu (18q12.3) a spadajícím do rodiny genů transportérů urey. Gen je tvořen 11 exony o délce více než 50 kbp. První tři a část čtvrtého exonu však nejsou přepisovány do struktury proteinů. Polymorfismus nukleotidů na pozici 838 (838A>G) a výsledná AK na pozici 280 (Asn280Asp) rozhodují o fenotypovém projevu alely. Referenční alela $JK*02$ kóduje $JK2$ (Jk^b) na pozici 280 aminokyselinu asparagin, zatímco alela $JK*01$ neboli $JK*A$ (fenotyp Jk^a) obsahuje na této pozici aspartát.

U nulových fenotypů ($Jka-b-$) bylo popsáno 24 možných alel. Alela $JK*01N.01$ způsobuje absenci iniciačního methioninu a tudíž nevzniká žádný protein. Substitutece proteinů v různých oblastech genu SLC14A1 jsou základem pro vznik dalších alel. (17)

Antigeny tohoto systému jsou velmi imunogenní a jejich reaktivitu lze v laboratorních testech zvýšit přidáním enzymu.

Protilátky vznikají po imunizaci, přičemž však dochází k rychlému zeslabení (rychlá fagocytóza jimi senzibilizovaných erytrocytů). Vlivem toho jsou tyto protilátky obtížně detekovatelné při dalším předtransfuzním vyšetření (někdy reagují jen s homozygotními krvinkami). Většina je třídy IgG, ale mohou se vyskytovat i ve směsi s IgM, která aktivuje komplement. Bývají příčinou těžké hemolýzy, jak akutní tak pozdní. Vzácně jsou příčinou HON při fetomaternální inkompatibilitě. Jedinci s fenotypem $Jk^{(a-, b-)} Jk:-3$ mohou produkovat protilátku anti- Jk^3 , která bývá příčinou akutních i pozdních potransfuzních reakcí. Protilátky anti- Jk reagují v NAT. Mohou se vyskytovat i autoprottilátky (především v souvislosti s polékovým typem AIHA). (1, 2)

6.1.10 Diego systém (ISBT 010)

Systém Diego obsahuje 21 antigenů, z čehož 2 jsou antitetické ($Di^{a/b}$, $Wr^{a/b}$) a dalších 17 s nízkou frekvencí výskytu neboli LFA. Antigeny nese nejčastěji se vyskytující bílkovina na membráně erytrocytu, AE1 (Anion-Exchanger 1) neboli Band3. Na jednom erytrocytu leží zhruba 10^6 kopií glykoproteinu Band 3. Jeho hlavní funkcí je výměna HCO_3^- a Cl^- iontů, která je zásadní pro transport CO_2 z tkání do plic. (16) Isoforma AE1 v ledvinných distálních tubulech (kAE1) má zásadní význam v acidifikaci moči. (29) V neposlední řadě tento protein zajišťuje flexibilitu a stabilitu tvaru membrány erytrocytu. (16) Alelický pár Di^a , Di^b je z pohledu kavkazské populace párem LFA, HFA. Di^a má zhruba 5% zastoupení v Číně a u amerických indiánů. Do tohoto systému také spadají antigeny Wright, tvořící obdobný alelický pár jako Diego. Wr^a jakožto LFA a Wr^b HFA. Na membráně erytrocytu se vyskytují v blízkosti glykoproteinu A a vzájemná interakce s touto strukturou je nezbytná pro expresi Wright antigenů. (1) V případě absence glykoforinu A, čili fenotypu En(a-), nedojde ke vzniku Wright antigenů. (30)

6.1.10.1 Genetika

Molekulární podklad těchto antigenů leží v genu pro AE1 označovaném jako SLC4A1. Ten je lokalizován na 17. chromozomu v oblasti dlouhého raménka (17q12-q21). (3) Polymorfismus charakteristický pro vznik antigenů Di, leží na pozici číslo 2710. Pro Di^a zde leží thymin a jako výsledná aminokyselina vzniká v místě 854 leucin. Pro Di^b je na pozici 2710 cytosin a výslednou aminokyselinou je 854 prolin. Zkrácená verze zní 2710T->C, Leu854Pro. Obdobou je i SNP pro antigeny Wright: 2121A->G a následná substituce aminokyselin ve čtvrtém extracelulárním oblouku: Lys658Glu. (20)

6.1.10.2 Sérologie

Antigeny $Di^{a,b}$ i $Wr^{a,b}$ jsou rezistentní vůči enzymům. Protilátky anti-Di i anti-Wr jsou prokazatelné v NAT (některé i přímo aglutinující). Anti-Di bývají většinou třídy IgG (podtřídy 1 nebo 3). (3) Anti-Wr jsou většinou třídy IgG1, avšak byly popsány i případy IgM nebo směsi IgM plus IgG. Protilátky tohoto systému mají potenciál působit HON i potransfuzní reakce. (16)

6.2 Vyšetřování erytrocytových antigenů

Testování erytrocytových antigenů dárců i příjemců transfuze má svůj obrovský význam v zajišťování kompatibilních transfuzních přípravků především pro pacienty s klinicky významnými protilátkami. (20)

6.2.1 Sérologické techniky

Základem zůstávají sérologické techniky založené na principu hemaglutinace. Pro typování mnoha antigenů jsou na současném trhu dostupná monoklonální IgM antiséra, která se stala standardními reagensy. Jejich nevýhodou je, že nereagují se všemi epitopy antigenů. Výsledkem tak může být falešná pozitivita nebo negativita, především při testování antigenů Rh systému. Pro rozšířené testování více antigenů jsou používána i séra polyklonální, typu IgG. Tato séra jsou většinou koncipována pro použití v nepřímém antiglobulinové testu (NAT). Polyklonální antiséra detekují většinu variantních i slabých forem antigenů. Bohužel však nemohou být použita v případě positivity přímého antiglobulinového testu (PAT). Pro některé antigeny nejsou ani dostupná certifikovaná antiséra, což velmi komplikuje jejich testování. Dalším velkým handicapem sérologických metod je testování antigenů u transfundovaných osob. V těchto případech je častým výsledkem přítomnost dvojí populace erytrocytů a je obtížné odlišit pacientovy vlastní antigeny od antigenů na erytrocytech dárce. (20)

Nejčastěji používanými sérologickými technikami jsou metody gelové aglutinace, testy pevné fáze a zkumavkové testy. Kromě testování ve zkumavkách je většina metod dostupná jak v manuální, tak v automatizované formě. (20)

6.2.2 Molekulárně biologické techniky

Rozpoznání kódujících genů pro vznik krevně skupinových antigenů umožnilo vývoj a následné použití molekulárně-biologických metod v transfuzní medicíně. Z mechanismů ovlivňujících krevně skupinovou diverzitu jsou nejzásadnější jedno-nukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphism, SNP) a genové přestavby.

V současnosti je možné detekovat téměř každý antigen pomocí SNP, ev. detekcí různých aberací (delece, duplikace). Většina těchto metod je založena na polymerázové řetězové reakci (polymerase chain reaction, PCR) s využitím genomové deoxyribonukleové kyseliny (deoxyribonucleic acid, DNA). (20)

6.2.2.1 Low-throughput techniky (techniky s nízkou účinností)

Tyto metody jsou vývojově nejstarší, ale zároveň nejvíce rozšířené a používané. Vyznačují se vysokou robustností a finanční efektivitou. Komerční kity pro tyto techniky jsou na trhu dostupné od mnoha dodavatelů. (20)

Metody se zakládají na PCR a následné vizualizaci PCR produktů separovaných na základě jejich rozdílné délky pomocí gelové elektroforézy (nejčastěji na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu). K vizualizaci je užíváno barvení ethidium bromidem. Do této skupiny spadají metody „Polymorfismus délky restričních fragmentů“ (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) a „Alelově specifická PCR“ (AS-PCR), častěji nazývaná jako PCR s použitím sekvenčně-specifických primerů (sequence-specific priming, PCR-SSP). PCR-RFLP je založena na aktivaci restričních enzymů rozeznávajících přesně danou oblast DNA. PCR-SSP využívá sekvenčně specifických primerů, které nasednou na přesně definovanou oblast, v níž je lokalizován hledaný SNP. Výsledný PCR produkt tedy vznikne pouze v případě, že je daný SNP přítomen na vyšetřované DNA. (31)

Nevýhodou těchto metod je nutnost použití ethidium bromidu a možnost vyšetření nízkého počtu antigenů v jedné sérii. Při použití většího počtu primerů zaměřených na různé oblasti genů pro získání většího počtu informací o dalších SNP je největší překážkou zvolení teploty annealingu (připojení primerů) v PCR reakci. Každý primer má své teplotní optimum, proto je velmi obtížné zvolit kompromis a správné nastavení termocyklu. (31)

V současné době je na trhu dostupný i produkt FluoGene (CE certifikovaný) německé firmy Inno Train, který kombinuje princip PCR-SSP a endpoint fluorescenční detekce. Reakce probíhá ve speciální 96-jamkové desce. Do každé reakční jamky je aplikována směs vyšetřované DNA a tzv. fluomixu. Princip testu je založen na PCR se specifickými primery a rozštěpení lokus-specifické sondy značené fluorescenčním barvivem. Samotná sonda má na jednom svém konci barvu a na druhém tzv. „zhášec“, který sondu „vypíná“. Pokud dojde k navázání primeru, Taq polymeráza rozštěpí sondu, uvolní tak barvu od zhášec a výsledný produkt po ozáření laserem fluoreskuje. Detekce fluorescence probíhá v přístroji FluoVista a výsledné hodnoty jsou vyhodnoceny pomocí softwaru v počítači. Systém FluoGene nabízí kity pro testování HLA, HPA i RBC antigenů. (44)



Obr. 4 - Analyzátor FluoVista pro systém FluoGene (Zdroj č. 44)

6.2.2.2 Medium to high-throughput techniky (techniky se střední až vysokou účinností)

Společným znakem pro tuto skupinu technik je možnost hromadného testování více SNP najednou.

6.2.2.2.1 Real-time PCR (PCR v reálném čase)

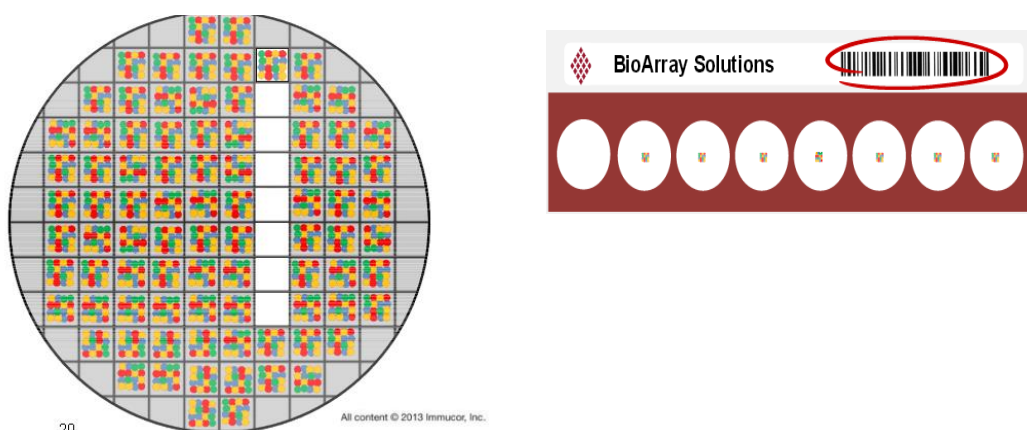
Tato metoda umožňuje kvantifikaci sledovaného úseku DNA v reálném čase. Na rozdíl od běžné PCR, kde je analyzován až výsledný produkt, je při real-time PCR zaznamenáván každý cyklus PCR ve skutečném čase. Záznam amplifikace je založen na principu fluorescence. Používají se sondy (fluorescenční látky), které se váží specificky nebo nespecificky na amplifikované DNA úseky. Reakce probíhá jako klasická PCR v přístroji termocykler, který je oproti klasické verzi vybaven optickým zařízením pro snímání intenzity fluorescenčního záření. Optický signál je zaznamenáván a zpracováván specializovaným softwarem prostřednictvím matematických metod. (31)

Varianta s použitím nespecifických fluochromů funguje na principu interkalace barviva mezi dvouvláknovou DNA. Z PCR reakce jsou generovány amplikony jednovláknové, tudíž neobarvené. Typickým příkladem barviva používaným pro tento typ real-time PCR je SYBR Green. (31, 40)

Často využívanou variantou je použití sekvenčně specifických prób, kde je možné použití dvou základních principů: hybridizačních nebo hydrolyzačních prób. (40) Metody založené na real-time PCR však nejsou v imunohematologii příliš využívány (kromě detekce fetálního genotypu z plazmy matky. (40)

6.2.2.2 Beadchip array

Tato metoda je založená na principu elongace oligonukleotidové sondy navázané na barevně odlišené kuličky využívající PCR produkt jako matrici. (31) Každá kulička (průměr cca 3 μm) je obarvena unikátní barvou a každá barva odpovídá jednotlivé alele v dané metodě. Při výrobě čipu jsou všechny kuličky nejprve smíchány do jedné směsi (tzv. pool) a poté rozptýleny na křemíkovou destičku. Každý čip o rozměrech 300 μm x 300 μm obsahuje 4000+ náhodně rozptýlených kuliček. Následně je destička rozřezána a nalepena na skleněné nosiče, přičemž každý nosič má svůj unikátní čárový kód. Poté dojde k sejmutí barevného obrázku každého políčka a jeho analýze. Informace o „mapě kuliček“ je uložena jako „dekódovací soubor“ pro každý čip, dodávaný na CD s příslušnou soupravou. (43)



Obr. 5 - vlevo: křemíková destička s rozptýlenými kuličkami; vpravo: výsledný skleněný čip pro vyšetření 8 vzorků s čárovým kódem v horní části (Zdroj č. 47)

V prvním kroku jsou pomocí PCR amplifikovány oblasti genů zahrnující vyšetřované polymorfismy. V dalších krocích dojde k odmytí nespecifických struktur (zbývající primery a dNTPs) a k rozštěpení dsDNA (double-stranded, dvouřetězcová DNA) na ssDNA (single-stranded, jednořetězcová DNA). Jednořetězcová DNA je aplikována na Bead-čip. Každá kulička nese na svém povrchu specifické oligonukleotidové sondy. Pokud vyšetřovaná DNA obsahuje sekvenci komplementární k sondě, dojde k vazbě na oligonukleotidovou sondu na kuličce. Následuje elongační reakce se značenými nukleotidy. Pokud je přítomna navázaná DNA, syntetizuje se k ní komplementární vlákno (začínající na 3'konci sondy). (31) V případě, že nedošlo k navázání vyšetřované DNA na sondu, elongační reakce značených nukleotidů neproběhne. Nukleotidy jsou značeny pomocí 5-karboxytetramethylrhodaminu (TAMRA). TAMRA fluoreskuje po absorbování zeleného světla. (43) Každá kulička obsahuje pouze jeden typ (cílově-

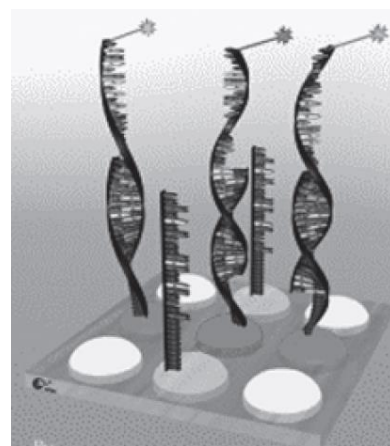
specifické) sondy a v daném čipu leží na specifické pozici. Proto přítomnost fluorescence v dané pozici znamená pozitivní reakci a tudíž i přítomnost vyšetřovaného polymorfismu. (35)

Detekce je založená na snímání fluorescenčních signálů pomocí fluorescenčního mikroskopu. Následuje vyhodnocení signálů v příslušném programu. (35)

Platformu Human Erythrocyte Antigen - HEA BeadChip firmy BioArray Solutions (USA) poskytuje společnost Immucor (v roce 2008 se BioArray Solutions stalo součástí firmy Immucor). PreciseType™ HEA Molecular BeadChip Test detekuje 24 RBC polymorfismů asociovaných s 38 antigeny a fenotypovými variantami v jednom testu. (35, 43)

6.2.2.2.3 Glass array (microarray)

Glass array (analýza na sklíčku) neboli microarray je metodou s vysokou účinností. Během jedné série lze analyzovat velké množství genů a získat tak rozsáhlé množství informací. Cílové regiony vyšetřované DNA jsou amplifikovány a fluorescenčně značeny. Poté jsou aplikovány na microarray sklíčko, na jehož povrchu jsou navázány oligonukleotidové sondy. Na jednom čipu může být imobilizováno až několik stovek tisíců sond specifických vůči různým úsekům DNA. V případě, že vyšetřovaná DNA obsahuje sekvenci



Obr. 6 - Hybridizace značených DNA fragmentů na imobilizované oligonukleotidy (Zdroj č. 34)

komplementární k oligonukleotidu připevněnému ke sklíčku, dojde k vazbě označeného amplikonu. Nenavázané fragmenty jsou vymyty. Detekce probíhá ve scanneru, ze kterého je výsledný obrázek fluoreskujících spotů na sklíčku interpretován pomocí softwaru. (31)

Podle typu imobilizovaných sond lze microarray rozdělit do dvou skupin. Prvním typem jsou expresní čipy, jejichž sondy jsou tvořeny úseky molekul cDNA (komplementární DNA) vzniklé z mRNA (mediátorová RNA) reverzní transkripcí. Druhý typ je tvořen specifickými oligonukleotidovými čipy. V tomto případě jsou sondy tvořeny uměle syntetizovanými oligonukleotidy o délce 25-70 bp, které jsou softwarem navrženy tak,

aby byly komplementární k určitým sekvencím vyšetřované DNA. Tento typ je využíván především pro analýzu polymorfismů a konkrétních mutací genů. (34)

Nejčastěji používaným materiálem pro DNA čipy je sklo se speciálně upraveným povrchem. Mikroskopické sklíčko (25 x 75 mm) je ošetřeno hydrofobními polymery (např. poly-L-lysinem nebo aminosilanem). DNA sondy bývají modifikovány na 5' koncích aminoskupinou, díky níž dochází k vazbě na povrch sklíčka. Existují různé způsoby imobilizace sond na povrch čipu. Jednou z nich je přímá syntéza – in situ: např. fotolitografickou technikou nebo technologií „ink-jet printing“ s použitím fosforamidové chemie. Dalším způsobem je nanášení sond na čip ve formě roztoku tzv. spotováním. Sondy jsou nasávány do velmi tenkých jehel a „natištěny“ na povrch čipu přístrojem nazývaným spotter. (34)

V oblasti značení a metod detekce převládá přístup fluorescenčního značení. Značka může být zabudována přímo či nepřímo. Přímé značení znamená inkorporaci značky do ampliconu před hybridizací na čip. V případě nepřímého značení je během amplifikace zabudován do vyšetřované DNA nukleotid obsahující specifickou značku (např. aminoallylovou skupinu). Na tuto značku se po hybridizaci na čip naváže fluorescenční barva. Nejčastěji používané barvy jsou zelený cyanin (Cy3) a červený cyanin (Cy5). Světelný signál je snímán fluorescenčním skenerem s vysokou rozlišovací schopností (5-10 μm). (34)

Jednou z prvních dostupných medium-throughput platform pro genotypování erytrocytárních antigenů na principu microarray metody byl systém BLOODchip Reference (Progenika Biopharma Grifols). Jeho vývoji předcházela projekt BLOODgen jehož cílem byl vývoj a testování komerčně dostupné microarray technologie pro použití v transfuzní medicíně. Konsorcium Bloodgen vzniklo na začátku roku 2001 a bylo složeno z akademických jednotek, krevních center a společností se zájmem o transfuziologii. (38) Konsorcium získalo finanční podporu Evropské komise v podobě 2,35 milionu euro na 3-letý projekt, který proběhl v letech 2003-2006 (začátek 1. 9. 2003). Projektu se účastnily následující instituce: University of the West of England (koordinátor), Bristol; Sanquin Foundation, Amsterdam; University of Ulm, University Hospital Lund; CTBT, Barcelona; ÚHKT, Praha; BITS, Bristol; Progenika Biopharma S.A. (36, 37)

6.2.2.2.4 Liquid array

Typickým představitelem těchto tzv. kapalinových metod jsou techniky založené na xMAP technologii systému Luminex. (31)

Cílová oblast vyšetřované DNA je amplifikována pomocí PCR s použitím biotinylovaných dCTP (deoxycytidin trifosfát). Výsledné amplikony jsou hybridizovány na oligonukleotidové próby připojené k polystyrénovým mikrokuličkám různých barev. (31) Každá mikrokulička má rozměr 5,6 μm (ev. 6,5 μm v případě superparamagnetické kuličky Magplex™). Uvnitř kuliček jsou přítomny dva typy fluoroforů (červený a infračervený) v přesném poměru. Právě rozdílné zastoupení fluoroforů umožňuje vznik 100 unikátních spektrálních podpisů mikrokuliček, které jsou identifikovány pomocí detekčních systémů Luminex xMAP. (45)

Vazba biotinylovaného amplikonu k próbě je vizualizována pomocí streptavidinu-konjugovaného s fykoerythrinem. Mikrokuličky jsou analyzovány v přístroji Luminex, který porovnává fluorescenční signál barvy mikrokuličky s přítomností/nepřítomností signálu fykoerythrinu. (31) Luminex funguje na principu průtokového cytometru, který využívá dva lasery. Zelený laser (532 nm) neboli „assay“ laser excituje PE (fykoerythrin) a červený (solid state) „klasifikační“ laser (635 nm), který excituje barvu uvnitř mikrokuliček a determinuje tak jejich typ. (39)

Pro genotypování RBC antigenů na technologii Luminex dodává komerční kity BLOODchip ID-CORE XT firma Progenika Biopharma Grifols. (31) BLOODchip® ID genotypovací platforma založená na Luminex® xMAP technologii determinuje 37 alel pro erytrocytové antigeny (ID CORE XT) a 18 trombocytových antigenů (ID HPA XT). Kit ID CORE XT analyzuje 29 SNP a determinuje tak antigeny z následujících deseti systémů krevních skupin: Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, Diego, Dombrock, Colton, Cartwright a Lutheran. ID HPA XT detekuje 13 SNP pro identifikaci alelických variant HPA-1 až 11 a HPA-15. (39)

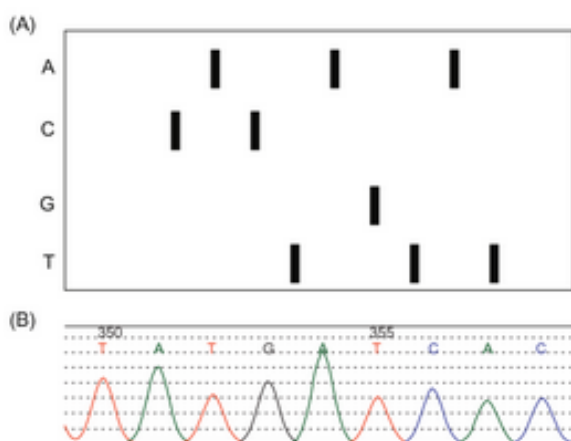
6.2.2.3 Sekvence

6.2.2.3.1 Sangerova metoda

Standardní sekvenování je založeno na Sangerově metodě.

Sekvence probíhá ve čtyřech nezávislých reakcích. Reakční směs obsahuje DNA polymerázu, primery, templát, radioaktivně či fluorescenčně značené deoxynukleotidy (dNTP) a 2', 3'- dideoxynukleotidy (ddNTP). Každá ze čtyř reakčních směsí obsahuje charakteristický ddNTP – ddATP, ddCTP, ddGTP nebo ddTTP, který znemožňuje vznik vazby mezi ním a dalším nukleotidem. Dideoxynukleotidy jsou ve směsi obsaženy v nízké koncentraci (poměr ddNTP : dNTP = 1 : 100), aby mohla zároveň probíhat i klasická syntéza DNA. Výsledkem reakce jsou fragmenty DNA o různé délce zakončené značenými dideoxynukleotidy. (32)

Fragmenty jsou denaturovány a roztrženy podle velikosti elektroforézou na polyakrylamidovém gelu, přičemž každá reakční směs má svou dráhu. Po ozáření vzniká obraz s typickými proužky, ze kterých lze odvodit sekvenci DNA. Zatímco klasická Sangerova metoda probíhá ve čtyřech oddělených reakcích, její novější modifikace, kapilární elektroforéza, umožňuje sekvenaci v jedné reakci. Každý ddNTP (popř. primer) je značen jiným fluorescenčním barvivem a elektroforéza probíhá v jedné skleněné kapiláře. (31, 32)



Obr. 7- Sangerovo sekvenování, (A) Výsledky gelové elektroforézy DNA molekuly 5'-TATGATCAC-3'. Výsledky jsou čteny zprava doleva. (B) Elektroforeogram stejné molekuly, výsledky jsou čteny zleva doprava (Zdroj č. 47)

6.2.2.3.2 Pyrosekvenace

Pomocí DNA polymerázy dochází k syntéze DNA tak, že k vyšetřovanému vzorku je postupně aplikován roztok, který obsahuje jen jeden typ nukleotidu. Roztoky s jednotlivými nukleotidy jsou postupně obměňovány. Pokud se nukleotid po přidání daného roztoku začlení do vznikajícího řetězce, dochází díky sérii enzymatických reakcí k produkci luminiscence. Předně dochází k produkci ATP pomocí ATP sulfurylázy, a to za přítomnosti adenosin 5' fosfosulfátu. Vzniklé ATP slouží pro konverzi luciferinu na oxyluciferin, což vede k produkci světla. Vzniklé světlo je zachyceno detektorem. Poslední reakcí je odstranění ATP a neinkorporovaných dNTP pomocí apyrázy. Proces je následně opakován s dalšími nukleotidy. (33)

Pyrosekvenování bylo úspěšně použito pro detekci některých erytrocytových antigenů, v současné době je ale omezeno jen na vyšetření několika systémů krevních skupin zahrnující Kell, Duffy a Kidd. (40)

6.2.2.3.3 Sekvenování nové generace (Next generation sequencing, NGS)

Zatímco sekvenátory první generace detekují DNA báze v řadě jednu po druhé, sekvenátory druhé generace umožňují paralelní sekvenování až tisíců molekul DNA současně. Díky tomu se snižuje doba potřebná k přečtení DNA sekvencí i cena jednoho vyšetření. (42) Masivní paralelní sekvenování dokáže analyzovat až 1000 Gbp (Giga báze) během jednoho běhu, přičemž čtecí délka fragmentů je 35-300 bp. (31)

Trhu dnes dominuje několik platform: Roche 454 Genome Sequencer, Illumina Genome Analyzer a Life Technologies SOLiD System. Jednotlivé sekvenátory využívají rozdílné reagenty a postupy. Unikátní kombinace přístupů k jednotlivým krokům celého sekvenačního běhu určuje rozdíly mezi jednotlivými technologiemi a typem a množstvím výsledných dat. (41)

Obecně lze NGS technologie rozdělit do dvou skupin. Tu první představují technologie založené na PCR amplifikaci templátu (PCR-based technologies) a zahrnují platformy: Roche 454 System, Illumina sequencers, AB SOLiD System a Ion Personal Genome Machine. Druhou skupinu tvoří technologie, které využívají tzv. single-molecule sequencing, takže nedochází k amplifikačnímu kroku před vlastní sekvenací. (41)

Největší výhodou NGS je kromě běžného genotypování především schopnost detekce nových alel nebo neznámých mutací vztahujícím se ke kódujícím regionům, které

mohou měnit expresi výsledných proteinů. Další výhodou je možnost detekce raritních genotypů jako například Lan- nebo Jr(a-). (31)

V oblasti transfuziologie a genotypování erytrocytových antigenů nejsou zatím na trhu komerčně dostupné systémy. Většina laboratoří provádějící sekvenování má tyto metody zavedené jako tzv. in-house metody. Tato situace by se však v následujících letech mohla změnit díky připravovanému evropskému projektu zaměřenému právě na implementaci NGS do transfuzní medicíny.

7 Praktická část

V praktické části bylo provedeno testování souboru vzorků vyšetřovaných v Národní referenční laboratoři (NRL) pro imunohematologii Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHK) Praha. Vyšetřování vzorků probíhalo od ledna 2014 do prosince 2015 (leden 2014 – prosinec 2015). Fenotyp erytrocytových antigenů byl určen sérologickými technikami. Genotyp je výsledkem microarray metod (BLOODchip Reference, ID CORE, obě od firmy Progenika Biopharma).

Vzorky byly rozděleny do tří souborů: a) „Dárci krve“ (zdraví jedinci, sérologicky mnohokrát otypovaní), b) „Pacienti“ (vzorky pacientů, kteří byli z určitého důvodu zařazeni mezi „komplikované“ – přítomnost protilátek,

přítomnost dvojí populace v důsledku mnohočetných transfuzí erytrocytů, senzibilizace auto-protilátkami. Poslední skupinu tvoří c) „Komplikace při určení RhD“ (dále jako „RhD“). Do té byly zařazeny vzorky, které byly zaslány do NRL z jiných imunohematologických laboratoří z důvodů komplikací při určování RhD antigenu (zeslabené reakce nebo diskrepantní reakce).

Údaje o počtu vyšetřených vzorků v jednotlivých souborech i celkový počet vzorků jsou shrnuty v Tabulce

Soubor	Počet vyšetřených vzorků
Dárci krve	78
Pacienti	63
RhD	28
Celkem	169

Tabulka 7 – Celkový souhrn počtu vyšetřených vzorků

7.

Výsledky tvoří porovnání shody detekce jednotlivých erytrocytových antigenů mezi sérologickými a microarray technikami. Případy, u kterých se výsledky mezi metodami neshodují nebo jsou obtížně interpretovatelné, jsou okomentovány zvlášť v rámci jednotlivých kapitol.

7.1 Sérologické metody

7.1.1 Vzorky dárců krve

Vzorky dárců krve byly vyšetřeny metodami sloupcové (gelové) aglutinace. Gelové karty, detekující antigeny pomocí monoklonálních antisér metodou přímé aglutinace byly použity pro vyšetření AB0 a Rh systému. Konkrétně byly použity karty DG Gel AB0/Rh (2D) a DG Gel Rh Pheno + Kell (Grifols). Na stejném principu fungují i gelové karty pro detekci antigenů M, N, Jk^a, Jk^b (DiaClon Anti-M, -N, -Jk^a, -Jk^b; BioRad).

Techniku přímé aglutinace, avšak s použitím polyklonálních lidských protilátek, využívají gelové karty pro detekci antigenů systému Lutheran a některých antigenů systému Kell (Anti-Lu^a, -Lu^b, -k, -Kp^a, -Kp^b; BioRad).

Antigeny S, s a systém Duffy byly vyšetřeny metodou nepřímé aglutinace s použitím gelové karty obsahující AGH (ID-Card LISS/Coombs [Anti-IgG + C3d]; BioRad). Do této karty jsou přidána polyklonální lidská antiséra (ID-Anti-S, -s, -Fy^a, -Fy^b) až po aplikaci suspenze erytrocytů. Ostatní použité karty obsahují v jednotlivých jamkách předkapaná diagnostická séra a tudíž je při vyšetření jednotlivých antigenů aplikována pouze suspenze erytrocytů.

7.1.2 Vzorky pacientů

Vzorky pacientů byly vyšetřovány stejnými metodami jako vzorky dárců krve. V případě positivity PAT (přímý antiglobulinový test) bylo provedeno opracování erytrocytů kitem EGA (EDTA Glycine-Acid; Immucor Gamma), který uvolňuje IgG protilátky z vazby na erytrocyt. Pokud se podařilo senzibilizaci vyvázat, bylo následně možné použít typování antigenů v kartách BioRad. Výjimku tvořil systém Kell, který je po opracování kitem EGA destruován a není možné jej otypovat. V případě, že se nepodařilo vyvázat senzibilizaci a PAT byl stále pozitivní, bylo použito typování ve zkumavkách pomocí monoklonálních sér (Anti-M, -N, -S, -s, Jk^a, -Jk^b; Immucor Gamma).

7.1.3 RhD

Vzorky odeslané do NRL z důvodů nejasných výsledků při určování antigenu RhD byly vyšetřeny diagnostiky Grifols DG Gel Rh Pheno + Kell, případně DG Gel AB0/Rh (2D).

Dále byl u většiny z nich použit BioRad ID-Partial Typing Set (Obr. 8) obsahující 6 monoklonálních sér anti-D, která byla spolu s vyšetřovanou erytrocytovou suspenzí aplikována do šesti jamek gelové karty ID Card Coombs Anti-IgG (rabbit).

Identifikační panel BioRad byl případně doplněn panelem firmy Diagast D-SCREEN (Obr. 9), který je určen především pro identifikaci parciálních RhD antigenů. Obsahuje 9 monoklonálních reagensií s anti-D séry. Diagnostika s klony IgM (séra 1, 3, 5, 6) byla použita pro zkumavkové testy metodou přímé aglutinace, zatímco klony IgG (séra 2, 4,

7, 8, 9) byly aplikovány do gelové karty ID Card Coombs Anti-IgG pro techniku nepřímé aglutinace.

Každý vzorek byl posuzován individuálně podle informací získaných z pracoviště, které vzorek zaslalo, a zároveň podle průběžných výsledků jednotlivých testů. Z tohoto důvodu nebylo nutné použít u všech vzorků všechny dostupné vyšetřovací metody. Naopak v některých případech ani použití vzácných polyklonálních sér (od D variantních jedinců, produkujících anti-D proti chybějícím epitopům) nevedlo k jednoznačnému uzavření výsledku.

Zelllinie Cell line Lignée cellulaire Linea cellulari Linea celular Clones	Anti-D	D II	D III	D IVa	D IVb	D V	D VI	D VII	DFR	DBT	DHAR	Reaktionen Reactions Reazioni Reacciones Reações
LHM76/55 (IgG)	1	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	
LHM77/64 (IgG)	2	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	
LHM70/45 (IgG)	3	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
LHM59/19 (IgG)	4	+	+	+	+	+	-	+/- *	-	+	-	
LHM169/80 (IgG)	5	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
LDM1 (IgM)	6	+	+	+	+	+/-	-	+	-	+	+/-	

* Deutsch: Eine schwächere Reaktion kann mit diesem Antikörper, im Vergleich mit den anderen E-Seren, beobachtet werden.

Obr. 8 - Masterlist panelu ID Partial D Typing Set (BioRad)

N°	Clone Klon	Type Typ	D Partials – D Partials – D Kategorien										
			II	IIIa IIIb IIIc	IVa	IVb	Va	VI	VII	DFR	DBT	RoHar	HMI
1	HM10	IgM	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
2	HM16	IgG	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
3	P3X61	IgM	+	+	+	+	+	-	+	±	+	+	+
4	P3X35	IgG	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
5	P3X21211F1	IgM	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
6	P3X21223B10	IgM	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
7	P3X241	IgG	+	+	+	+	-	-	+	±	-	-	+
8	P3X249	IgG	+	+	-	-	+	-	+	±	-	-	+
9	P3X290	IgG	+	+	±	-	+	±	+	+	-	-	+

Obr. 9 - Masterlist panelu D-SCREEN (Diagast)

7.2 Molekulárně-biologické metody

7.2.1 Purifikace DNA

Vzorky DNA byly extrahovány ze vzorků krve pomocí kitu QIAamp® DNA Mini (firma Qiagen). Poté byla změřena jejich koncentrace a čistota (poměr A260/280) na přístroji Nanodrop1000. Dále byly vzorky uchovány při teplotě 2-8°C pro použití během 1 měsíce nebo zamraženy na -20°C v případě použití v době přesahující 1 měsíc.

(48)

7.2.2 BLOODchip® Reference (Glass array)

BLOODchip® Reference je genetický test využívající purifikovanou genomovou DNA z lidské krve k určení alelických variant genů kódujících nejdůležitější systémy antigenů krevních skupin. Analyzuje 128 polymorfismů určujících alelické varianty erytrocytových a destičkových skupinových systémů, včetně hybridních genů.(49)

Princip testu: DNA je amplifikována ve třech odlišných PCR reakcích: Mastermix I (AB0 a RHD), Mastermix II (RHCE, Kell, Kidd, Duffy, MNS, Diego, Dombrock, Colton) a Mastermix III (exon 2 RHD, Lutheran a HPA). PCR produkty jsou fragmentovány a barveny odděleně dvěma odlišnými fluorofory (Cy3 a Cy5), aby bylo dosaženo nezávislé detekce genů RHD a RHCE. Takto fragmentované a obarvené produkty jsou nanášeny na povrch sklíčka (čipu) pro hybridizaci. Po jejím skončení je skenerem detekována navázaná DNA jako fluorescence emitovaná fluorofory po vybuzení laserem. Analýza získaných dat probíhá pomocí BLOODchip® softwaru. Je vygenerován genotyp a předpokládaný fenotyp pro každou alelickou variantu. (49).

Požadavky na kvalitu DNA vzorku pro analýzu: DNA koncentrace minimálně 20 ng/ul a poměr A260/A280 v rozmezí 1.6-1.95. Izolovaná DNA musí být naředěna na koncentraci 20 ng/ul AE pufrem (Qiagen). (49)

7.2.3 ID CORE XT™

Test ID CORE XT™ využívá technologii Luminex xMAP®. Genomová DNA je amplifikována a značena biotinem v rámci vícenásobné PCR. Denaturované produkty PCR se hybridizují na oligonukleotidové sondy spojené s barevně značenými kuličkami. Hybridizovaná DNA je značena fluorescentním konjugátem a výsledný signál je detekován pomocí systému Luminex® 100/200™. Výchozí data jsou zpracována analytickým softwarem ID CORE XT™, jehož výsledkem je genotyp a předpokládaný fenotyp. (50)

Tento test lze použít k rozlišení alelických variant určujících následující systémy krevních skupin: Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, Diego, Dombrock, Colton, Cartwright a Lutheran jako alternativa sérologických testů. Test ID CORE XT™ analyzuje 29 polymorfismů, které určují 37 antigenů výše uvedených systémů krevních skupin. (50)

Vstupní množství genomové DNA by mělo být v rozmezí 100 - 400 ng (v objemu 5 µl). Čistota genomové DNA (poměr A260/A280) v rozmezí 1,63-2,1. (50)

8 Výsledky

8.1 Soubor „Dárci krve“

8.1.1 Souhrn

V průběhu let 2014 a 2015 bylo vyšetřeno celkem 78 dárců krve pro diagnostické účely. Erytrocyty těchto dárců využívá NRL souběžně s komerčními diagnostikami. Pro některé speciální metody je totiž potřeba větší objem erytrocytů, než jaký je dodáván v komerčních kitech.

Metodou ID CORE bylo vyšetřeno 41 dárců, metodou BLOODchip 38 dárců. Jeden dárců byl vyšetřen oběma metodami.

Technika ID CORE vykazuje 98,2% shodu se sérologickými výsledky (765 ze 779 testů). Úplná shoda (100 %) byla zaznamenána v 17 z 19 testovaných antigenů. Při hodnocení polymorfismů v systému Lutheran (14 testů) jsou problémem tzv. „NO CALL“ výsledky. Dle informací dodavatele může být příčinou jedna z následujících možností:

- neurčitý genotyp (software není schopen přiřadit pozitivní výsledek jednomu nebo více polymorfismům),
- nízká intenzita signálu (pod prahovou hodnotou pro daný SNP),
- malý počet kuliček (pod prahovou hodnotou). (50)

Systém BLOODchip vykazuje 98,9% shodu (789 ze 798 testů). Úplná shoda (100 %) byla zaznamenána v 18 z 21 testovaných antigenů. V 7 případech se objevily hodnoty „NO CALL“ či „NOT VALID“ při testování polymorfismů pro antigen RhD a po jednom případě u antigenů „C“ a „c“. Detailní rozpis výsledků viz přílohy č. 1a-d.

Antigen	Dárci			
	ID CORE		BLOODchip	
	Shoda	NC/NV	Shoda	NC/NV
ABO	NT		38	
D	NT		31	7
C	41		37	1
c	41		37	1
C ^w	41		38	
E	41		38	
e	41		38	
M	41		38	
N	41		38	
S	41		38	
s	41		38	
Lu ^a	34	7	38	
Lu ^b	34	7	38	
K	41		38	
K	41		38	
Kp ^a	41		38	
Kp ^b	41		38	
Fy ^a	41		38	
Fy ^b	41		38	
Jk ^a	41		38	
Jk ^b	41		38	

Tabulka 8 - Celkový přehled výsledků shody mezi sérologií a microarray technikou (ID CORE a BLOODchip) u jednotlivých antigenů ve skupině „Dárci krve“. NT = Netestován, NC = No Call, NV = Not Valid.

8.1.2 Zajímavosti

V celém souboru vyšetřených dárců byl zachycen jeden případ genotypu FYA/FYX, fenotypově se projevující jako Fy^{a+b-} . Tento případ byl hodnocen jako „shoda“, protože se jedná o zeslabení antigenu Fy^b , který v přítomnosti druhé alely ve formě FY*A vykazuje slabé až negativní reakce (3, 17).

Dále byly detekovány 3 případy dárců s genotypem FYB/FYX s fenotypovým projevem Fy^{a-b+} . Z důvodu přítomnosti „normální“ alely FY*B se sérologicky zeslabená alela FY*02W.01 neprojeví (3).

V případě antigenu RhD bylo detekováno několik zajímavostí (všechny zachyceny metodou BLOODchip). V jednom případě byl zachycen antigen D weak typ 1 fenotypově se projevující jako RhD slabě pozitivní. Obdobný fenotypový projev měly i případy záchytu D weak typ 2 (1 dárců) a D weak typ 3 (1 dárců).

BLOODchip detekoval 3 případy dárců krve s genotypem DAUtype5/DVtype1-het sérologicky se projevující jako RhD+. Software tedy nabízí 2 možnosti heterozygotních mutací. Varianta DAUtype5 (RHD*10.05) obsahuje mutace 667T>G, 697G>C (nacházející se v 5. exonu) a mutaci 1136C>T (v 8. exonu). Oproti tomu varianta DVtype1 (RHD*05.01) je tvořena pouze mutacemi v exonu 5 (667T>G a 697G>C). BLOODchip detekoval přítomnost jedné mutované a jedné normální alely v pozicích 667 a 697. Nehodnotí však reakci v pozici 1136, proto nedokáže tyto varianty rozlišit. Tabulka zobrazující síly reakcí jednotlivých exonů však může napomoci v rozhodnutí, o kterou konkrétní variantu se jedná.

V případě dárce č. 7 (Obr. 10) je patrná snížená hodnota pouze v exonu 5 (ne čistě negativní z důvodu přítomnosti druhé „normální“ alely). Lze tudíž usuzovat na variantu DVtype1.

RHDEX1:	125.0
RHDEX2:	258.1
RHDEX3:	152.9
RHDEX4:	204.8
RHDEX5:	49.7
RHDEX6:	244.7
RHDEX7:	244.1
RHDEX8:	33.8
RHDEX9:	97.4
RHDEX10:	246.1

Obr. 10 - Intenzity jednotlivých exonů genu RHD (dárce č. 7)

Naopak dárkyně č. 108 (Obr. 11) má snížené hodnoty nejen v exonu 5, ale i v exonu 8. Z těchto hodnot tedy vyplývá, že je vyšší pravděpodobnost přítomnosti varianty DAUtype5.

RHDEX1:	205.2
RHDEX2:	357.5
RHDEX3:	234.8
RHDEX4:	278.2
RHDEX5:	61.7
RHDEX6:	358.3
RHDEX7:	288.0
RHDEX8:	127.7
RHDEX9:	161.8
RHDEX10:	376.7

Obr. 11 - Intenzity jednotlivých exonů genu RHD (dárce č. 108)

Třetí dárce s tímto genotypem (dárce č. 141) vykazuje „NO CALL“ hodnoty u polymorfismů BCV050 a 054. Zároveň má vysoké intenzity signálů pro obě barevné značky (tyto signály jsou mimo rozmezí doporučených hodnot). Vysoké jsou i hodnoty jednotlivých exonů RHD genu s nižšími hodnotami v exonech 5 a 8 (Obr. 12). To tedy nasvědčuje přítomnosti varianty DAUtype5.

CY3 I:	14697.3
CY3 B:	59.7
CY5 I:	13267.5
CY5 B:	88.8
Q2O1 I CY3:	33195.6
Q2O1 B CY3:	61.6
Q2O1 I CY5:	65535.0
Q2O1 B CY5:	90.98

RHDEX1:	285.2
RHDEX2:	502.6
RHDEX3:	298.8
RHDEX4:	345.9
RHDEX5:	102.7
RHDEX6:	381.6
RHDEX7:	357.3
RHDEX8:	133.7
RHDEX9:	205.3
RHDEX10:	483.1

Obr. 12 - Intenzity jednotlivých exonů genu RHD (dárce č. 141)

Výsledky všech těchto tří dárců byly uzavřeny jako RhD pozitivní.

8.2 Soubor „Pacienti“

8.2.1 Souhrn

Soubor „Pacienti“ je tvořen 62 vzorky. NRL v tomto období vyšetřila větší množství vzorků. Do této studie byla zahrnuta pouze část z nich. Jednalo se především o pacienty, u kterých nebylo možné jednoznačně určit přítomnost některých antigenů pomocí sérologických technik. Genetickými metodami BLOODchip i ID CORE bylo také vyšetřeno více vzorků, než kolik jich je zahrnuto v tomto souboru. Důvodem pro jejich vyloučení ze studie byla nejčastěji nízká kvalita purifikované DNA, která ovlivnila výsledek analýzy. Dalším důvodem vyloučení byly pozitivní reakce v negativní kontrole (nebo negativní reakce v pozitivní kontrole), což vedlo k neplatnosti všech výsledků v dané sérii. Tento případ byl častější v případě analýzy ID CORE. Metodou BLOODchip bylo vyšetřeno 34 vzorků, technikou ID CORE 21 vzorků a celkem 6 vzorků bylo vyšetřeno oběma technikami. Detailní tabulka všech výsledků viz přílohy č. 2a-d.

Tabulka 9 je rozdělena na dvě části (ID CORE a BLOODchip) podle toho, jakou metodou byly vzorky vyšetřovány. Pro každý antigen je uveden počet případů, ve kterých se shoduje sérologie s genetickým vyšetřením („Shoda“), počet případů, ve kterých byla sérologicky zachycena dvojitá populace erytrocytů („DP“) a tudíž nelze posoudit, zda se metody shodují, a počet případů, kdy byl zjištěn rozdílný výsledek mezi sérologickým a genetickým vyšetřením jednotlivých antigenů („Rozdíl“).

Antigen	Pacienti					
	ID CORE			BLOODchip		
	Shoda	DP	Rozdíl	Shoda	DP	Rozdíl
ABO	NT			33		5
D	NT			32		4
C	21	5		24	4	4
c	27			30	1	1
C ^w	26	1		29	1	
E	23	3	1	27	4	1
e	26	1		31	1	
M	9	4		15	3	
N	8	4	1	13	4	1
S	10	5		17	3	
s	13	2		18	2	
Lu ^a	5	1	2	15	1	1
Lu ^b	5	1	2	16		1
K	24	1	1	28	1	1
K	26			28	1	1
Kp ^a	6			10		
Kp ^b	6			10		
Fy ^a	8	5		17	6	2
Fy ^b	9	4		16	6	3
Jk ^a	16	2		24	2	1
Jk ^b	14	3	1	24	2	2

Tabulka 9 – Soubor „Pacienti“: Počty výsledků pro jednotlivé antigeny, rozdělené do skupin dle microarray metody a dále do skupin: "Shoda", "DP" a "Rozdíl". DP = dvojitá populace erytrocytů, NT = netestováno.

V tabulce 9 jsou zahrnuty případy, kdy sérologie vykazovala přítomnost dvojí populace erytrocytů. Skupina rozdílných výsledků obsahuje kromě jasně diskrepantních výsledků také případy, kde výsledek z microarray metody byl nejasný („no call“= „NC“) nebo nebyl validní („not valid“= „NV“). Tyto případy by neměly být hodnoceny v celkovém vyjádření shody mezi metodami, protože neposkytují jasně hodnotitelné výsledky. Proto jsou v tabulce 10 zobrazeny pouze případy jasně porovnatelných výsledků. Hodnoty z této tabulky jsou procentuálně vyjádřeny v tabulce 11.

Pacienti (NC/NV a DP nehodnoceno)				
Ag	ID CORE		BLOODchip	
	Shoda	Rozdíl	Shoda	Rozdíl
KS	NT		33	4
D	NT		32	3
C	21		24	3
C	27		30	
C ^w	26		29	
E	23	1	27	1
e	26		31	
M	9		15	
N	8	1	13	1
S	10		17	
s	13		18	
Lu ^a	5		15	1
Lu ^b	5		16	1
K	24	1	28	
K	26		28	
Kp ^a	6		10	
Kp ^b	6		10	
Fy ^a	8		17	2
Fy ^b	9		16	3
Jk ^a	16		24	1
Jk ^b	14	1	24	2

Tabulka 10 – Soubor „Pacienti“: Počty výsledků pro jednotlivé antigeny, rozdělené do skupin dle microarray metody a dále do skupin: "Shoda", "DP" a "Rozdíl". DP = dvojí populace erytrocytů; NT = netestováno.

Pacienti (NC/NV a DP nehodnoceno)				
Ag	ID CORE		BLOODchip	
	Shoda	Rozdíl	Shoda	Rozdíl
KS	NT		89%	11%
D	NT		91%	9%
C	100%		89%	11%
c	100%		100%	
C ^w	100%		100%	
E	96%	4%	96%	4%
e	100%		100%	
M	100%		100%	
N	89%	11%	93%	7%
S	100%		100%	
s	100%		100%	
Lu ^a	100%		94%	6%
Lu ^b	100%		94%	6%
K	96%	4%	100%	
K	100%		100%	
Kp ^a	100%		100%	
Kp ^b	100%		100%	
Fy ^a	100%		89%	11%
Fy ^b	100%		84%	16%
Jk ^a	100%		96%	4%
Jk ^b	93%	7%	92%	8%

Tabulka 11 – Soubor „Pacienti“: Procentuální zastoupení výsledků pro jednotlivé antigeny, rozdělené do skupin dle microarray metody a dále do skupin: "Shoda", "DP" a "Rozdíl". DP = dvojí populace erytrocytů; NT = netestováno.

Technika ID CORE vykazuje 98,6% shodu se sérologickými výsledky (282 z 286 testů). Úplná shoda (100 %) byla zaznamenána v 15 z 19 testovaných antigenů. Systém BLOODchip vykazuje 96,3% shodu (392 ze 407 testů). Úplná shoda (100 %) byla zaznamenána v 10 z 21 testovaných antigenů. V následující kapitole jsou okomentovány všechny rozdílné a nejasné výsledky jednotlivých erytrocytových antigenů rozdělené do dvou skupin podle microarray metod, kterými byly analyzovány.

8.2.2 Komentáře k neshodám

8.2.2.1 BLOODchip

AB0 (4 + 1 NC):

Pacient č. 34: Sérologicky v přední řadě (aglutinogeny) přítomen antigen B, avšak v zadní řadě (aglutininy) nenalezena žádná reakce. Tudíž zadní řada byla určena jako AB. Dle PCR-SSP se jedná o skupinu AB. BLOODchip vyhodnotil krevní skupinu jako A₁B. Zřejmě jde o zeslabení antigenu A, který není sérologickými metodami detekován. Vzorek byl odeslán k vyšetření metodou sekvenace do referenční laboratoře v Lundu (Švédsko) pro další upřesnění.

Pacient č. 36: Pacientka vyšetřována na Transfuzním oddělení VFN Praha (Všeobecná fakultní nemocnice), u které byl sérologicky v přední řadě detekován antigen B, v zadní řadě slabá reakce s A₁ erytrocyty a chybějící reakce s A₂ (gelové karty BioRad a zkumavkové testy). Při vyšetření pomocí karet firmy Grifols byly na přední řadě detekovány antigeny A i B (se slabší reakcí antigenu A) a v zadní řadě byly všechny reakce negativní. V NRL byl ověřen výsledek na kartách Grifols se shodnými reakcemi v přední řadě. Zároveň byla detekována podskupina A₂. V zadní řadě byla zachycena slabá reakce s A₁ erytrocyty zesilující při použití erytrocytů opracovaných enzymem. Sérologicky byl výsledek uzavřen: Krevní skupina A₂B se slabou expresí antigenu A a nepravidelnou protilátkou anti-A₁.

BLOODchip vyhodnotil krevní skupinu jako A₁B. Zřejmě je v DNA přítomen polymorfismus typický pro skupinu A₁, který detekuje microarray BLOODchip. Zároveň je ale přítomná další mutace způsobující fenotypový projev A₂, kterou BLOODchip nedetekuje. Vzorek byl odeslán pro upřesnění na sekvenaci do Lundu (Švédsko).

Pacient č. 45: Sérologickými metodami zjištěna přední řada bez antigenů, tudíž se jedná o skupinu 0. V zadní řadě byl detekován pouze aglutinin anti-A, odpovídající skupině B. Dle BLOODchip analýzy se jedná o krevní skupinu B (genotyp B01). Na obr. 13 je polymorfismus BCV008 označen jako „Out of Rank“. To vyznačuje přítomnost signálu, který software nezná a neumí vyhodnotit.

Výsledek sekvenace: *ABO*B.01/0.01* se záchytem dosud nepopsané mutace. V současné době probíhá analýza rodinné studie a popis této mutace ve spolupráci s referenční laboratoří v Lundu.

ABO		B01				
Name	Type	Polymorphism	Out of Rank	I/B	Not Valid	CV
BCV001	3	CONSENSUS_A (homABO87-88)	0	177.57	0	0.05
BCV002	3	CONSENSUS_A (homABO188G189C)	0	643.8	0	0.03
BCV003	2	O1,O1v (hetABO261G261delG)	0	183	0	0.03
BCV004	3	CONSENSUS_A (homABO322C)	0	472.24	0	0.03
BCV005	3	CONSENSUS_A (homABO467C)	0	388.37	0	0.03
BCV006	3	CONSENSUS_A (homABO646T)	0	306.27	0	0.03
BCV007	2	B (het ABO703GA)	0	673.95	0	0.02
BCV008	2	B (hetABO796CA)	1	214.41	0	0.03
BCV009	3	CONSENSUS_A (homABO802G)	0	299.51	0	0.04
BCV010	2	B,cisAB-1 ; possible O2,O3,Ael (hetABO803GC)	0	436.23	0	0.05
BCV011	3	CONSENSUS_A (homABO796-804)	0	131.04	0	0.05
BCV012	3	CONSENSUS_A (homABO1059-1061)	0	380.52	0	0.03

Obr. 13 - Tabulka detekovaných polymorfismů a intenzity jednotlivých signálů (Pacient č. 45)

Pacient č. 54: V tomto případě se nejedná o typickou neshodu, ale spíše o upřesnění sérologického nálezu. Na přední řadě byla ve sloupcích pro antigeny A a AB přítomna dvojí populace erytrocytů. Zadní řada vykazovala pozitivní reakce pro aglutinin anti-B. Průtokovou cytometrií bylo zjištěno, že cca 2,4% erytrocytů silně exprimuje antigen A, zatímco zbytek vykazuje pouze nepatrnou expresi. BLOODchip vyhodnotil krevní skupinu jako *A101*. Sekvenace potvrdila nález *A101* a neodhalila žádnou zeslabující mutaci. Jedná se tedy spíše o získané než o vrozené zeslabení exprese A antigenu v rámci základního onemocnění (porucha glykosylace v rámci klonálního preleukemického ev. leukemického onemocnění).

Pacient č. 23: Sérologicky přední řada zjištěna bez aglutinogenů odpovídající skupině 0. V zadní řadě detekovány velmi slabé reakce aglutininu anti-B. BLOODchip vyhodnotil výsledek jako tzv. NO CALL. Některé signály jsou označeny jako „Out of Rank“ a dále je přítomna neobvyklá kombinace signálů pro jednotlivé polymorfismy, kterou software BLOODchip není schopen vyhodnotit a vydat jednoznačný výsledek. Vzorek byl odeslán k sekvenaci do referenční laboratoře ve švédském Lundu.

RHD (3 + 1NC)

Pacient č. 29: Sérologicky popsáno jako D pozitivní, dle BLOODchip se jedná o variantní D, konkrétně: DIIIc. Zřejmě jde o atypický gen s přítomností dalších mutací.

Pacient č. 57: Sérologicky zjištěno jako D pozitivní, dle BLOODchip se jedná o mutaci v genu *RHD* nacházející se v oblasti mezi exonem a intronem 7. V současné době probíhá další testování a upřesňování mutace.

Pacient č. 63: V tomto případě se jednalo o pacienta po transplantaci krvetvorných buněk, která proběhla v roce 2004. Před transplantací byl testován v NRL sérologickými metodami s výsledkem: RhD pozitivní (Rh fenotyp CcD.ee). Dárce krvetvorných buněk byl rovněž otestován jako RhD pozitivní (Rh fenotyp CcD.ee). Bezprostředně po transplantaci byl tento pacient několikrát otestován s výsledkem: RhD pozitivní. V roce 2015 byl při kontrolním vyšetření zjištěn výsledek RhD negativní a C negativní (Rh fenotyp ccddee). Výsledek analýzy BLOODchip však potvrdil dárcovský fenotyp: CcD.ee. Metodou BLOODchip byla provedena i analýza DNA dárce (vzorek DNA z roku 2004), se shodným výsledkem. Dále byla provedena sekvenční vyšetření dárce i pacienta, která potvrzovala výsledek z BLOODchip. Vyšetření byla několikrát opakována z různých odběrů, aby byla vyloučena případná záměna vzorků.

Případ sérologické ztráty antigenů RhD a C zůstává nedořešen a je dále konzultován s referenčními laboratořemi v zahraničí.

Pacient č. 56: Sérologicky uzavřen jako D pozitivní. BLOODchip není schopen definovat RHD, výsledek je „NO CALL“. Důvodem je pravděpodobně nízká intenzita barevných signálů (viz dále kapitola RHCE – E).

RHCE - C (3 + 1NC)

Pacient č. 39: Sérologicky pozitivní pro antigen C i c. Dle BLOODchip je přítomen pouze gen pro „cc“, avšak předpokládaný fenotyp je „C+c+“.

Diskrepance mezi genotypem a předpokládaným fenotypem má upozornit na přítomnost RHCE r^s (haplotyp (C)ce^s). Tento haplotyp produkuje antigeny: normální c, e^s (slabé e), ce(f), slabé nebo parciální C, G a VS. Je tvořen hybridním genem *RHD-CE-D^s*, obsahujícím exony 1, 2, část 3 (kodony 121, 127, 128), 9 a 10 genu *RHD* a zbývající

část exonu 3, a exony 4-7 z genu *RHCE*. Původ exonu 8 není znám. (3, 17) Tyto genové přestavby dokazují i hodnoty signálů pro jednotlivé exony genu *RHD*. Hodnoty pro exony 1, 2, 9 a 10 jsou jasně pozitivní na rozdíl od ostatních exonů. Zároveň je s haplotypem r^s spojen antigen VS, jehož přítomnost potvrdil BLOODchip (BCV093: homRHCE733G). Toto antigenní uspořádání se běžně vyskytuje u osob afrického původu, ale je velmi raritní v ostatních populacích. (3) Pacient č. 39 pochází z afrického etnika. Fenotyp byl uzavřen jako Ccee.

RHCE Cc								cc	C+c+
RHCE Cc								ee	E-e+
RHC	Name	Type	Polymorphism	Out of Rank	I/B	Not Valid	CV	NO Cx	Cx-
RHC	BCV088	3	RHCE LITTLE C	0	281.46	0	0.02	NO Cw	Cw-
RHC	BCV089	1	RHCE no bigC	0	3.05	1	0.12	r's	r's
RHC	BCV090	3	RHCE r's	0	158.97	0	0.03	CE*(733G)	VS+
RHC	BCV093	1	RHCE VS (homRHCE733G)	0	166.07	0	0.04	kk	K.k+

Obr. 14 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHCE Cc a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient č. 39)

Pacient č. 57: Antigen C vykazuje sérologickými metodami negativní reakce. BLOODchip však určil přítomnost genu pro C.

V genu je zřejmě přítomný polymorfismus, který je u bělošské populace typický pro C. Zároveň však může mít přítomnou další nukleotidovou změnu, která způsobuje, že k fenotypovému projevu nedochází. Pacientka je afroameričanka. V této populaci je zvýšený výskyt antigenu c. Zároveň se v této populaci vyskytují i další nukleotidové změny, jež často ovlivňují výsledný fenotyp. Pro upřesnění konkrétních mutací by bylo nutné jednotlivé části genů podrobit sekvenaci. V současné době je pacientka vedena jako homozygot pro antigen c.

RHCE Cc								Cc	C+c+
RHCE Cc									E-e+
RHC	Name	Type	Polymorphism	Out of Rank	I/B	Not Valid	CV	Cx-	Cx-
RHC	BCV088	3	RHCE LITTLE C	0	337.03	0	0.36	Cw-	Cw-
RHC	BCV089	3	RHCE bigC	0	26.11	0	0.23		
RHC	BCV090		----- NO CALL -----	0	22.53	0	0.04		NO CALL
RHC	BCV093	1	RHCE VS (homRHCE733G)	1	165.93	0	0.03		VS+

Obr. 15 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHCE Cc a intenzity jednotlivých signálů (Pacient č. 57)

NC pro C a c

Pacient č. 60:

Sérologické typování antigenu C vykazovalo rozdíly mezi použitými diagnostikami. Gelové karty DiaMed – BioRad dávaly negativní reakce pro antigen C, zatímco všechna ostatní použitá diagnostika (Grifols, Immucor, Sanquin) poskytovala reakce pozitivní. Reakce pro antigen c, E, e byly vždy silně pozitivní.

BLOODchip vyhodnotil reakce pro Cc jako „NO CALL“ (Obr. 16). Reakci BCV089 nebyl software schopen vyhodnotit. Další zajímavostí je polymorfismus pro antigeny E a e, který je označen jako „Out of Rank“ (Obr. 17).

Metoda ID CORE detekovala přítomnost polymorfismů pro velké i malé C (Cc). Zároveň však upozornila na možnost přítomnosti parciální exprese antigenu E (detekovala přítomnost E i e). Výsledek genotypu byl: „RHCE*Ce, RHCE*cEFM (další možné, avšak méně pravděpodobné varianty: RHCE*cE, RHCE*CeFV nebo RHCE*CE, RHCE*ce(712G)).“

Tento vzorek byl odeslán na došetření pomocí sekvenační metody do referenční laboratoře v Bostonu (USA). Výsledkem sekvenace byl závěr: „Přítomnost genů RHCE*cE/RHCE*CeFV, obsahující 6 nukleotidových změn v exonu 5 s následnou změnou 4AA (pozice 223, 226, 233 a 238). Predikovaný fenotyp: slabé nebo variantní C, normální c a E, parciální e.“

Změna AA v pozici 226 (pramenící z nukleotidové změny v pozici 676) byla příčinou „Out of Rank“ hodnoty u RHCE Ee v microarray BLOODchip.

Doporučení pro transfuze: Jako dárce by měl být veden s fenotypem CcEe; příjemce by měl raději dostávat C- a e- přípravky.

RHCE Cc		NO CALL					NO CALL
RHCE Ee							E+e+
RHCE Cx							Cx-
RHCE Cw							Cw-
RHCE r's							no r's
RHCE VS							VS-
							-het

Obr. 16 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHCE Cc a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient č. 60)

RHCE Ee		Ee					E+e+
RHCE Cx							Cx-
RHCE Cw							Cw-
RHCE r's							no r's
RHCE VS							VS-
							-het

Obr. 17 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHCE Ee a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient č. 60)

RHCE - E (1)

Pacient č. 56: V sérologii byla zjištěna negativní reakce pro antigen E. Podle BLOODchip je antigen E přítomen. Ovšem v detailu polymorfismu *RHCE*(676C,G)* je patrná nízká hodnota intenzity signálu a tato hodnota je označena jako „Out of Rank“ (Obr. 18).

RHCE Ee								Ee	E+e+
RHC	RHCE Ee							O Cx	Cx-
RHC	Name	Type	Polymorphism	Out of Rank	I/B	Not Valid	CV	O Cw	Cw-
RHC	BCV091	2	RHCE*(676C,G)_Ee (+1)	1	22.56	0	0.1	no r's	no r's

Obr. 18 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHCE Ee a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient č. 56)

Na obrázku 19 jsou zvýrazněny hodnoty jednotlivých signálů odpovídající nízké kvalitě barevných spotů. Hodnota Q2O1 I CY3 by se měla pohybovat v rozmezí 7 000-15 000, zatímco Q2O1 I CY5 by měla nabývat hodnot 20 000-40 000. Tyto hodnoty jsou pravděpodobnou příčinou zkreslení výsledku.

CY3 I:	5731.4
CY3 B:	79.9
CY5 I:	6087.8
CY5 B:	51.3
Q2O1 I CY3:	16757.7
Q2O1 B CY3:	81.3
Q2O1 I CY5:	16765.75
Q2O1 B CY5:	52.31

Obr. 19 - Souhrn celkových intenzit jednotlivých barevných signálů. (Pacient č. 56)

Kell – K (1NC) + k (1NC)

Pacient č. 56: Sérologicky byla detekována slabá reakce u antigenu Kell a pozitivní reakce u antigenu Cellano. Metodou ID CORE byla potvrzena přítomnost obou antigenů a zároveň i přítomnost LFA antigenu Kp^a. Ten je příčinou sérologického zeslabení antigenu Kell. Technika BLOODchip však nebyla schopna vyhodnotit antigeny Kk (Obr. 20). S největší pravděpodobností je důvod stejný jako v případě vyhodnocení antigenu E (viz výše), tedy nedostatečná kvalita barevných signálů.

KELL Kk								NO CALL
KELL KpA	KELL Kk							KPB
KELL KpC	Name	Type	Polymorphism	Out of Rank	I/B	Not Valid	CV	KpC
KELL Kmo	BCV094	3	kk697 NORMAL	0	161.45	0	0.12	nod-
KELL JsA	BCV095	3	kk697 NORMAL	0	97.57	0	0.06	
	BCV096		----- NO CALL -----	1	356.06	0	0.18	JSB

Obr. 20 - Tabulka detekovaných polymorfismů KELL Kk a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient č. 56)

MNS – N (1)

Pacient č. 57: Sérologicky byl antigen N popsán jako negativní, avšak na BLOODchip i ID CORE je reakce pozitivní. Pacientka byla opakovaně transfundována, což mohlo ovlivnit sérologický výsledek. Je zde však i možnost, že gen pro antigen N je hybridní a sérologickými metodami tak není možné přítomnost antigenu zachytit.

Duffy – Fy^a (2) + Fy^b (3)

Pacient č. 41: Vzorek dárce byl zaslán k ověření fenotypu Fy^{a-b-}, aby mohl být zařazen do registru vzácných dárců krve. Sérologicky tedy Fy^{a-b-}, BLOODchip však detekoval přítomnost alel *FY*A/FY*X* s predikovaným fenotypem Fy(a+, bw+) bez průkazu nulové mutace *FYGATA*, která je příčinou fenotypu Fy^{a-b-}. Mutace je tedy v jiném genetickém mechanismu, což potvrdila i sekvenace. V současnosti probíhá zařazování této nové mutace do seznamu ISBT. Byla provedena rodinná studie, která zjistila, že stejnou mutaci nese i sestra (pacient č. 42) tohoto dárce. (51)

Pacient č. 47: Sérologie detekovala slabou reakci pro Fy^b antigen. Genotyp dle microarray BLOODchip popsán jako: Fy^{aa}. Pacientka byla opakovaně transfundována. Slabou pozitivitu v sérologii tak mohly způsobit natransfundované Fy^b pozitivní erytrocyty.

Kidd – Jk^a (1) + Jk^b (2)

Pacient č. 28: U polytransfundované pacientky bylo sérologickými technikami určeno složení antigenů v Kidd systému jako Jk^{a+b-}. Před tímto vyšetřením byly pacientce podány 4 TU erytrocytů. Microarray BLOODchip však určila, že je přítomen pouze gen *JKB* (v homozygotní formě). Tato diskrepance je pravděpodobně způsobena podanými transfuzními přípravky. Sérologicky byly detekovány antigeny natransfundovaných erytrocytů.

KIDD JkA/JkB		JKB/JKB						Jka- Jkb+
KIDD Jknu	KIDD JkA/JkB							Fya+ Fyb-
DUFFY FyA	Name	Type	Polymorphism	Out of Rank	I/B	Not Valid	CV	M-N+
MN	BCV101	3	NORMAL (homSLC14A11N5G)	0	45.49	0	0.06	S-s+
Ss	BCV102	1	JkBjkb_Jk2JK2 (homSLC14A1838A)	0	79.54	0	0.05	
U	BCV103	3	NORMAL (homSLC14A1871T)	0	197.38	0	0.05	

Obr. 21 - Tabulka detekovaných polymorfismů KIDD JKA/JKB a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient č. 28)

Pacient č. 57: Sérologicky popsán jako Jk^b negativní. ID CORE i BLOODchip vykazují genotyp *JKA/JKB*. Sérologické testování bylo provedeno po podání transfuzních přípravků (pacientka po výměnných erytrocytaferézách, s diagnózou srpkovité anémie). Je pravděpodobné, že podané TP erytrocytů byly Jk^b negativní a způsobily tak negativitu sérologického testování antigenu.

Lutheran – Lu^a (1)

Pacient č. 27: Sérologicky určen jako Lu a-, b+, dle BLOODchip Lu a+, b+. Přítomnost silné positivity v PAT mohla ovlivnit typování antigenů v NAT. Další možnou příčinou jsou vysoké počty podaných transfuzí erytrocytů. Antigen Lu^a patří do skupiny LFA , což znamená, že většina podaných transfuzí byla Lu a-. Sérologie tedy pravděpodobně detekovala antigeny natransfundované, nikoliv pacientčiny vlastní.

Lutheran – Lu^b (1)

Pacient č. 40: Tento případ byl zachycen v souvislosti s vyhledáváním vzácných dárců pro pacienty s protilátkami proti HFA. Sérologický nález této ženy byl definován jako Lu^{a-b-}.

Pro potvrzení nálezu bylo provedeno vyšetření metodou BLOODchip, která opakovaně prokázala přítomnost genu pro vysokofrekvenční Lu^b antigen.

Zřejmě se jedná o přítomnost dominantní alely genu *In(Lu)*, který způsobuje supresi některých erytrocytových antigenů (Lutheran, AnWj či P1). (17) Tento gen nemá vazbu ke genu kódujícímu antigeny systému Lutheran, což prokázaly rodinné studie. Vyskytuje se jen velmi raritně, většina populace nese homozygotní zastoupení alely *in(Lu)*. Mechanismus účinku alely *In(Lu)* není zcela objasněn. Daniels (3) popisuje několik možných teorií od glykosylačních abnormalit přes přestavby membránové konformace až po kódování transkripčních faktorů.

Gen pro Lu^b je tedy přítomen a byl tudíž detekován metodou BLOODchip, ale nedochází k jeho fenotypovému projevu. Tento případ byl tedy uzavřen jako Lu^{a-b-}.

8.2.2.2 ID CORE

RHCE – E (2)

Pacient č. 21: Vzorek vyšetřovaný na HTO Nemocnice na Bulovce – vykazoval sérologicky silné pozitivní reakce pro antigen e a slabě pozitivní pro antigen E (diagnostika BioRad). V NRL zachycena přítomnost dvojí populace erytrocytů ve sloupcích pro C, c a E (diagnostické karty Grifols). Ve sloupci pro antigen E bylo zhruba 90% erytrocytů negativních, zbylých cca 10% vykazovalo slabě pozitivní reakce. Dvojí populace erytrocytů byla způsobena předchozím podáním 9 TU erytrocytových TP. Podle ID CORE je přítomen pouze antigen e (genotyp *RHCE*Ce/RHCE*ce*).

MNS – N (1)

Pacient č. 57: Vyřešen v kapitole BLOODchip (str. 58)

Kell – K (1)

Pacient č. 4: Sérologicky popsán jako kk, zatímco podle ID CORE zachycen i gen pro K (tedy výsledek: Kk). Jednalo se o polytransfundovaného pacienta. Je pravděpodobné, že většina erytrocytových přípravků, které mu byly transfundovány, měla fenotyp kk. Sérologické techniky tudíž detekovaly antigeny natransfundovaných erytrocytů, nikoliv pacientovy vlastní.

Kidd – Jk^b (1)

Pacient č. 57: Vyřešeno v kapitole BLOODchip (str. 58)

Duffy – Fy^b (1)

Pacient č. 59: Vyřešeno v kapitole BLOODchip (str. 59)

Lutheran – Lu^a a Lu^b (2 NC)

Pacient č. 2 a pacient č. 17: Sérologicky popsán jako Lu^{a-b+}, dle ID CORE výsledek „NC“ neboli „NO CALL“. Výsledek byl uzavřen na základě závěru sérologické techniky jako Lu^{a-b+}.

8.3 Komentáře k neshodám – skupina „RhD“

Skupina RhD			
	Shoda	NC/NV	Rozdíl
AB0	22		
C	24	1	1
c	24	2	
C^w	26		
E	26		
e	26		
K	26		
k	26		

Tabulka 12 – Soubor „RhD“:
Celkový přehled- počet případů shody mezi sérologií a microarray technikou (ID CORE a BLOODchip) u jednotlivých antigenů ve skupině „RhD“. NC = No Call, NV = Not Valid.

Skupina RhD			
	Shoda	NC/NV	Rozdíl
AB0	100 %		
C	92,3 %	3,8 %	3,8 %
c	92,3 %	7,7 %	
C^w	100 %		
E	100 %		
e	100 %		
K	100 %		
k	100 %		

Tabulka 13- Soubor „RhD“:
Celkový přehled- procentuální vyjádření případů shody mezi sérologií a microarray technikou (ID CORE a BLOODchip) u jednotlivých antigenů ve skupině „RhD“. NC = No Call. NV = Not

8.3.1 Souhrn

Z důvodu komplikací při určování RhD byla v NRL pomocí microarray BLOODchip vyšetřena skupina 28 pacientů. V roce 2014 bylo vyšetřeno 13 vzorků, v roce 2015 celkem 15 vzorků. 2 pacienti byli ze studie odebráni z důvodu záměny vzorků (viz dále). Sérologickou technikou byl u všech vzorků hodnocen fenotyp v systémech Rh a Kell. Pouze u 22 z nich byla zároveň ověřena i krevní skupina v systému AB0. U zbylých 6 byla informace o skupině AB0 poskytnuta požadujícím pracovištěm a nebyla znovu ověřována v NRL.

Při porovnání sérologie s microarray technikou v systému AB0 byla 100% shoda, stejně jako u antigenů E, e, Cw, K, k.

V případě antigenů C a c byl systémem BLOODchip v jednom případě detekován výsledek „NO CALL“ (Vzorek RhD č. 17). Sérologicky byl vyhodnocen výsledek C negativní, c pozitivní. Z obrázku č. 22 vyplývá, že důvodem jsou „NO CALL“ hodnoty u polymorfismů BCV090 a BCV093, detekující haplotyp r's a antigen VS. Polymorfismus BCV088 pro antigen „c“ je označen jako typ 3, který popisuje jeho přítomnost na erytrocytech. Oproti tomu polymorfismus BCV089 pro antigen C má nízkou intenzitu a tudíž je vyhodnocen jako typ 1, který odpovídá jeho absenci. (Obr. 22) Ve výsledku tak sérologie odpovídá genetickému vyšetření.

Rozdílný výsledek mezi sérologií a genetikou při detekci antigenu C byl zachycen v případě pacientky RhD č. 3: sérologicky C negativní, c pozitivní. BLOODchip analýza detekovala přítomnost polymorfismů pro antigeny C i c.

Metoda PCR-SSP na systému FluoGene rovněž detekovala přítomnost polymorfismů pro antigeny C i c. Vzorek byl odeslán době k sekvenačnímu vyšetření.

RHCE Cc			NO CALL	NO CALL			
RHCE Ee			e	E-e+			
RHCE Cx			Cx	Cx-			
RHCE Cw			Cw	Cw-			
RHCE r's			CALL	NO CALL			
RHCE VS			CALL	NO CALL			
RHCE Cc							
	Name	Type	Polymorphism	Out of Rank	I/B	Not Valid	CV
	BCV088	3	RHCE LITTLE C	0	315.38	0	0.02
	BCV089	1	RHCE no bigC	0	2.69	1	0.16
	BCV090		----- NO CALL -----	0	25.04	0	0.04
	BCV093		----- NO CALL -----	1	245.38	0	0.03

Obr. 22 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHCE Cc a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient RhD č. 17)

Další rozdíl, tentokrát v antigenu c byl zachycen v případech vzorků RhD č. 22 a 23. Sérologicky určeno jako Cc, avšak dle BLOODchip je přítomen pouze polymorfismus pro C.

Zde se jedná o případ pravděpodobné záměny vzorků. Ve stejnou dobu byli v NRL vyšetřováni dva bratři (stejná příjmení) v rámci rodinné studie pro záchyt antigenu DVII (viz dále). Sérologické testování bylo prováděno z jiných odběrových zkumavek, než ze kterých byla izolována DNA. Vzorek RhD č. 22 měl fenotyp CC^w- K⁻, vzorek RhD č. 23 fenotyp C^w- K⁻. BLOODchip určil genotyp pro vzorek RhD č. 22: C^w- K⁻ a pro vzorek RhD č. 23: CC^w- K⁻. Vzhledem k pravděpodobné záměně vzorků nebylo možné tyto případy uzavřít. Byly vyžádány nové odběry pro upřesnění výsledků.

8.3.2 Hodnocení RhD

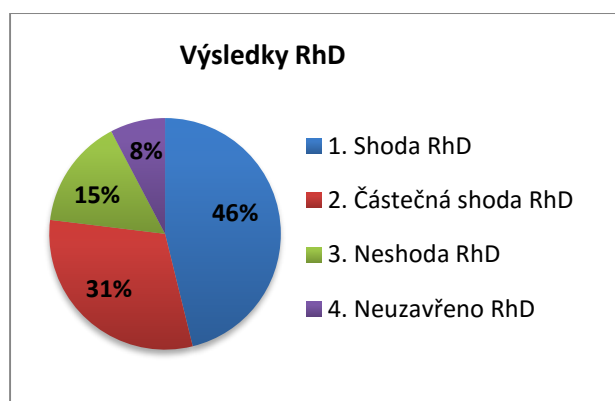
Z celkového počtu 28 vyšetřených vzorků se pouze 12 (43%) naprosto shodovalo v sérologii i ve výsledku z microarray. Dva případy byly ze studie odebrány. Jednalo se o rodinnou studii, kde byla ve vzorku ženy detekována varianta antigenu D VII. Následně byla odebrána krev jejím dvěma synům (stejně příjmení), kteří byli v NRL vyšetřováni sérologicky i pomocí microarray metody. Sérologické výsledky těchto mužů nekorespondovaly s výsledky z BLOODchip v antigenech C (viz výše) ani RhD. Z důvodu záměny těchto dvou vzorků nelze hodnotit výsledky v této studii. Po korekci (odebrání dvou výše zmíněných vzorků) stoupá procento shodných případů z původních 43% na výsledných 46%.

Získané výsledky byly rozděleny do skupin (Obr. 23)

1. Shoda sérologie a BLOODchip (12 vzorků)
2. Sérologie nedetekuje konkrétní typ, ale správně určila weak nebo variant, dále jen „Částečná shoda RhD“:
 - a) BLOODchip určil konkrétní typ RhD (3 vzorky)
 - b) BLOODchip rovněž nedetekuje tento typ RhD (5 vzorků)
3. Neshoda sérologie a BLOODchip: BLOODchip ukazuje správný výsledek, sérologie nesprávný, dále jako „Neshoda RhD“ (4 vzorky)
4. Neuzavřeno-došetřuje se, dále jen „Neuzavřeno“ (2 vzorky)

Skupina 1: Shoda sérologie s BLOODchip (12 vzorků)

V tabulce 14 je znázorněn počet případů u jednotlivých výsledků ve skupině „Shoda“. Nejčastěji (5 případů) se vyskytoval výsledek RhD weak typ 1 (slabé D typ 1).



Obr. 23 – Zastoupení jednotlivých skupin v souboru „RhD“

Výsledek	Počet
RhD +	2
RhD -	1
D weak 1	5
D VII	2
ROHAR	1
D weak 4.0/4.3	1

Tabulka 14 - Počty případů shodných výsledků ve skupině "RhD"

Skupina 2a: Sérologie nedetekuje konkrétní typ, ale správně určila weak nebo variant a BLOODchip určil konkrétní typ RhD (3 vzorky)

Vzorek RhD č. 4: Sérologicky velmi slabé reakce s oběma klony v kartě Grifols. Panel BioRad vykazoval negativní reakce odpovídající variantě DFR, zatímco panel Diagast odpovídal reakcemi spíše variantě D VII nebo DHMi. BLOODchip určil variantu RhD jako DCS-1. Tento závěr byl potvrzen i pomocí PCR-SSP.

Doporučení pro transfuze či podání anti-D profylaxe je v případě varianty DFR shodné jako pro variantu DCS-1: Dárce RhD pozitivní, Příjemce RhD negativní, v těhotenství je vhodné zvážit podání anti-D profylaxe v případě „normálně“ RhD pozitivního plodu. Při vyšší dávce bude docházet k vazbě anti-D i na vlastní erytrocyty.

Sérologické techniky nedetekují variantu DCS-1. Nicméně správně určily, že se jedná o variantní a nikoli o slabé RhD.

Vzorek RhD č. 5: Sérologicky v kartě Grifols zjištěny zeslabené reakce RhD, slabší s klonem nedetekujícím variantu DVI (+++ a ++). Panel BioRad detekoval reakce odpovídající variantě DFR, zatímco reakce v Diagast panelu byly nespecifické (odpovídající parciálnímu RhD nejasné specifity). BLOODchip vyjádřil výsledek jako Parciální RhD: DCS-1 (typ 1 pro BCV050, polymorfismus: RHD DCS homRHD676C), viz Obr. 24.

Sérologické techniky nedetekují variantu DCS-1. Nicméně správně určily, že se jedná o variantní, nikoli o slabé RhD.

Závěr: Variantní RhD - mutace v oblasti exonu 5 RHD genu. Doporučení pro transfuze: Dárce RhD+, Příjemce by měl dostávat RhD – přípravky.

Name	Type	Polymorphism	Out of Rank	I/B	Not Valid	CV
BCV050	1	RHD DCS (homRHD676C)	0	286.18	0	0.04
BCV051	3	NORMAL (homRHD686G)	0	121.41	0	0.07

Obr. 24 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHD a intenzity jednotlivých signálů se zaměřením na polymorfismus BCV050. (Pacient RhD č. 5)

Vzorek RhD č. 16: Sérologicky vykazující silně zeslabený RhD antigen. V kartách Grifols zjištěny téměř negativní reakce, panely BioRad a Diagast detekovaly nespecifické reakce (stopově pozitivní), směřující k variantnímu RhD. BLOODchip analýza detekovala genotyp D weak typ 11 (BCV062, typ 1, homRHD885T) s predikovaným fenotypem buď slabé D asociované s haplotypem *ce* nebo varianta Del v případě haplotypu *Ce* (Obr. 25). Vzhledem k pacientčině haplotypu *Ce* se jedná o genotyp DEL (s molekulární podstatou 885G>T v exonu 6, Met295Ile) s fenotypovým projevem extrémního zeslabení antigenu RhD, který se vyskytuje především populacích Orientu. (17) Doporučení: Dárce RhD+, příjemce RhD- přípravky.

RHD		weakDtype11						Weak D (cDe) or Del (CDc)						
RHD														
	Name	Type	Polymorphism	Out of Rank	I/B	Not Valid	CV	Name	Type	Polymorphism	Out of Rank	I/B	Not Valid	CV
RHD	BCV013	3	NORMAL (homRHD8C)	0	416.96	0	0.04	BCV050	3	NORMAL (homRHD676G)	0	684.33	0	0.06
RHD	BCV014	3	NORMAL (homRHD48G)	0	392.19	0	0.06	BCV051	3	NORMAL (homRHD686G)	0	373.36	0	0.06
RHD	BCV015	3	NORMAL (homRHD48G)	0	327.16	0	0.06	BCV052	3	NORMAL (homRHD697G)	0	168.3	0	0.05
RHD	BCV016	3	NORMAL (homRHD94)	0	1211.53	0	0.04	BCV053	3	NORMAL (homRHD711)	0	405.6	0	0.04
RHD	BCV017	3	NORMAL (homRHD121C)	0	165.22	0	0.07	BCV054	3	NORMAL (homRHD712G)	0	357.44	0	0.05
RHD	BCV018	3	NORMAL (homRHD147)	0	247.57	0	0.04	BCV055	3	NORMAL (homRHD785)	0	414.36	0	0.04
RHD	BCV019	3	NORMAL (homRHDIVS1+1G)	0	146.07	0	0.06	BCV056	3	NORMAL (homRHD807T)	0	391.55	0	0.04
KEL	BCV020	3	NORMAL (homRHD161T)	0	1010.97	0	0.04	BCV057	3	NORMAL (homRHD807T)	0	358.15	0	0.06
KEL	BCV021	3	NORMAL (homRHD178A)	0	1171.62	0	0.04	BCV058	3	NORMAL (homRHD809T)	0	257.25	0	0.07
KEL	BCV022	3	NORMAL (homRHD203G)	0	927.51	0	0.05	BCV059	3	NORMAL (homRHD845G)	0	642.53	0	0.03
KEL	BCV023	3	NORMAL (homRHD270G)	0	454.32	0	0.05	BCV060	3	NORMAL (homRHD848C)	0	529.8	0	0.05
KEL	BCV024	3	NORMAL (homRHD1148T)	0	208.66	0	0.06	BCV061	3	NORMAL (homRHD854G)	0	1033.73	0	0.03
KEL	BCV025	3	NORMAL (homRHD329T)	0	1227.29	0	0.04	BCV062	1	RHD M295I,weDty11 (homRHD885T)	0	788.51	0	0.06

Obr. 25 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHD a intenzity jednotlivých signálů se zaměřením na polymorfismus BCV062. (Pacient RhD č. 16)

Skupina 2b: Sérologie nedetekuje konkrétní typ, ale správně určila weak nebo variant a BLOODchip rovněž tento typ RhD nedetekuje (5 vzorků)

Vzorek RhD č. 1: Sérologie v kartě Grifols poskytuje slabší reakce RhD (++ a +++), v panelech BioRad a Diagast negativní reakce odpovídající variantě D VII. BLOODchip vyhodnotil výsledek jako RhD+, ovšem s upozorněním na heterozygotní zastoupení polymorfismu BCV052: RHD DVa (kou, to, yh, sm), hetRHD697GC (Obr. 26).

Sekvence 5. exonu určila variantu RhD: DYU (*RHD*DYU*), S700T (P234Trp). BLOODchip tuto mutaci nedetekuje, ale zachytil nukleotidovou změnu v oblasti velice blízké místu bodové mutace pro variantu DYU. Sérologické techniky tuto variantu rovněž nedetekují, nicméně zachytily přítomnost parciálního RhD.

Doporučení pro transfuze: Dárce RhD+, příjemce by měl dostávat RhD- přípravky, těhotenství: raději podat anti-D profylaxi.

		Genotype					Predicted Phenotype
ABO		A1B					AB
RHD		het BCV052-"Apparently non-negative"					RHD +
RHCE		RHD					
Name	Type	Polymorphism	Out of Rank	I/B	Not Valid	CV	
BCV013	3	NORMAL (homRHD8C)	0	210.37	0	0.04	
BCV014	3	NORMAL (homRHD48G)	0	228.84	0	0.05	
BCV015	3	NORMAL (homRHD48G)	0	213.61	0	0.06	
BCV016	3	NORMAL (homRHD94)	0	393.45	0	0.08	
BCV052	2	RHD Dva(kou,to,yh,sm) (hetRHD697GC)	1	38.42	0	0.05	

Obr. 26 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHD a intenzity jednotlivých signálů se zaměřením na polymorfismus BCV052. (Pacient RhD č. 1)

Vzorek RhD č. 9: Sérologicky zjištěny slabší reakce odpovídající slabému RhD.

BLOODchip poskytuje výsledek RhD+ se slabými reakcemi v některých exonech, především exon 8 (Obr. 27). Sekvence určila genotyp *RHD*IVS8+4C*, intronový polymorfismus, který může ovlivnit RhD expresi alterací mRNA splicingu. Jedná se o molekulární mechanismus způsobující změny v oblasti exonu 5 a 8. BLOODchip tuto variantu nedetekuje, přesto upozornil na změny v oblasti 8. exonu. Sérologie správně detekovala slabší reakce antigenu RhD.

Doporučení: Dárce RhD pozitivní, příjemci podávat RhD negativní přípravky. Těhotenství: Vzhledem k sérologickému nálezu (žádné výpadky epitopů) není podání anti-D profylaxe nutné.

RHDEX1:	58.4
RHDEX2:	292.8
RHDEX3:	189.5
RHDEX4:	104.2
RHDEX5:	18.9
RHDEX6:	177.1
RHDEX7:	91.6
RHDEX8:	7.9
RHDEX9:	19.1
RHDEX10:	164.8

Obr. 27 - Intenzity jednotlivých exonů genu RHD (Pacient RhD č. 9)

Vzorek RhD č. 14: Sérologicky určen jako suspektní D weak, Rh fenotyp „ccee“. Dle BLOODchip hodnocena jako „NO CALL“ (nízké hodnoty některých signálů, které nezapadají do žádného předdefinovaného algoritmu). Jako typ 1 je však označen polymorfismus BCV044 detekující homozygotní substituci 602C>G (Obr. 28), která se vyskytuje u genotypů D weak typ 4.0, D weak typ 4.1 či varianty DIIIa. Sekvenováním byl definován D weak typ 4.0, nukleotidové substituce 602G (exon 4), 819A (exon 6).
 Doporučení pro transfuze: Jako dárce krve RhD pozitivní, příjemce by měl raději dostávat RhD negativní přípravky, v těhotenství vzhledem k sérologickému nálezu, který neprokázal výpadek D epitopů), není nutné podání anti-D profylaxe.

BCV044	1	RHD weDty4.0,weDty4.1,DIIIa,DAR (homRHD602G)	0	121.03	0	0.05
--------	---	---	---	--------	---	------

Obr. 28 - Tabulka pro polymorfismus BCV044 genu RHD. (Pacient RhD č. 14)

Vzorek RhD č. 20: Sérologicky zjištěny zeslabené reakce v kartách Grifols a v panelech BioRad a Diagast reakce neodpovídající známým variantám směřujícím k parciálnímu RhD. BLOODchip vyhodnotil výsledek jako RhD+.

Sekvence určila genotyp *RHD***DLO*, parciální RhD s přestavbou v exonu 6 (C851T). Tuto variantu BLOODchip ani sérologické metody nejsou schopny detekovat. Sérologie však správně detekovala reakce podobné parciálnímu RhD.

Doporučení pro transfuze: Dárce RhD+, příjemce by měl dostávat RhD- přípravky;
 Těhotenství: Chybí evidence-based informace o nutnosti a potřebném dávkování profylaxe. V případě podání anti-D by byla potřebná vyšší dávka – poměrně velká část podané anti-D se bude vázat na vlastní erytrocyty.

Vzorek RhD č. 25: Sérologicky zjištěny v kartě Grifols slabší reakce (+++), stejně tak u panelu BioRad – susp. RhD weak. BLOODchip určil genotyp *RHD (1-9)-CE(10)* s predikovaným fenotypem Del. Tento genotyp má upozornit na slabou intenzitu signálů v oblasti exonu 10, kterou software vyhodnotil jako substituci exonem 10 z genu RHCE (Obr. 29). Sekvence definovala genotyp RhD weak typ 20 (*RHD*01W.20*) s nukleotidovou změnou v pozici c.1250T>C v exonu 10, způsobující kvantitativní zeslabení RhD antigenu. Tomuto výsledku odpovídá sérologie a částečně i výsledek z microarray. Doporučení: Dárce RhD+, Příjemce může dostávat RhD+ přípravky.

RHD		RHD (1-9)-CE(10)	Del
RHDEX1:	69.6		
RHDEX2:	100.7		
RHDEX3:	46.8		
RHDEX4:	99.8		
RHDEX5:	54.9		
RHDEX6:	90.3		
RHDEX7:	68.8		
RHDEX8:	33.6		
RHDEX9:	47.3		
RHDEX10:	10.4		

Obr. 29 - Genotyp a predikovaný fenotyp analýzy genu RHD a rozpis hodnot jednotlivých exonů genu RHD (Pacient RhD č. 25)

Skupina 3: Neshoda sérologie a BLOODchip: BLOODchip poskytl správný výsledek, sérologie nesprávný (4 vzorky)

Vzorek RhD č. 26: Sérologicky popsány slabší reakce v kartě Grifols, nespecifické reakce zjištěny s některými klony v panelech BioRad a Diagast. Některé reakce jsou čistě negativní, odpovídající spíše variantnímu RhD. BLOODchip vyhodnotil RhD jako pozitivní se slabšími reakcemi v některých polymorfismech. Sekvenací určen RhD weak typ 25 (341G>A s následnou změnou Arg114Gln) s malou změnou epitopů. BLOODchip tuto oblast nedetekuje, proto vyhodnotil výsledek jako RhD pozitivní. Zajímavostí jsou však negativní sérologické reakce v případě malé změny epitopů a přítomnosti pouze slabého RhD. Reakce diagnostických sér byly specifické k chybějícím epitopům.

Vzorek RhD č. 7: Sérologicky zjištěna negativní reakce v kartě Grifols, zatímco panely BioRad a Diagast prokazovaly netypické reakce odpovídající parciálnímu RhD. BLOODchip určil vzorek jako D weak typ 1 (BCV058, typ 1, homRHD809G). Tomu odpovídá i asociovaný haplotyp Ce. Sekvenace potvrdila výsledek RhD weak typ 1.1 (exon 1 C52G - p.18Val; exon 6 C809G - p.270Gly). Mutaci v exonu 1 BLOODchip nedetekuje a nemůže tudíž určit D weak typ 1.1.

Doporučení pro transfuze: Dárce RhD+; Příjemce RhD-; Podání anti-D v těhotenství není nutné.

Vzorek RhD č. 27: Tento vzorek vykazoval rozdílné síly reakcí mezi klony anti-RhD v kartě Grifols, ale obě reakce byly zeslabené. Panely BioRad i Diagast odpovídaly susp. D weak. BLOODchip definoval variantní RhD, genotyp *DHMi* (BCV060, typ 1, homRHD848T), viz Obr. 30. Nález odpovídá i asociovaný haplotyp *cE*. (3) Výsledek byl následně potvrzen pomocí PCR-SSP. Panel BioRad nezachytává variantu *DHMi*, ale panel Diagast by ji měl prokázat. Pravděpodobně se jedná o variantu netypického *DHMi*, které kromě mutace typické pro *DHMi* obsahuje ještě další nukleotidovou změnu, způsobující vznik epitopů, se kterými pozitivně reagoval klon séra číslo 5 (má vykazovat negativní reakce v přítomnosti *DHMi*).

Doporučení pro transfuze: Dárce RhD+, Příjemce RhD-, Těhotenství: vzhledem k možnosti imunizace lze uvažovat o podání anti-D profylaxe (není však dostatek evidence-based informací o účinném dávkování – část podaných anti-D protilátek se bude vázat na mateřské erytrocyty).

BCV060 1	RHD DHMi (homRHD848T)	0	40.21	0	0.06
----------	-----------------------	---	-------	---	------

Obr. 30 - Tabulka pro polymorfismus BCV060 genu RHD (Pacient RhD č. 27)

Vzorek RhD č. 28: Sérologie vykazovala zeslabené reakce v gelové kartě Grifols, v panelu BioRad zjištěna reakce odpovídající D weak a nespecifické reakce v panelu Diagast, které naznačovaly spíše přítomnost variantního RhD. BLOODchip určil genotyp *DNB* (parciální RhD) pomocí polymorfismu BCV076 (homRHD1063A), viz Obr. 31. Výsledek byl ověřen sérologickou reakcí s protilátkou anti-D, která nereaguje s antigenem DNB. Výsledek reakce byl negativní v nepřímém antiglobulinovém testu. Oba použité panely nejsou schopny detekovat variantu DNB.

Doporučení pro transfuze: Dárce RhD+, Příjemce RhD-, Těhotenství: vzhledem k možnosti imunizace lze uvažovat o podání anti-D profylaxe (není však dostatek evidence-based informací o účinném dávkování – část podaných anti-D protilátek se bude vázat na mateřské erytrocyty).

BCV076 | 1 | RHD DNB (homRHD1063A) | 0 | 72.26 | 0 | 0.06

Obr. 31 - Tabulka pro polymorfismus BCV076 genu RHD (Pacient RhD č. 28)

Skupina 4: Neuzavřeno-došetřuje se (2 vzorky)

Vzorek RhD č. 11: Zjištěno sérologické zeslabení reakcí pro antigen RhD, v panelech BioRad i Diagast byly detekovány nespecifické reakce, odpovídající spíše parciálnímu RhD. BLOODchip definoval výsledek jako RhD+ se slabšími signály pro exony 8 a 5. Vzorek byl odeslán na sekvenaci k upřesnění nálezu.

Vzorek RhD č. 3: Sérologicky zjištěny slabé reakce s oběma klony v kartě Grifols. S panelem BioRad popsány slabší reakce odpovídající slabému RhD. BLOODchip výsledek: „NO CALL“ značící kombinaci signálů, které software neumí vyhodnotit. Zároveň je patrná slabší reakce v exonu 5 (Obr. 32). Podle PCR-SSP se jedná o slabé D typ 1. Základem slabého D typ 1 je mutace v 6. exonu (809T>G) s následnou AK změnou Val270Gly, která je zároveň asociována s haplotypem Ce (3). Pacientčin sérologický haplotyp R2R2 tedy neodpovídá nálezu D weak typ 1. Metodou BLOODchip i metodou FluoGene byly detekovány polymorfismy pro C, c, E a e. Vzorek byl odeslán na sekvenaci k upřesnění nálezu.

RHDEX1:	257.7
RHDEX2:	578.9
RHDEX3:	319.2
RHDEX4:	322.8
RHDEX5:	62.3
RHDEX6:	377.9
RHDEX7:	343.4
RHDEX8:	146.7
RHDEX9:	223.6
RHDEX10:	586.1

Obr. 32 - Rozpis hodnot jednotlivých exonů genu RHD (Pacient RhD č. 3)

9 DISKUSE

Ve skupině „Dárci krve“ (78 dárců) byl zjištěn vysoký stupeň shody mezi sérologickým vyšetřením a oběma microarray metodami (98,2 resp. 98,9 %). Jako neshodné byly vyhodnoceny výsledky označené jako „No Call“ (NC) nebo „Not Valid“ (NV), které byly způsobeny buď nízkou intenzitou signálu nebo neurčitým genotypem, který software nedokázal vyhodnotit. Ve 4 případech byla detekována přítomnost alely *FY*X* s odpovídajícím sérologickým projevem. U tří dárců byl detekován variantní D antigen s malou změnou epitopů, sérologicky detekovaný jako běžné RhD.

Genotypizace dárců krve je nepochybně velmi přínosná. Nabízí možnost záchytu variantních i zeslabených antigenů, které jsou sérologicky nedetekovatelné.

Soubor „Pacienti“ (62 vyšetřených vzorků) již vykazuje mnohem větší variabilitu výsledků. Značnou část tvořily případy polytransfundovaných pacientů, u kterých sérologickými technikami nebylo možné určit přítomnost či nepřítomnost jednotlivých antigenů z důvodů detekce dvojí populace erytrocytů. Microarray metody definovaly genotyp příslušných antigenů, ale z důvodů nejasných sérologických výsledků nelze hodnotit shodu mezi oběma technikami.

Dále se obdobně jako v souboru dárců krve vyskytovaly výsledky NC nebo NV. U metody BLOODchip lze nahlédnout do podrobných tabulek jednotlivých polymorfismů. Tato možnost ve většině případů poskytne informace, ze kterých je možné určit další postup a směr dalšího vyšetřování vzorku. Technika ID CORE však tuto možnost nenabízí, tudíž jedinou možností, jak určit výsledek, je opakování analýzy nebo provedení sekvenace.

Po vyřazení výše zmíněných výsledků z hodnocení shody (dvojí populace v sérologii a NC/NV v microarray) vykazuje technika ID CORE 100% shodu u 15 z 19 hodnocených antigenů. U 4 antigenů je vždy po jednom neshodném výsledku. Technika BLOODchip si v daném souboru komplikovaných pacientů připisuje 100% shodu pouze u 10 z 21 (47,6 %) sledovaných antigenů. V případě systému AB0 se většinou jedná o přítomnost alel, které systém detekuje, a zároveň jsou přítomny i další mutace (nedetekovatelné pomocí BLOODchip), které způsobují sérologickou variabilitu. V systému Rh byla většina neshod tvořena pacienty pocházejícími z jiné než kavkazské populace, jejichž geny obsahovaly mutace, které microarray nedetekují, nebo naopak, které nejsou

zachytitelné pomocí sérologických technik. V případech dalších antigenů se často jednalo o zkreslení sérologických výsledků v důsledku podání mnohočetných transfuzí nebo o přítomnost neobvyklých mutací, které microarray nedetekuje.

Soubor „RhD“ je výsledkově nejrozmanitější ze všech tří sledovaných skupin. To odpovídá i povaze RhD antigenu, který je definován mnoha variantami genových přestaveb způsobujících širokou škálu proteinových odlišností. Zhodnocení této skupiny je velmi obtížné, neboť se nejedná o skupinu náhodně vybraných případů, ale o případy komplikované, které (až na výjimky) neposkytovaly jasné výsledky při porovnání sérologie a metody PCR-SSP. Většina vzorků v NRL vyšetřovaných pro komplikaci při určování RhD je nejprve vyšetřena sérologicky a následně analyzována pomocí PCR-SSP reakce s hodnocením na elektroforetickém gelu. Teprve v případě nejasných nebo diskrepantních výsledků je vzorek vyšetřen další metodou, v tomto případě microarray BLOODchip.

Při statistickém zpracování této skupiny 26 vzorků se ukázalo, že je velice heterogenní. Proto je statisticky obtížně hodnotitelná. Soubor byl rozdělen do 4 skupin podle podobných společných charakteristik. První skupinu tvoří vzorky, jejichž výsledky sérologie a BLOODchipu se shodovaly (12 z 26 vzorků; 46,2 %).

Skupina 2: Sérologie nedetekuje konkrétní typ RhD, ale správně určila, zda se jedná o slabé nebo variantní RhD. Ta byla rozdělena do dvou podskupin: a) BLOODchip určil konkrétní typ RhD (3 případy) a b) BLOODchip nedetekuje tento typ RhD (5 případů). Celkem 4 vzorky byly zařazeny do skupiny s názvem „Neshoda: BLOODchip určil konkrétní RhD, zatímco sérologické techniky neodpovídaly danému výsledku“. Poslední skupina (2 vzorky) obsahuje neuzavřené případy, které se v současné době došetřují.

V případech neshody se většinou jednalo o typ antigenu, který jedna z použitých metod nedetekuje. Pokud nebylo možné ani pomocí výsledků z microarray definovat variantu antigenu, byl vzorek odeslán k došetření pomocí sekvenace do zahraniční referenční laboratoře.

10 ZÁVĚR

Hlavním cílem práce bylo vyhodnotit míru shody mezi výsledky získanými sérologickými a microarray metodami. Vzhledem k heterogenitě souboru nebylo možné zhodnotit shodu v celém souboru vzorků dohromady. Soubor byl rozdělen podle původu vzorků a podle řešené problematiky do 3 skupin. Ve skupině zdravých dárců krve, kteří netrpí závažnými onemocněními ani jim nebyly podány transfuzní přípravky, je shoda při použití techniky ID CORE 98,2% (765 ze 779 testů); úplná shoda (100 %) byla zaznamenána v 17 z 19 testovaných antigenů. Technika BLOODchip vykázala 98,9% shodu (789 ze 798 testů). Úplná shoda (100 %) byla zaznamenána v 18 z 21 testovaných antigenů. U skupiny pacientů je patrný jednoznačný přínos microarray metod v případech, kde sérologicky nelze určit přítomnost antigenů. Případy rozdílných nálezů jsou většinou způsobeny přítomností vzácnější mutace a faktem, že jedna z metod tuto mutaci nedetekuje. Dalším častým jevem je sérologický záchyt antigenu transfundovaných erytrocytů, které v oběhu pacienta v danou chvíli převažují. Microarray poté detekovala pacientův vlastní genotyp, který se neshodoval s fenotypem určeným sérologicky. Skupinu RhD nelze statisticky spolehlivě zhodnotit, protože obsahuje malý počet vzorků a navíc je tvořena rozmanitými případy s detekcí vzácných mutací. Pravděpodobné příčiny neshod u této skupiny jsou popsány v kapitole 8.3.2.

Microarray technologie jsou nesporně přínosem pro využití ve velkých imunohematologických laboratořích. Technika ID CORE je vhodnější pro testování dárců krve vzhledem k možnosti většího počtu vyšetření v jedné sérii a také s ohledem na menší finanční a časovou náročnost. Zároveň je také výborným pomocníkem pro testování antigenů polytransfundovaných či autoprotilátkami senzibilizovaných pacientů, u kterých není možné určit přítomnost antigenů sérologickými technikami. Její nevýhodou je fakt, že současně nabízené kity nedetekují antigeny AB0 systému a antigen RhD. Technologie BLOODchip Reference není vhodná pro plošné testování dárců krve. Příčinou je nízký počet vzorků, který lze otestovat v jedné sérii a především časová a finanční náročnost jednoho vyšetření. Tato technologie je vhodná pro testování diskrepantních a komplikovaných vzorků s ohledem na detekci vzácnějších

genotypových variant. Výhody přináší pro referenční laboratoře, ve kterých se takovéto případy kumulují.

Genetické metody jsou velkým přínosem pro diagnostiku v transfuzní medicíně, nicméně zatím nemohou plně nahradit sérologické testování. Sérologie detekuje přítomnost či nepřítomnost antigenních struktur, zatímco genetické techniky detekují přítomnost určitého genu, který se může, ale nemusí projevit. Existuje mnoho dosud nepopsaných mutací, které regulují vznik a výslednou konformaci příslušného antigenu. Tyto mutace v současnosti rutinně dostupné genetické vyšetření nezachytí. Nemaleou roli hraje i cena vyšetření, která je mnohonásobně vyšší než cena vyšetření sérologickou technikou.

Použití genetických technik v imunohematologické laboratoři je velmi přínosné při testování dárců krve se vzácným fenotypem. Tito dárci jsou zařazováni do Registru vzácných dárců krve. U nich je důležité ověřit sérologické výsledky pomocí genetických metod. Další nespornou výhodou je testování polytransfundovaných a komplikovaných pacientů. Těmto pacientům je po stanovení genotypu možné vybírat transfuzní přípravky „na míru“ a předcházet tak případné senzibilizaci odlišnými antigeny, vedoucími k tvorbě protilátek a s tím spojeným následným komplikacím.

11 POUŽITÉ ZKRATKY

PCR-AS	Alelově specifická PCR
AK	Aminokyselina
AE1	Anion Exchanger 1 = protein 1 vyměňující anionty
AGH	Antiglobulinum Humanum = lidský antiglobulin
AIHA	Autoimunní hemolytická anémie
bp	base pair = pár bází
BITS	Bristol Institute for Transfusion Sciences
CTBT	Centre de Transfusió I Banc de Teixits
cDNA	complementary DNA = komplementární DNA
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
dCTP	deoxycytidin trifosfát
dNTPs	Deoxynukleotidtrifosfát
DNA	Deoxyribonucleic Acid = deoxyribonukleová kyselina
Gal	D-galaktoza
dsDNA	double stranded DNA
DARC	Duffy Antigen Chemokine Receptor = Duffy antigen receptor pro chemokiny
DBP	Duffy Binding Protein = Duffy-vážíci protein
DP	Dvojí populace
EGA	EDTA Glycine-Acid
GPB	Glykophorin B
HON	Hemolytické onemocnění novorozence
HFA	High Frequency Antigen = vysokofrekvenční antigen
HEA	Human Erythrocyte Antigen
HLA	Human Leukocyte Antigen = Lidský leukocytární antigen
HPA	Human Platelet Antigen = Lidský trombocytární antigen
HTO	Hematologicko-transfuzní oddělení
CGD	Chronic Granulomatous Disease = Chronická granulomatóza
IAP	Integrin asociovaný protein
IL-8	Interleukin 8
ISBT	International Society of Blood Transfusion = Mezinárodní společnost krevní transfuze
ICAM-4	Intracellular adhesion molecules = intracelulární adhezivní molekuly
kbp	Kilo base pair = kilo párů bází
LFA	Low Frequency Antigen = nízkofrekvenční antigen
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen-1 = Antigen 1 asociovaný s funkcí lymfocytů
mRNA	messenger Ribonucleic Acid = Mediátorová ribonukleotidová kyselina
GalNAc	N-acetyl-galaktosamin
NRL	Národní referenční laboratoř
NAT	Nepřímý antiglobulinový test
NGS	Next Generation Sequencing = sekvenování nové generace
NC	No Call
NV	Not Valid

PCR-SSP	PCR-Sequence Specific Primering = PCR s použitím sekvenčně-specifických primerů
PE	Phycoerythrin = fykoerythrin
PCR	Polymerase Chain Reaction = polymerázová řetězová reakce
PAT	Přímý antiglobulinový test
RBC	Red Blood Cell = Erytrocyt
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism = polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RhAG	Rh asociovaný glykoprotein
SNP	Single Nucleotide Polymorphism = jednonukleotidový polymorfismus
ssDNA	single stranded DNA
STL	Společnosti pro transfuzní lékařství
TAMRA	Tetramethylrhodamine = 5-karboxytetramethylrhodamin
UT-B	Urea Transporter B = Transportér urey
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice

12 REFERENČNÍ SEZNAM

1. ŘEHÁČEK, V. a J. MASOPUST. *Transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4534-3.
2. PENKA, M. a E. TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3460-6.
3. DANIELS, Geoff. *Human blood groups*. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Science, 2002, 560 s. ISBN 06-320-5646-0.
4. OGASAWARA, K. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. *Blood*. [online]. The American Society of Hematology, 1996, 88(7): 2732-2737. [cit. 2015-09-15]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/88/7/2732.long?sso-checked=true>
5. ROUQUIER, S., J. B. LOWE, R. J. KELLY, A. L. FERTITTA, G. G. LENNON a D. GIORGI. Molecular Cloning of a Human Genomic Region Containing the H Blood Group (1,2)Fucosyltransferase Gene and Two H Locus-related DNA Restriction Fragments: ISOLATION OF A CANDIDATE FOR THE HUMAN SECRETOR BLOOD GROUP LOCUS. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1995, 270(9), 4632-4639 [cit. 2015-09-15]. DOI: 10.1074/jbc.270.9.4632. ISBN 10.1074/jbc.270.9.4632. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.270.9.4632>
6. YAMAMOTO, Fumi-ichiro, Henrik CLAUSEN, Thayer WHITE, John MARKEN a Sen-itiroh HAKOMORI. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*. [online]. 1990-5-17, 345(6272): 229-233. [cit. 2015-09-15]. DOI: 10.1038/345229a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/doi/10.1038/345229a0>
7. YIP, S.P. Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. *Blood*. [online]. The American Society of Hematology, 2000, 95(4): 1487-1492. [cit. 2015-09-15]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/95/4/1487.full.pdf>
8. WOLPIN, B. M., P. KRAFT, M. XU, et al. Variant ABO Blood Group Alleles, Secretor Status, and Risk of Pancreatic Cancer: Results from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. [online]. 2010, 19(12), 3140-49 [cit. 2015-09-15]. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0751. ISBN 10.1158/1055-9965.EPI-10-0751. Dostupné z: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-10-0751>
9. HEIKEN, AAGE. A GENETIC STUDY OF THE MNS_s BLOOD GROUP SYSTEM. *Hereditas*. [online]. 1965, 53(1): 187-211. [cit. 2015-09-20]. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1965.tb01990.x. ISBN 10.1111/j.1601-5223.1965.tb01990.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1601-5223.1965.tb01990.x>
10. BARTHOLDSON, S. Josefin, Cécile CROSNIER, Leyla Y. BUSTAMANTE, Julian C. RAYNER a Gavin J. WRIGHT. Identifying novel Plasmodium falciparum erythrocyte invasion receptors using systematic extracellular protein interaction screens. *Cellular Microbiology*. [online]. 2013, 15(8): 1304-1312. [cit. 2015-09-20]. DOI: 10.1111/cmi.12151. ISSN 14625814. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12151>

11. FURUKAWA, K. Molecular Basis for the p Phenotype. IDENTIFICATION OF DISTINCT AND MULTIPLE MUTATIONS IN THE alpha 1,4-GALACTOSYLTRANSFERASE GENE IN SWEDISH AND JAPANESE INDIVIDUALS. *Journal of Biological Chemistry*. [online]. 2000, 275(48): 37752-37756. [cit. 2015-09-20]. DOI: 10.1074/jbc.C000625200. ISSN 00219258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.C000625200>
12. THURESSON, B., J. S. WESTMAN a M. L. OLSSON. Identification of a novel A4GALT exon reveals the genetic basis of the P1/P2 histo-blood groups. *Blood*. [online]. 2011, 117(2): 678-687. [cit. 2015-09-20]. DOI: 10.1182/blood-2010-08-301333. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-08-301333>
13. SOOHEE, Lee. Proteolytic Processing of Big Endothelin-3 by the Kell Blood Group Protein. *Blood: the journal of hematology*. [online]. New York: Grune, 1999, 4(94). ISSN 0006-4971. [cit. 2015-09-20]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/94/4/1440?sso-checked=true>
14. AVENT, Neil. D. a Marion E. REID. The Rh blood group system: a review. *Blood Journal*. [online]. Washington DC: The American Society of Hematology, 2000, 95: 375-387. ISSN 1528-0020. [cit. 2015-09-29]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/95/2/375>
15. SHAZ, Beth, Christopher D HILLYER, Charles Samuel ABRAMS a Mikhail ROSHAL. *Transfusion medicine and hemostasis: clinical and laboratory aspects*. Second edition. Amsterdam: Elsevier Science, 2013, xxvii, 986 s. ISBN 01-239-7164-0.
16. DANIELS, Geoff a Imelda BROMILOW. *Essential guide to blood groups*. Oxford: Blackwell Pub., 2007, x, 100 p. ISBN 987-1-4051-5349-2.
17. REID, Marion E a Christine LOMAS-FRANCIS. *The blood group antigen factsbook*. 2nd ed. London: Academic, 2004, xiii, 561 p. ISBN: 0-12-586585-6.
18. MOURO, Isabelle. Molecular Basis of the RhCW (Rh8) and RhCX (Rh9) Blood Group Specificities. *Blood Journal*. [online]. The American Society of Hematology, 1995, 86(3): 1196-1201. [cit. 2015-09-29]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/15579319_Molecular_basis_of_the_RhCW_Rh8_and_RhCX_Rh9_blood_group_specificities
19. PÍSAČKA, M. Současné poznatky o Rh systému. *Trans. Hemat. Dnes*. 2000, 6(3): 79-87. ISSN 1212-9887.
20. SCHARBERG, E. A., E. RICHTER a P. BUGERT. Red cell antigen testing. *ISBT Science Series*. [online]. International Society of Blood Transfusion, 2015, 10(Suppl. 1): 5-11. DOI: 10.1111/voxs.12134. ISBN 10.1111/voxs.12134. [cit. 2015-09-30]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/voxs.12134>
21. KING, C. L., J. H. ADAMS, J. XIANLI, B. T. GRIMBERG, A. M. MCHENRY, L. J. GREENBERG, A. SIDDIQUI, R. E. HOWES, M. DA SILVA-NUNES, et al. Fya/Fyb antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to Plasmodium vivax malaria: fresh insights into pathogenesis and identification of targets for intervention. *PNAS*. [online]. 2011, 108(50): 20113-18. [cit. 2015-10-30]. DOI: 10.1073/pnas.1109621108. ISBN 10.1073/pnas.1109621108. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1109621108>

22. KUSTU, S. a W. INWOOD. Biological gas channels for NH₃ and CO₂: evidence that Rh (Rhesus) proteins are CO₂ channels. *Transfus Clin Biol*. [online]. 2006. 13(1-2):103-10. [cit. 2015-10-30]. DOI: 10.1016/j.tracli.2006.03.001. ISBN 10.1016/j.tracli.2006.03.001. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16563833>
23. CLAPÉRON, Audrey, Claude HATTAB, Vincent ARMAND, Suzanne TROTTIER, Olivier BERTRAND a Tanja OUIOMET. The Kell and XK proteins of the Kell blood group are not co-expressed in the central nervous system. *Brain research*. [online]. 2007. 1147(1):12-24. [cit. 2015-10-30]. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.01.106. ISBN 10.1016/j.brainres.2007.01.106. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/6428468_The_Kell_and_XK_proteins_of_the_Kell_blood_group_are_not_co-expressed_in_the_central_nervous_system
24. RUSSO, D. Expression of Kell blood group protein in nonerythroid tissues. *Blood Journal*. [online]. American Society of Hematology, 2000, 96(1): 340 - 346. [cit. 2015-10-30]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/96/1/340.long?sso-checked=true>
25. DANIELS, G. A combination of the effects of rare genotypes at the XK and KEL blood group loci results in absence of Kell system antigens from the red blood cells. *Blood*. [online]. 1996, 88(10): 4045-50. ISSN 10.45. [cit. 2015-10-30]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/88/10/4045.full.pdf?sso-checked=true>
26. CHAUDHURI, A., J. POLYAKOVA, V. ZBRZEZNA, K. WILLIAMS, S. GULATI a A. O. POGO. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the Plasmodium vivax malaria parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [online]. 1993, 90(22): 10793–10797. [cit. 2015-11-30]. DOI: 10.1073/pnas.90.22.10793. ISBN 10.1073/pnas.90.22.10793. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.90.22.10793>
27. STEWART, Gavin. The emerging physiological roles of the SLC14A family of urea transporters. *British Journal of Pharmacology*. [online]. 2011, 164(7): 1780–1792. [cit. 2015-11-30]. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01377.x. ISBN 10.1111/j.1476-5381.2011.01377.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2011.01377.x>
28. IRSHAID, Nidal M., Nicole I. EICHER, Hein HUSTINX, Joyce POOLE a Martin L. OLSSON. Novel alleles at the JK blood group locus explain the absence of the erythrocyte urea transporter in European families*. *British Journal of Haematology*. [online]. 2002, 116(2): 445–453. [cit. 2015-11-30]. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2002.03238.x. ISBN 10.1046/j.1365-2141.2002.03238.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2141.2002.03238.x>
29. WU, Fiona, Timothy J. SATCHWELL a Ashley M. TOYE. Anion exchanger 1 in red blood cells and kidney: Band 3's in a pod. *Biochemistry and cell biology*. [online]. 2011, 89(2), 106-114. [cit. 2015-11-30]. DOI: 10.1139/o10-146. ISBN 10.1139/O10-146. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21455263>

30. HUANG, Ch. a M.E. REID. Human Red Blood Cell Wright Antigens: A Genetic and Evolutionary Perspective on Glycophorin A-Band 3 Interaction. *Blood Journal*. [online]. 1996, 87(9), 3942-7. ISSN 0006-4971. [cit. 2015-11-30]. Dostupné také z: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/87/9/3942.full.pdf?sso-checked=true>
31. PEYRARD, T. Molecular tools for investigating immnohaematology problems. *ISBT Science Series*. [online]. 2015, 10(Suppl 1), 31-38. DOI: 10.1111/voxs.12165. [cit. 2016-02-06]. Dostupné také z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/voxs.12165/abstract>
32. KULKARNI, Shashikant a John D PFEIFER (eds.). *Clinical genomics*. Amsterdam: Elsevier, 2015, xvii, 470 s. ISBN 978-0-12-404748-8.
33. EDITED BY GEORGE P. PATRINOS, edited by George P. Wilhelm J. *Molecular diagnostics*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2010. ISBN 978-012-3745-378.
34. GOJOVÁ, L. a L. KOZÁK. Možnosti využití DNA čipů v molekulární diagnostice dědičných onemocnění. *Klinická biochemie a metabolismus*. [online]. 2006, 14(35), 89-95. ISSN 1210-7921. [cit. 2016-02-06]. Dostupné také z: http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0602_89.pdf
35. BIOARRAY SOLUTIONS. *Immucor PreciseType™, HEA: Molecular Beadchip test* Warren, 2014. Briefing Document for the Blood Products Advisory Committee. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/BloodProductsAdvisoryCommittee/UCM389146.pdf>
36. AVENT, Neil D. a Antonio MARTINEZ. The Bloodgen Project of the European Union, 2003–2009. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. [online]. 2009, 36(3), 162-167. DOI: 10.1159/000218192. [cit. 2016-02-06]. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2980524/>
37. SCHARF, R.E. *Progress and Challenges in Transfusion Medicine, Hemostasis, and Hemotherapy*. 1. Düsseldorf: Karger, 2008. ISBN 978-3-8055-8659-7.
38. AVENT, Neil D., Antonio MARTINEZ, Willy A. FLEGEL, et al. The BloodGen project: toward mass-scale comprehensive genotyping of blood donors in the European Union and beyond. *Transfusion*. [online]. 2007, 47(Supplement), 40-46. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01309.x. ISBN 10.1111/j.1537-2995.2007.01309.x. [cit. 2016-02-13]. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1537-2995.2007.01309.x>
39. FINNING, K. a R. BHANDARI. Evaluation of red blood cell and platelet antigen genotyping platforms (ID CORE XT / ID HPA XT) in routine clinical practice. *Blood Transfusion* [online]. 2015, 1-8 [cit. 2016-02-12]. ISSN 1723-2007. Dostupné z: <http://www.bloodtransfusion.it/articolosing.aspx?id=000760>
40. MOULDS, Joann M. Future of Molecular Testing for Red Blood Cell Antigens. *Clinics in laboratory medicine*. [online]. 2010, 30(2), 419-29. ISBN 10.1016/j.cll.2010.02.004. [cit. 2016-02-13]. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272271210000107>
41. KOUBKOVÁ, L, B. VOJTĚŠEK a R. VYZULA. Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi: Next Generation Sequencing – Application in Clinical Practice. *Klinická onkologie*. [online]. 2014, 27(Suppl 1), 61–68. [cit. 2016-02-13]. Dostupné také z: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/186/4484.pdf>

42. REIS-FILHO, Jorge S. Next-generation sequencing. *Breast Cancer Research* [online]. 2009, 11(Suppl 3), S12 [cit. 2016-02-13]. DOI: 10.1186/bcr2431. ISBN 10.1186/bcr2431. Dostupné z: <http://breast-cancer-research.com/supplements/11/S3/S12>
43. HASHMI, Ghazala, Tasmia SHARIFF, Michael SEUL, et al. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion* [online]. 2005, 45(5), 680-688 [cit. 2016-02-13]. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.04362.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1537-2995.2005.04362.x>
44. KÖNIG, S. *FluoGene: Genotyping by Fluorescence PCR*. Inno-train diagnostik GMBH. Praha. Prosinec 2015.
45. VELDHUISEN, B., C. E. VAN DER SCHOOT a M. DE HAAS. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sanguinis* [online]. 2009, 97, 198-206 [cit. 2016-02-14]. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2009.01209.x. ISBN 10.1111/j.1423-0410.2009.01209.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1423-0410.2009.01209.x>
46. SMALLRIGDE, G. *BioArray Molecular Immunohaematology*. [online]. Immucor. Praha. Listopad 2013. [cit. 2016-02-14]. Dostupné z: https://www.uvn.cz/attachments/3018_11_smallridge_BioArray%20Prague%20Nov%202103_3_CZ.pdf
47. KULKARNI, S. a J. PFEIFER. *Clinical genomics*. USA: Elsevier, 2015. ISBN 978-0-12-404748-8. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=lwF0AAQBAJ&pg=PA6&dq=sanger+sequencing&hl=cs&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=sanger%20sequencing&f=false
48. QIAGEN. *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*. Příbalová informace č. 1072897. 3. vydání. Revize: červen 2012. Dostupné z: https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/1379318/mod_resource/content/0/QIAamp_DNA_Mini_Blood.pdf
49. PROGENIKA BIOPHARMA, S. A. *BLOODchip Reference: Příbalová informace*. Španělsko, PG-K-0700-096, Revize: červen 2011.
50. PROGENIKA BIOPHARMA, S. A. *ID CORE XT: Příbalová informace*. Španělsko, 2014. CE 0123 IVD. CE EU 06 Text distributora: Příbalová informace: PI ID CORE XT EN CE EU 06, Progenika Biopharma, S.A., Revize: červenec 2014.
51. PÍSAČKA, Martin, Iuri MARINOV, Miroslava KRÁLOVÁ, Jana KRÁLOVÁ, Michaela KOŘÁNOVÁ, Miloš BOHONĚK, Chhavi SOOD a Gorka OCHOA-GARAY. FY*A silencing by the GATA-motif variant FY*A(-69C) in a Caucasian family. *Transfusion* [online]. 2015, 55(11), 2616-19 [cit. 2016-04-21]. DOI: 10.1111/trf.13221. ISBN 10.1111/trf.13221. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/trf.13221>
52. Doporučení Společnosti pro transfúzní lékařství ČLS JEP č. STL2012_09 ze dne 19. 04. 2012: *Imunohematologická Vyšetření dárců krve a krevních složek*. [online]. [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: http://www.transfuznispolecnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator=kategorie=DOPORUCENE_POSTUPY

13 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 - Porovnání nukleotidových a aminokyselinových sekvencí alel ABO identifikovaných pomocí PCR-SSP (Zdroj č. 4)	12
Obr. 2 - Model topologie proteinů RhAG, RhCE a RhD (Zdroj č. 14).....	17
Obr. 3 - Rh protein - lokalizace C ^w a C ^x asociovaných polymorfismů (Zdroj č. 18).....	21
Obr. 4 - Analyzátor FluoVista pro systém FluoGene (Zdroj č. 44)	33
Obr. 5 - vlevo: křemíková destička s rozptýlenými kuličkami; vpravo: výsledný skleněný čip pro vyšetření 8 vzorků s čárovým kódem v horní části (Zdroj č. 47)	34
Obr. 6 - Hybridizace značených DNA fragmentů na imobilizované oligonukleotidy (Zdroj č. 34)	35
Obr. 7- Sangerovo sekvenování, (A) Výsledky gelové elektroforézy DNA molekuly 5'-TATGATCAC-3'. Výsledky jsou čteny zprava doleva. (B) Elektroforeogram stejné molekuly, výsledky jsou čteny zleva doprava (Zdroj č. 47).....	38
Obr. 8 - Masterlist panelu ID Partial D Typing Set (BioRad).....	43
Obr. 9 - Masterlist panelu D-SCREEN (Diagast)	43
Obr. 10 - Intenzity jednotlivých exonů genu RHD (dárce č. 7)	46
Obr. 11 - Intenzity jednotlivých exonů genu RHD (dárce č. 108)	47
Obr. 12 - Intenzity jednotlivých exonů genu RHD (dárce č. 141)	47
Obr. 13 - Tabulka detekovaných polymorfismů a intenzity jednotlivých signálů (Pacient č. 45).....	51
Obr. 14 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHCE Cc a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient č. 39)	53
Obr. 15 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHCE Cc a intenzity jednotlivých signálů (Pacient č. 57)	53
Obr. 16 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHCE Cc a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient č. 60)	54
Obr. 17 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHCE Ee a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient č. 60)	54
Obr. 18 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHCE Ee a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient č. 56)	55
Obr. 19 - Souhrn celkových intenzit jednotlivých barevných signálů. (Pacient č. 56).....	55
Obr. 20 - Tabulka detekovaných polymorfismů KELL Kk a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient č. 56)	55
Obr. 21 - Tabulka detekovaných polymorfismů KIDD JKA/JKB a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient č. 28)	56
Obr. 22 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHCE Cc a intenzity jednotlivých signálů. (Pacient RhD č. 17)	60
Obr. 23 – Zastoupení jednotlivých skupin v souboru „RhD“	61
Obr. 24 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHD a intenzity jednotlivých signálů se zaměřením na polymorfismus BCV050. (Pacient RhD č. 5).....	62
Obr. 25 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHD a intenzity jednotlivých signálů se zaměřením na polymorfismus BCV062. (Pacient RhD č. 16)	63
Obr. 26 - Tabulka detekovaných polymorfismů RHD a intenzity jednotlivých signálů se zaměřením na polymorfismus BCV052. (Pacient RhD č. 1).....	64
Obr. 27 - Intenzity jednotlivých exonů genu RHD (Pacient RhD č. 9)	64
Obr. 28 - Tabulka pro polymorfismus BCV044 genu RHD. (Pacient RhD č. 14).....	65
Obr. 29 - Genotyp a predikovaný fenotyp analýzy genu RHD a rozpis hodnot jednotlivých exonů genu RHD (Pacient RhD č. 25).....	66
Obr. 30 - Tabulka pro polymorfismus BCV060 genu RHD (Pacient RhD č. 27).....	67
Obr. 31 - Tabulka pro polymorfismus BCV076 genu RHD (Pacient RhD č. 28).....	68
Obr. 32 - Rozpis hodnot jednotlivých exonů genu RHD (Pacient RhD č. 3)	68

14 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Sérologická charakteristika podskupin A ₁ (d.p. = dvojí populace buněk; „w“ = weak slabá aglutinace, „+“ = pozitivní; „-“ = negativní), Převzato: zdroj č. 3	10
Tabulka 2 - Komplexy Rh genů s korespondujícími antigeny a Wienerovým faktorovým systémem (převzato: zdroj č.2)	16
Tabulka 3 - Nejčastější typy slabého RhD: Nukleotidové změny, proteinové sekvence, poloha v exonu, asociovaný haplotyp RHCE (převzato: zdroj č. 3)	18
Tabulka 4 - Nejčastější typy variantního RhD: Nukleotidové změny, proteinové sekvence, poloha v exonu, asociovaný haplotyp RHCE (převzato: zdroj č. 3)	19
Tabulka 5 - Polymorfismy a AK substituce u základních alel RHCE genu. (převzato: zdroj č. 17)	20
Tabulka 6 - Populační zastoupení antigenů Jk ^a a Jk ^b (převzato: zdroj č. 1)	29
Tabulka 7 – Celkový souhrn počtu vyšetřených vzorků	41
Tabulka 8 - Celkový přehled výsledků shody mezi sérologií a microarray technikou (ID CORE a BLOODchip) u jednotlivých antigenů ve skupině „Dárci krve“. NT = Netestován, NC = No Call, NV = Not Valid.	45
Tabulka 9 – Soubor „Pacienti“: Počty výsledků pro jednotlivé antigeny, rozdělené do skupin dle microarray metody a dále do skupin: "Shoda", "DP" a "Rozdíl". DP = dvojí populace erytrocytů, NT = netestováno.	48
Tabulka 10 – Soubor „Pacienti“: Počty výsledků pro jednotlivé antigeny, rozdělené do skupin dle microarray metody a dále do skupin: "Shoda", "DP" a "Rozdíl". DP = dvojí populace erytrocytů; NT = netestováno.	49
Tabulka 11 – Soubor „Pacienti“: Procentuální zastoupení výsledků pro jednotlivé antigeny, rozdělené do skupin dle microarray metody a dále do skupin: "Shoda", "DP" a "Rozdíl". DP = dvojí populace erytrocytů; NT = netestováno.	49
Tabulka 12 – Soubor „RhD“: Celkový přehled- počet případů shody mezi sérologií a microarray technikou (ID CORE a BLOODchip) u jednotlivých antigenů ve skupině „RhD“. NC = No Call, NV = Not Valid.	59
Tabulka 13- Soubor „RhD“: Celkový přehled- procentuální vyjádření případů shody mezi sérologií a microarray technikou (ID CORE a BLOODchip) u jednotlivých antigenů ve skupině „RhD“. NC = No Call, NV = Not Valid.	59
Tabulka 14 - Počty případů shodných výsledků ve skupině "RhD"	61

15 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1a: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Dárci krve“	82
Příloha č. 1b: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Dárci krve“	83
Příloha č. 1c: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Dárci krve“	84
Příloha č. 1d: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Dárci krve“	85
Příloha č. 2a: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Pacienti“	86
Příloha č. 2b: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Pacienti“	87
Příloha č. 2c: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Pacienti“	88
Příloha č. 2d: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Pacienti“	89
Příloha č. 3a: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „RhD“	90
Příloha č. 3b: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „RhD“	90

PŘÍLOHY

Příloha č. 1a: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Dárci krve“

Metoda	AB0	C	c	Cw	D	D	E	e	M	N	S	s	Lua	Lub	K	k	Kpa	Kpb	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Pozn.
1 Serologie	0	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	
BLOODchip v2.0	.0101	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	Fyxhet
2 Serologie	0	+	+	-	-	Dw3	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.01v01v	+	+	-	-	Dw3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	
3 Serologie	0	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.0101v	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
4 Serologie	.0	-	+	-	w/v			+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
BLOODchip v4.1	.0101	-	+	-	D w2			+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
5 Serologie	0	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
6 Serologie	0	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	NC	NC	-	+	-	+	+	+	+	+	
7 Serologie	0	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	
BLOODchip v4.1	.0101	-	+	-	Pozn			-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	DAUtype5/DVtype1-het
8 Serologie	0	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v2.0.2		+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
10 Serologie	0	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v2.0.2		-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
11 Serologie	0	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	NC	NC	-	+	-	+	+	+	+	+	
14 Serologie	0	+	+	-	+			+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v4.1	.0101v	+	+	-	+			+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
16 Serologie	0	-	+	-	-			-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v4.1	.0101	-	+	-	NV			-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
18 Serologie	0	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	0	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
19 Serologie	0	+	+	-	+			-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	w	+	+	
CORE v1.4.1.		+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	Fyx	+	+	FY*B(265T) - Fy*X
20 Serologie	0	-	+	-	+			-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	NC	NC	-	+	-	+	+	+	+	+	
22 Serologie	0	+	-	+	+			-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.0101	+	-	+	+			-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
23 Serologie	0	+	+	+	+			-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	NC	NC	-	+	-	+	+	+	+	+	
24 Serologie	0	+	+	-	+			-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
27 Serologie	0	-	+	-	+			-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
30 Serologie	0	+	+	-	-	Dw1	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.0101v	+	+	-	-	Dw1	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
31 Serologie	0	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	

Priloha č. 1b: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Dárci krve“

Metoda	AB0	C	Cw	D	E	e	M	N	S	s	Lus	Lub	K	k	Kpa	Kpb	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Pozn.
33 Serologie	0-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	
BLOODchip v2.0	.01v01v	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	
35 Serologie	0-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v4.1	.0101v	-	-	NV	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
40 Serologie	0-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v4.1	.0102	-	-	NV	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
41 Serologie	0-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.01v01v	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
43 Serologie	0+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
44 Serologie	0-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
47 Serologie	0+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
48 Serologie	0+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
49 Serologie	0+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
51 Serologie	0-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
52 Serologie	0-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
53 Serologie	.0101v	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v4.1	.0101v	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
55 Serologie	0-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
57 Serologie	0-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.0101v	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
58 Serologie	0-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
59 Serologie	0+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.01v01v	-	-	NV	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
60 Serologie	0+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
62 Serologie	0-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.0101v	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
65 Serologie	0+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.0101v	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
66 Serologie	0+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v4.1	.01v01v	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
67 Serologie	0+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	Fy*B[265T]-Fy*X

Priloha č. 1c: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Dárci krve“

Metoda	AB0	C	c	Cw	D	D	E	e	M	N	S	s	Lua	Lub	K	k	Kpa	Kpb	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Pozn.
68 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	
70 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	
BLOODchip v4.1	.0101v	-	+	-	NV	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	
73 Serologie	0	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
74 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
75 Serologie	0	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.0101v	NC	NC	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
80 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
82 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
89 Serologie	0	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.0101	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
92 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.0101	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
95 Serologie	0	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.01v01v	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
105 Serologie	0	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
106 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.0101	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
107 Serologie	0	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.0101v	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
108 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
BLOODchip v2.0	.0102	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
109 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
111 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	
BLOODchip v4.1	.01v02	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
115 Serologie	0	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BLOODchip v4.1	.0101	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
119 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BLOODchip v4.1	.0101	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
120 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
121 Serologie	0	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
CORE v1.4.1.		+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	

Příloha č. 1d: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Dárci krve“

Metoda	AB0	C	c	Cw	D	D	E	e	M	N	S	s	Lua	Lub	K	k	Kpa	Kpb	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Pozn.
122 Serologie	0	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
CORE v2.0.2		+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
126 Serologie	0	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
BLOODchip v2.0	.0101	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
127 Serologie	0	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
CORE v1.4.1.		+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
130 Serologie	0	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
BLOODchip v2.0	.0101v	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
132 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
BLOODchip v2.0	.0101v	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
134 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
135 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
139 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
140 Serologie	0	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
CORE v1.4.1.		+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
141 Serologie	0	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
BLOODchip v4.1	.01v01v	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
143 Serologie	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
BLOODchip v2.0	.0101	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
145 Serologie	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
BLOODchip v4.1	.01v01v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
147 Serologie	0	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
CORE v2.0.2		-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
148 Serologie	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
BLOODchip v2.0	.01v01v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
149 Serologie	0	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
CORE v1.4.1.		-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
150 Serologie	0	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
CORE v1.4.1.		+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-

Příloha č. 2a: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Pacienti“

JMENO	Metoda	KS	C	D	E	e	M	N	S	s	Lua	Lub	K	k	Kpa	Kpb	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Pozn.
Pacient č. 1	serol	+	+	-	+	+							-	+							
	CORE	+	+	-	+	+							-	+							
Pacient č. 2	serol	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+							si+	+	+	
	CORE	+	-	-	-	+	+	+	+	-	nc							x	+	+	
Pacient č. 3	serol	mf	+	-	+	mf	+	mf	+	+							mf	+	+	+	
	CORE	+	+	-	+	-	-	-	-	+											
Pacient č. 4	serol	+	+	-	-	+	+	+	+	+											
	CORE	+	+	-	-	+	+	+	+	+										mf	mf
Pacient č. 5	serol	mf	+	-	+	+	+	+	+	+											
	CORE	+	+	-	+	+	+	+	+	+											
Pacient č. 6	serol	+	-	-	-	+	mf	mf	+	+							mf	mf	+	+	
	CORE	+	-	-	-	+	+	+	+	+											
Pacient č. 7	serol	mf	+	mf	-	+															
	CORE	+	+	-	+	+															
Pacient č. 8	serol	+	+	+	-	mf	mf	mf	mf	mf							mf	mf	+	-	
	CORE	+	+	+	-	-	-	-	-	-											
Pacient č. 9	serol	-	+	-	-	+	+	+	+	+											
	CORE	-	+	-	-	+	+	+	+	+											
Pacient č. 10	serol	+	+	-	+	mf	mf	mf	mf	+							mf	+	mf	mf	
	CORE	+	+	-	+	+	+	+	+	+											
Pacient č. 11	serol	mf	+	-	-	+															
	CORE	+	+	-	-	+														mf	
Pacient č. 12	serol	-	+	-	+	+	+	+	+	+											
	CORE	-	+	-	+	+	+	+	+	+											
Pacient č. 13	serol	+	-	-	mf	+								mf	+						
	CORE	+	-	-	+	mf	mf														
Pacient č. 14	serol	mf	+	-	mf	mf															
	CORE	-	+	-	+	+															
Pacient č. 15	serol	+	+	-	-	+	+	+	+	+											
	CORE	+	+	-	-	+	+	+	+	+											
Pacient č. 16	serol	+	+	+	+	+															
	CORE	+	+	+	+	+															
Pacient č. 17	serol	-	+	-	-	mf	mf	-	+	+								mf	mf	+	+
	CORE	-	+	-	-	+	+	+	+	+	nc										
Pacient č. 18	serol	+	+	-	mf	+	+	mf	+	+											
	CORE	+	+	-	-	+	+	+	+	+											
Pacient č. 19	serol	+	+	-	-	+	+	+	+	+											
	CORE	+	+	-	-	+	+	+	+	+											
Pacient č. 20	serol	-	+	-	+	+	+	+	+	+											
	CORE	-	+	-	+	+	+	+	+	+											
Pacient č. 21	serol	+	+	-	si+	+															
	CORE	+	+	-	-	+															

Příloha č. 2b: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Pacienti“

JMENO	Metoda	KS	C	Cw	D	E	e	M	N	S	s	Lua	Lub	K	k	Kpa	Kpb	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Pozn.	*NV = not valid
Pacient č. 22	serol	A	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+		
	BC	A1A2	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	A1[C467T]A2	
Pacient č. 23	serol	O x A	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-		
	BC	NG	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-		
Pacient č. 24	serol	A	-	+	-	-	+	mf	+	mf	+	mf	+	+	+	+	+	mf	+	+	mf		
	BC	A101v	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+		
Pacient č. 25	serol	O	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-		
	BC	O101v	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-		
Pacient č. 26	serol	A	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+		
	BC	A1A2	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	A1[C467T]A2	
Pacient č. 27	serol	A2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	mf	mf	+	+		
	BC	A201	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	silný PAT	
Pacient č. 28	serol	A1	mf	+	-	+	mf	mf	-	-	-	mf	mf	+	+	+	+	+	+	+	+		
	BC	A1A1	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-		
Pacient č. 29	serol	O	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-		
	BC	O101v	-	+	-	-	Partial	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	VS+(733G), F _Y GATA hom. genotyp cc => fenotyp Cc	
Pacient č. 30	serol	B	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+		
	BC	B01	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	VS+ RHCE*733G)-het	
Pacient č. 31	serol	B	mf	+	-	+	mf	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-		
	BC	B01	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	serol. V ZR slabé reakce	
Pacient č. 32	serol	O	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-		
	BC	O1+02	-	+	-	-	Dw1	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-		
Pacient č. 33	serol	O	+	+	-	-	Dw1	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-		
	BC	O101v	+	+	-	-	Dw1	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+/	+/	-	-	F _Y GATAhet. Predicted Phenotyp F _Y a-b-/F _Y b-b+ B bez anti-A v ZR	
Pacient č. 34	serol	B x AB	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+		
	BC	A1B	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	PCR-SPF. AB, momentálně na sekvenci v Lundu před TDK	
Pacient č. 35	serol	A	+	mf	-	+	mf	+	+	mf	+	+	+	+	+	+	+	mf	mf	+	+		
	BC	A202	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+		
Pacient č. 36	serol	B x AB	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+		
	BC	A1B	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	př. jako B. zř. špatné reakce: AB. Slabě exprese A antigenu (u nás jako A2B) + s. neprav. anti-A1	
Pacient č. 37	serol	A	+	+	-	+	mf	+	mf	mf	+	+	+	+	+	+	+	+	mf	+	mf		
	BC	A101	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+		
Pacient č. 38	serol	O	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+		
	BC	O101v	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	serol. slabě ag. slabě aglutininy, jen stopy s fic. ery	
Pacient č. 39	serol	B	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-		
	BC	BB	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	F _Y GATAhom. VS+	
Pacient č. 40	serol	O	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+		
	BC	O	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+		
Pacient č. 41	serol	O	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+		
	BC	O101	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+		

Příloha č. 2c: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Pacienti“

JMENO	Metoda	KS	C	D	E	M	N	S	s	Lua	Lub	K	k	Kpa	Kpb	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Pozn.	*NV = not valid	
Pacient č. 42	serol BC																					
Pacient č. 43	serol BC	B	-	-	+					+	-	-	+									
Pacient č. 44	serol BC	B01v	+	+	+					+	-	-	+							FyGATA/Fyx		
Pacient č. 45	serol BC	.0101v	+	+	+					mf	-	-	+									
Pacient č. 46	serol BC	.0 x B B01	+	+	+															zř. bez anti-B, PAT poz Sekvence: ABO*B.01/O.01		
Pacient č. 47	serol BC	.0101	-	+	+					-	+	-	-									
Pacient č. 48	serol BC	A1 .A101	-	+	+					+	-	-	+									
Pacient č. 49	serol BC	B B01	+	+	+					-	+	+	+									
Pacient č. 50	serol BC	A+ A1A1 A5+	mf	+	+					+	-	-	+							PAT poz. cti. Poz u 56, F6, F8 Fyhet		
Pacient č. 51	serol BC	AB																		A(C467T)/B		
Pacient č. 52	serol BC	A+ A101																				
Pacient č. 53	serol BC	A01(C467T)																		bez aglutinínů A(C467T)/O		
Pacient č. 54	serol BC	.0101v 3abA .A101	-	+	+					mf	-	-	+							Fyhet A.90% neg., AB 90% neg., poz. Anti-B, -H -> přední řada, jako 0, zř. jako A		
Pacient č. 55	serol BC		-	+	+															Fyhet Anti-M RHCE*712G/het, V5-		

Příloha č. 2d: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „Pacienti“

JMÉNO	Metoda	KS	C	Cw	D	E	e	M	N	S	s	Lua	Lub	K	k	Kpa	Kpb	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Pozn.	*WV = not valid
Pacient č. 56	serol	+	+	-	+	-	+							sl+	+	+	+						
	BC	+	+	-	NC	+								NC	+	+	+						
	CORE	+	+	+	+	+								+	+	+	+						
Pacient č. 57	serol	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-		
	BC	+	+	-	D varič	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-		
	CORE	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+		
Pacient č. 58	serol	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-		
	BC	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	w	+	+	-		
	CORE	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+		
Pacient č. 59	serol	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	mf	mf	+	-		
	BC	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
	CORE	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
Pacient č. 60	serol	-/+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+		
	BC	NC	NC	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+		
	CORE	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+		
Pacient č. 61	serol	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+		
	BC	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+		
	CORE	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+		
Pacient č. 62	serol	+/-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+		
	BC	+	+	-	+/-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+		
	BC - dárce	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+		

Příloha č. 3a: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „RhD“

Jméno	ABO	D (VI poz)	D (VI neg)	C	c	E	e	Cw	K	D partial BioRad	D-Screen Diagast	Sekvenace/závěr
Rhd č. 1	AB	++	+++	-	+	-	+	-	-	susp. D VII	susp. D VII	Partial D - DYU (RHD*DYU), S700T (P234Trp)
	A1B	RHD+ (het BCV052)		-	+	-	+	-	-			
Rhd č. 2		+++	++++	-	+	-	+	-	-	susp. DHAR	susp. DHAR	DHAR
		Partial D (ROHAR)		-	+	-	+	-	-			
Rhd č. 3	.0	++	++	-	+	+	+	-	-	susp. D weak		
	.0,0	NC		+	+	+	+	-	-			PCR-SSP: D weak typ 1
Rhd č. 4	A	+/-	++	-	+	+	+	-	-	susp. DFR	susp. D VII	
	A101	Partial D (DCS)		-	+	+	+	-	-			DCS
Rhd č. 5	A	+++	++	-	+	+	+	-	+	susp. DFR	nespecif.	
	A1A1	Partial D (DCS-1)		-	+	+	+	-	+			Mutace v oblasti exonu 5 RHD genu
Rhd č. 6	.0	+++	++++	-	+	-	+	-	-	vše pozitivní na +++	vše pozitivní na +++	
	.0101v	D weak typ 1		-	+	-	+	-	-			
Rhd č. 7	B	-	-	+	+	-	+	-	-	nespecif	nespecif.	
	B01	D weak typ 1		+	+	-	+	-	-			Sekvenace weak typ 1.1
Rhd č. 8	A	++++		+	+	-	+	-	-	vše pozitivní		
	A1A1	RHD+		+	+	-	+	-	-			BC i PCR-SSP: normální RHD
Rhd č. 9	.0	+++		+	+	-	+	-	-	susp. D weak		
	.0101	RHD +		+	+	-	+	-	-	susp. Změny v exonech 5 a 8		Sekvenace: RHD*IVS8+4C
Rhd č. 10	.0			+	+	-	+	-	-	nespecif	nespecif	
	.0101	+		+	+	-	+	-	-			normální RhD
Rhd č. 11	B	+++		+	+	-	+	-	-	susp. D V	nespecif.	
	B01	RHD +		+	+	-	+	-	-			
Rhd č. 12	AB	+/-	+	+	-	+	+	-	-	nespecif	nespecif. (IgG poz, IgM neg)	
	A1B	D weak typ 1		+	-	-	+	-	-			D weak typ 1 dle PCR-SSP
Rhd č. 13		++	+	+	+	-	+	-	-	susp. D weak		
		D weak typ 1		+	+	-	+	-	-			D weak typ 1
Rhd č. 14	.0	+++		-	+	-	+	-	-	susp. D weak		PCR-SSP: D weak typ 14
	.0101v	NC		-	+	-	+	-	-	VS+, RHCE*(733G)het		Sekven: D weak typ 4.0
Rhd č. 15	.0	++	++	+	+	-	+	-	-	susp. D weak		
	.0101v	D weak typ 1		+	+	-	+	-	-			D weak typ 1

Příloha č. 3b: Výsledky fenotypu a genotypu ve skupině „RhD“

Jméno	ABO	D (VI poz)	D (VI neg)	C	c	E	e	Cw	K	D partial BioRad	D-Screen Diagast	Sekvenace/závěr
Rhd č. 16	A	-	-	+	+	-	+	-	-	nespecif.	Nespecif.	D varianta s přestavbou exonu 5
	A101v	weakDtype11		+	+	-	+	-	-			Weak D (cDe) nebo Del (Cde)
Rhd č. 17		+++	++	-	+	-	+	-	-	susp. Weak	Nespecif.	
		D weak type 4.0/4.3		NC	NC	-	+	-	-			D weak type 4.0/4.3
Rhd č. 18	.0	RHD w/v	+++	+	+	-	+	-	-	susp. D weak		
	.0101v	wead D type 1		+	+	-	+	-	-			dle PCR-SSP i BC: D weak typ 1
Rhd č. 19		+++	+	+	+	-	+	-	-	susp. D VII	susp. D VII	
		Partial D - D VII		+	+	-	+	-	-			D VII
Rhd č. 20	AB	+++	+++	+	+	-	+	-	-	nespecif.: 6 neg	Nespecif.	
	A1B	RhD +		+	+	-	+	-	-			Sekvenace: genotyp RHD*DLO
Rhd č. 21	.0	++++	++++	+	+	-	+	-	-	susp. D var. VII	susp. D var. VII	
	.0101	Partial D (DVII)		+	+	-	+	-	-			Sekvenace: D VII type 1
Rhd č. 22		+++		+	-	-	+	-	-	vše pozitivní		Zaměna
		Partial D (DVII)		+	-	-	+	-	-			
Rhd č. 23		+++		+	-	-	+	-	-	susp. D var. VII		
Rhd č. 24	B	-	-	-	+	+	+	-	-			
	B01	RHD -		-	+	+	+	-	-			Rhd negativní
Rhd č. 25	.0	+++	+++	+	+	+	+	-	-	susp.weak		
	.0101v	RHD (1-9)-CE(10) -> Del		+	+	+	+	-	-			Sekvenace: D weak typ 20
Rhd č. 26	A	+++		-	+	+	+	-	-	nespecif.	nespecif. IgM negat., IgG klon 4 negat.	
	A101	RHD+		-	+	+	+	-	-	RHD +		D weak typ 25, malá změna epitopů
Rhd č. 27	A	++	+++	-	+	+	+	-	-	susp. Weak	nespecif	
	A101v	Partial D - DHMi		-	+	+	+	-	-			dle BC: DHMi
Rhd č. 28	.0	+++	+++	+	-	-	+	-	-	nespecif	nespecif	
	.0101	Partial D - DNB		+	-	-	+	-	-			Archiv sér anti-DNB: neg v NAT