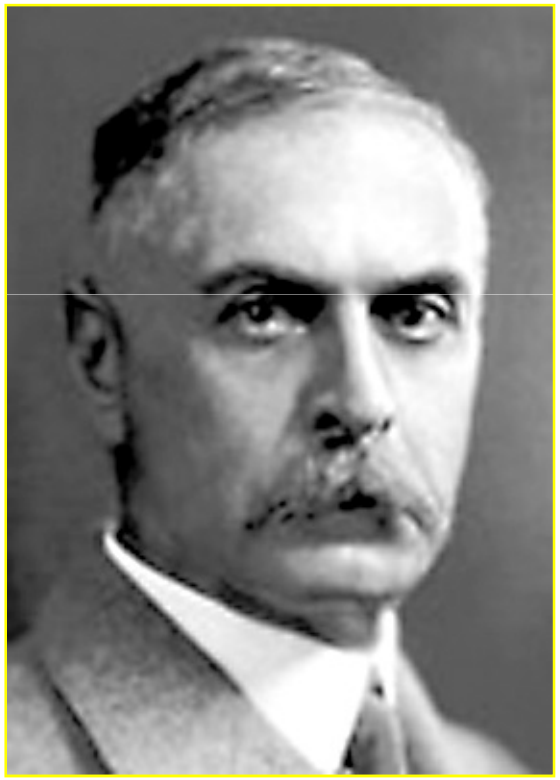
ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΒΟ

ΣΦΥΡΙΔΑΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΚΕΝΤΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ ΒΙΓΝΗ

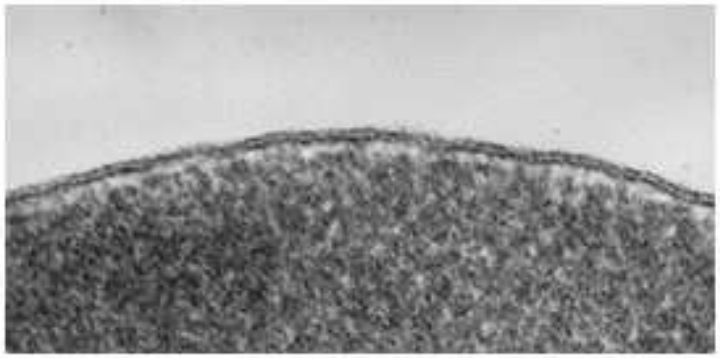
Karl Landsteiner (1868-1943)



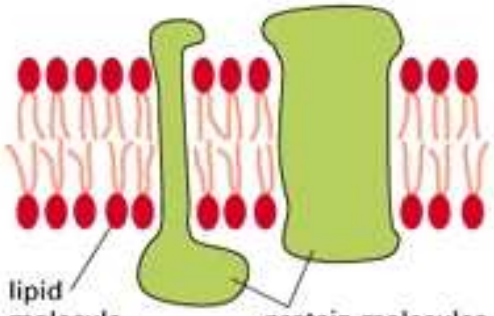
- Ανακάλυψη ομάδων αίματος ABO,1900
- Nobel Prize, 1930

- Το 1924 ο Bernstein διατύπωσε το μοντέλο της γονιδιακής θέσης με τρία αλληλόμορφα γονίδια
- 1950-1960 οι Watkins & Morgan καθόρισαν τις ABO(H) αντιγονικές δομές
- 1990 ο Yamamoto et al κλωνοποίησαν τα γονίδια των A και B τρανσφερασών

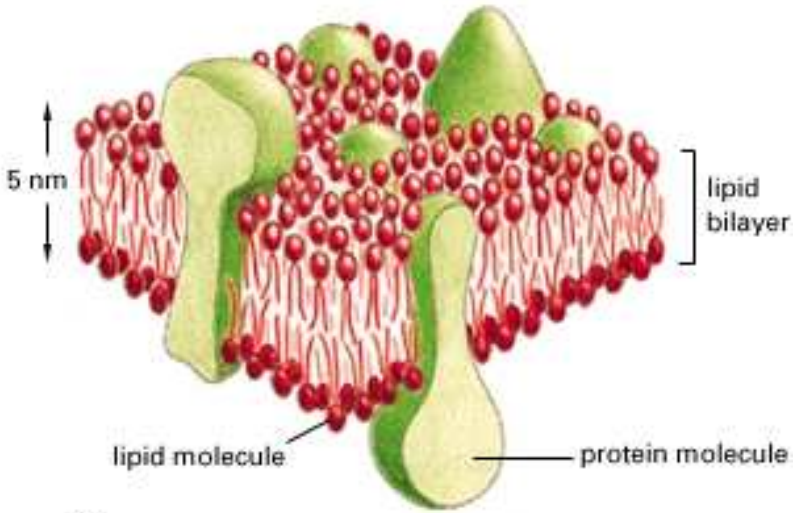
Red Blood Cell Membrane



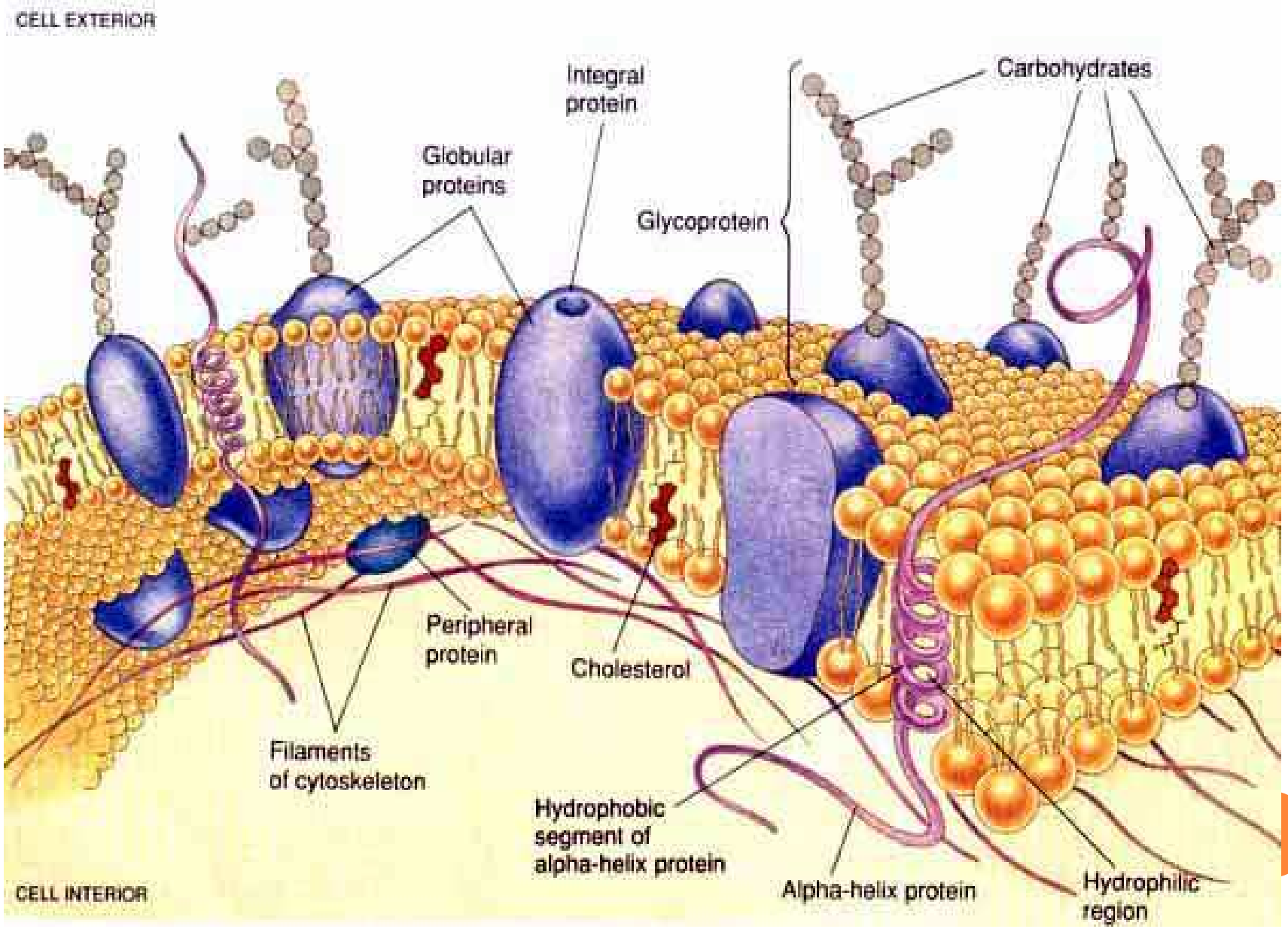
(A)



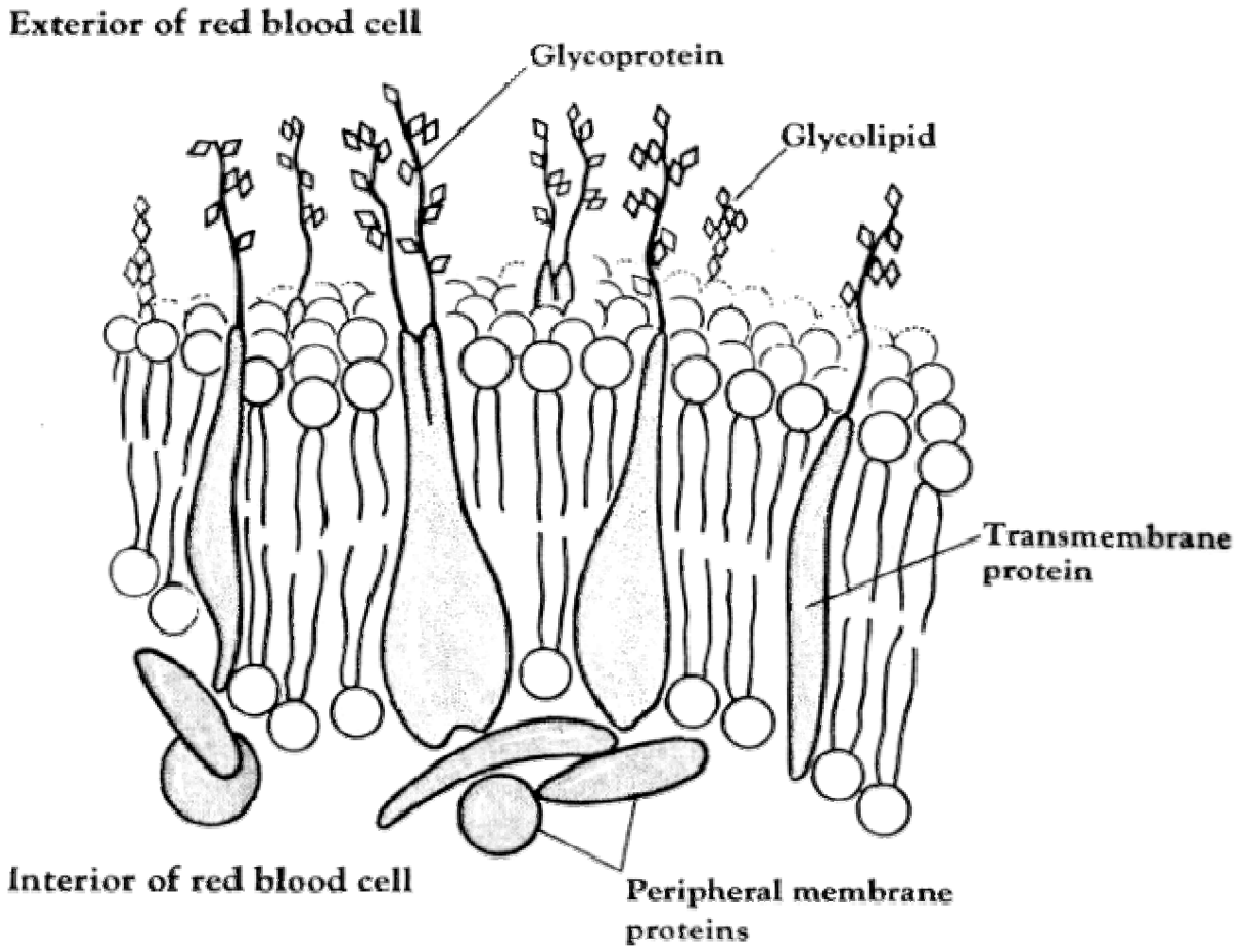
(B)



(C)


CELL EXTERIOR
Integral protein
Carbohydrates
Globular proteins
Glycoprotein
Peripheral protein
Cholesterol
Filaments of cytoskeleton
Hydrophobic segment of alpha-helix protein
Alpha-helix protein
Hydrophilic region
CELL INTERIOR

External surface of RBC membrane is coated with a diverse array of glycoproteins, complex carbohydrates, and lipoproteins, imparting antigenic structure to the membrane.



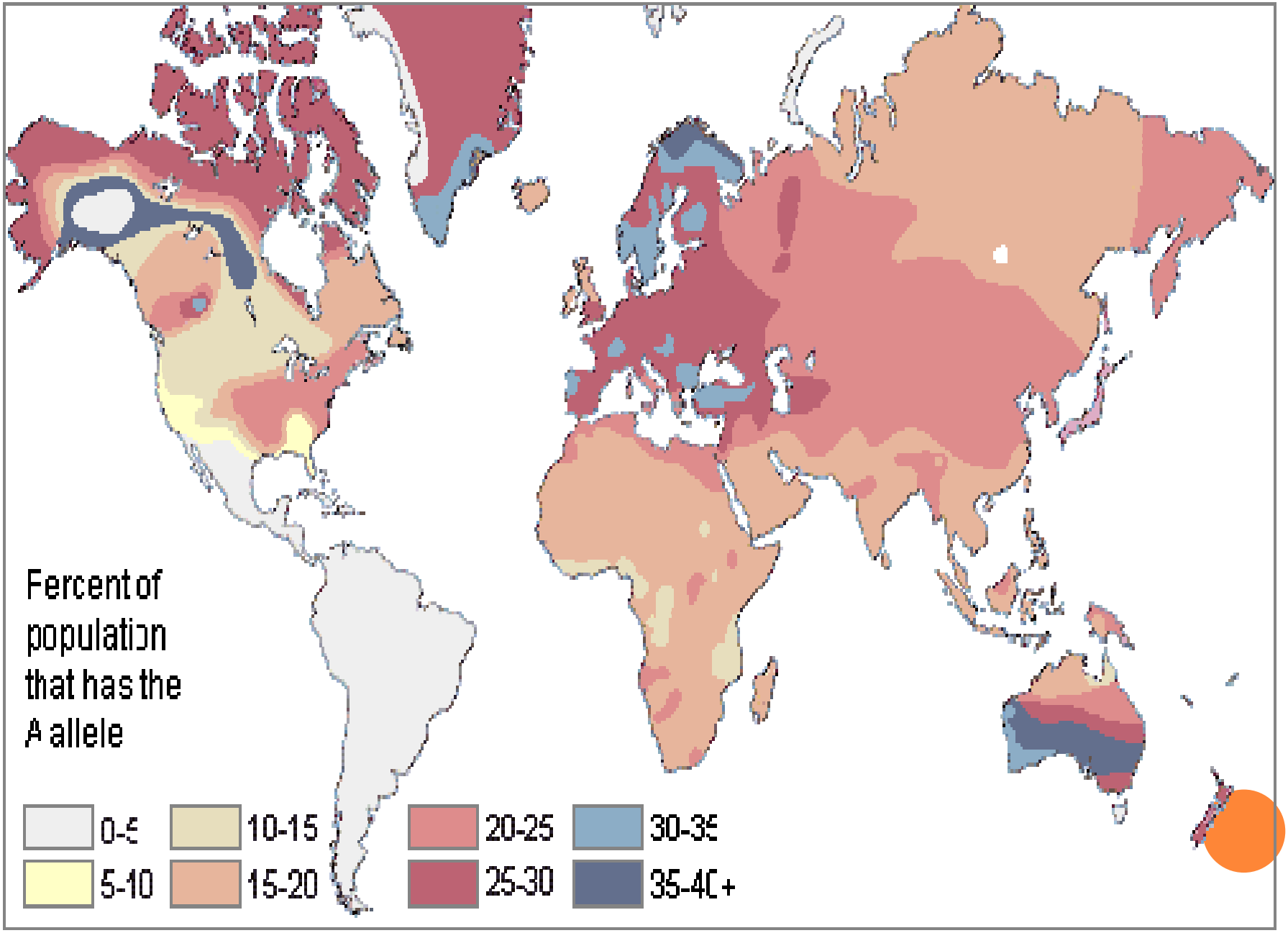
The ABO Blood System

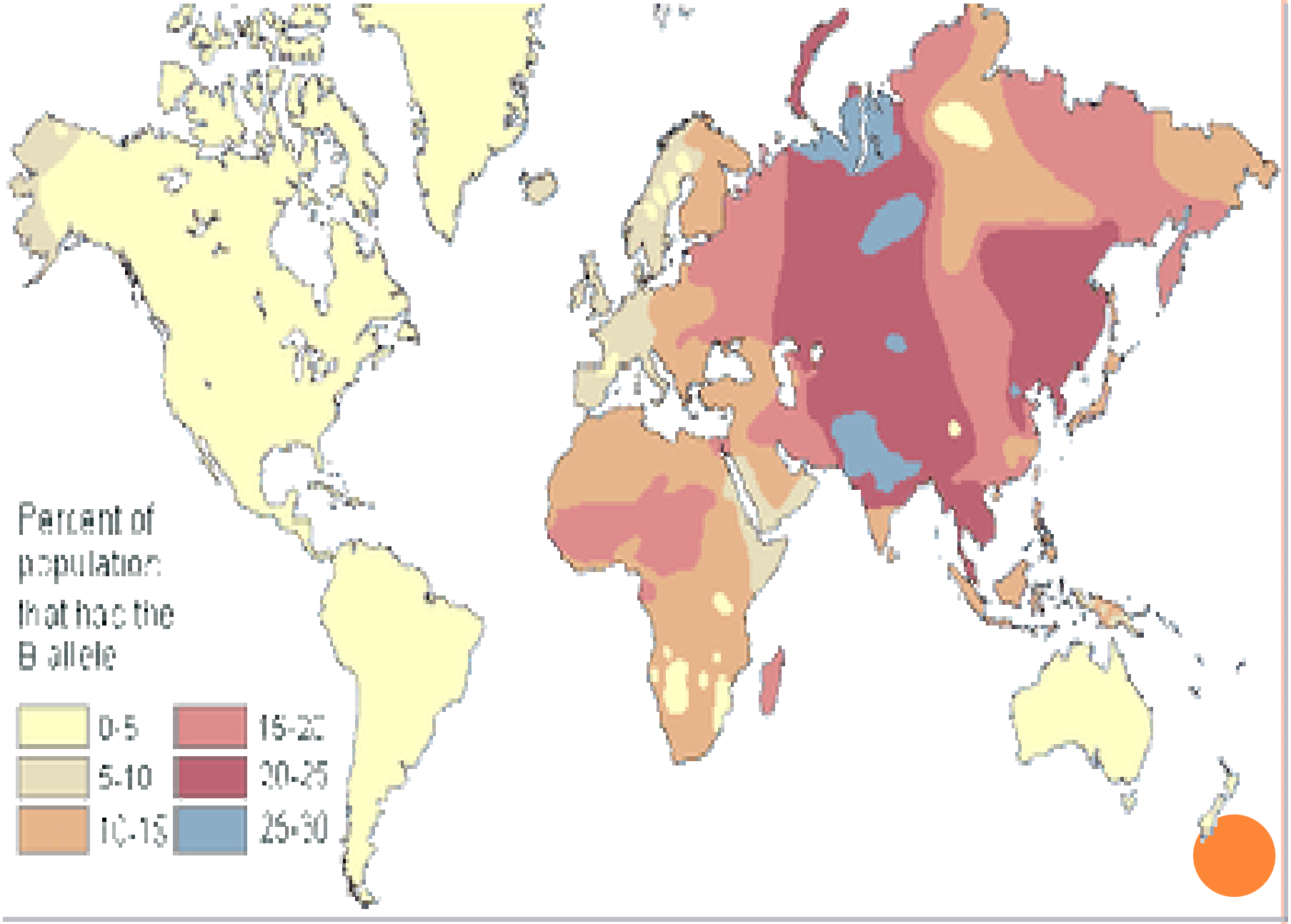
Blood Type (genotype)	Type A (AA, AO)	Type B (BB, BO)	Type AB (AB)	Type O (OO)
Red Blood Cell Surface Proteins (phenotype)	A agglutinogens only	B agglutinogens only	A and B agglutinogens	No agglutinogens
Plasma Antibodies (phenotype)	b agglutinin only	a agglutinin only	NONE. No agglutinin	a and b agglutinin

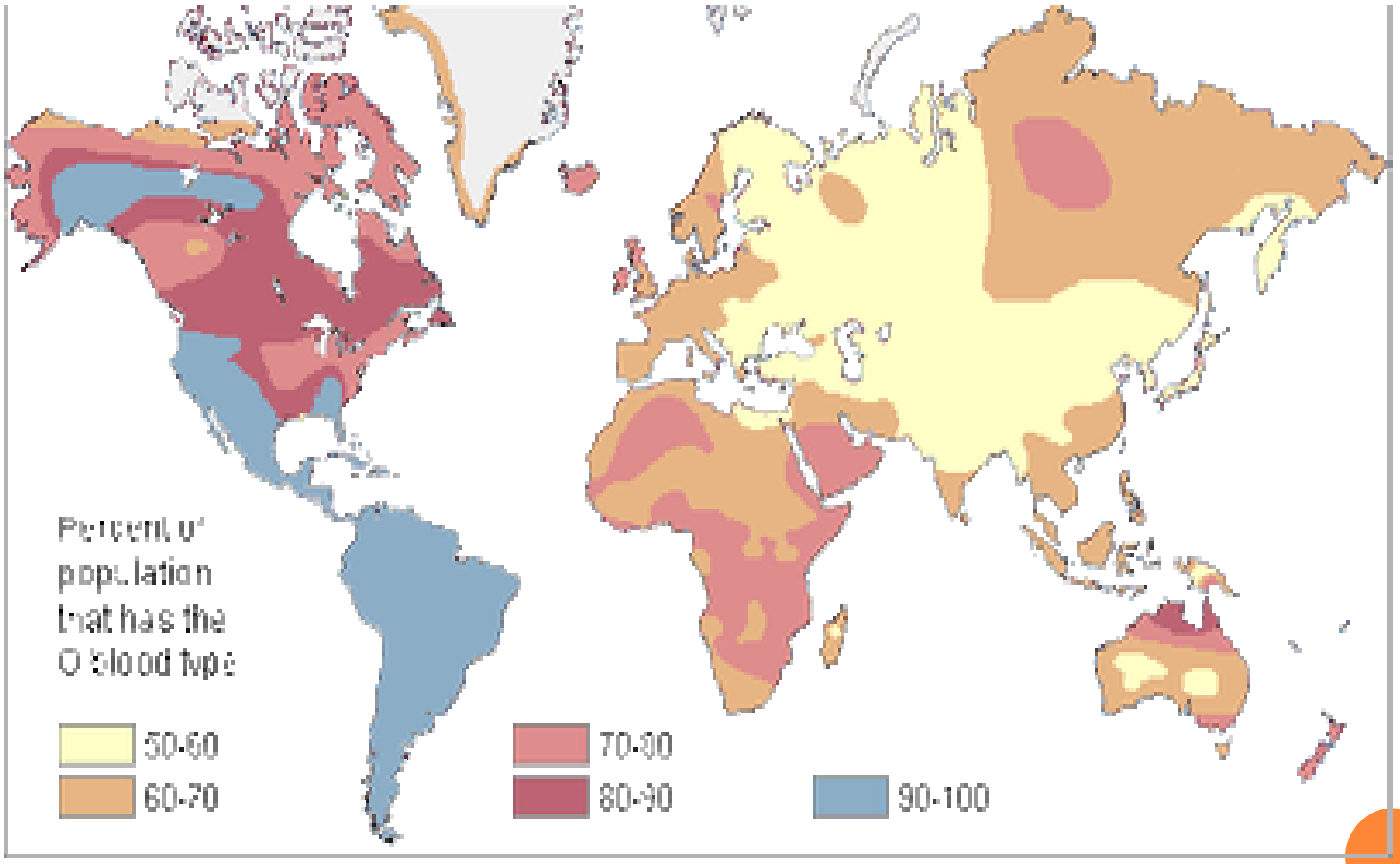
ΚΑΝΟΝΑΣ LANDSTEINER

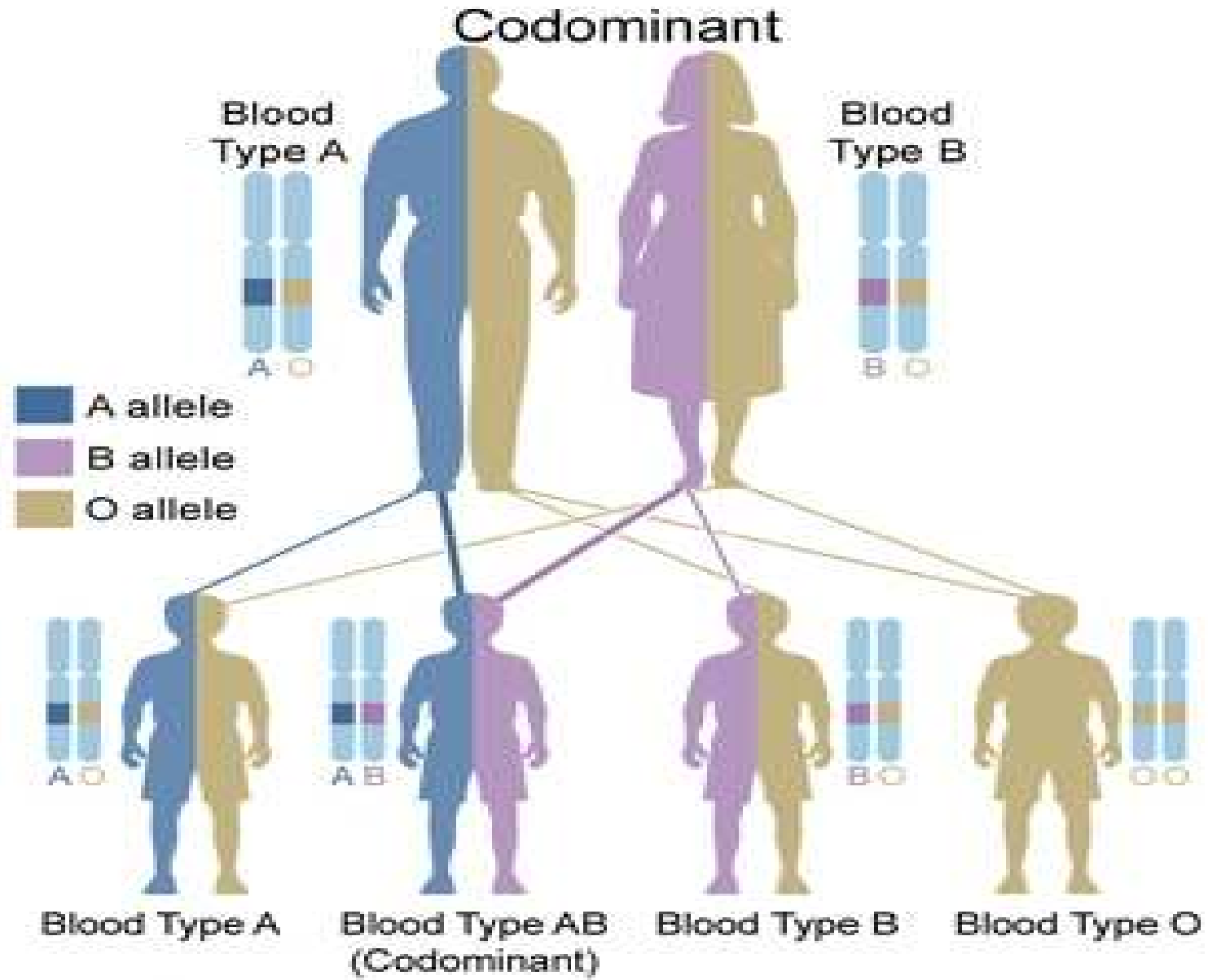
Α ΚΑΙ Β ΑΝΤΙΓΟΝΑ

- Τα ΑΒΟ ερυθροκυτταρικά αντιγόνα κωδικοποιούνται απο ένα επίτοπο τον ΑΒΟ με τρείς μορφές αλληλίων Α,Β και Ο.
- Κάθε Α και Β αλλήλιο κωδικοποιεί την παραγωγή μιας γλυκοσυλτρανσφεράσης που είναι υπεύθυνη για την τελική παραγωγή των Α και Β αντιγόνων αντίστοιχα.
- Ανιχνεύονται στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων,αιμοπεταλίων,ενδοθηλιακών κυττάρων,διαφόρων ιστών και υγρών του σώματος ενώ απουσιάζουν απο τα λευκοκύτταρα.


Fercent of
populatiɔn
that has the
A allele
0-5
5-10
10-15
15-20
20-25
25-30
30-35
35-40+


Percent of
population
that has the
B allele
0-5
5-10
10-15
15-20
20-25
25-30


Percent of
population
that has the
O blood type
50-60
60-70
70-80
80-90
90-100


Codominant
Blood Type A
Blood Type B
A O
B O
A allele
B allele
O allele
A O
A B
B O
O O
Blood Type A
Blood Type AB (Codominant)
Blood Type B
Blood Type O
U.S. National Library of Medicine

Α ΚΑΙ Β ΑΝΤΙΓΟΝΑ

- Δεν είναι πλήρως αναπτυγμένα κατά την γέννηση,υπάρχουν λίγες αντιγονικές θέσεις στην κυτταρική επιφάνεια
- Τα ερυθρά του νεογνού φέρουν το 25-50% των αντιγονικών θέσεων των ενηλίκων
- Ανιχνεύονται στην 5η περίπου εβδομάδα κύησης

- Αναπτύσσονται πλήρως στην ηλικία των 2-4 ετών

- Δεν αποτελούν άμεσα προιόντα γόνων
- Τα γονίδια κωδικοποιούν ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ που μεταφέρουν μόρια μονοσακχαριτών σε μια πρόδρομη ουσία στα ερυθροκύτταρα.

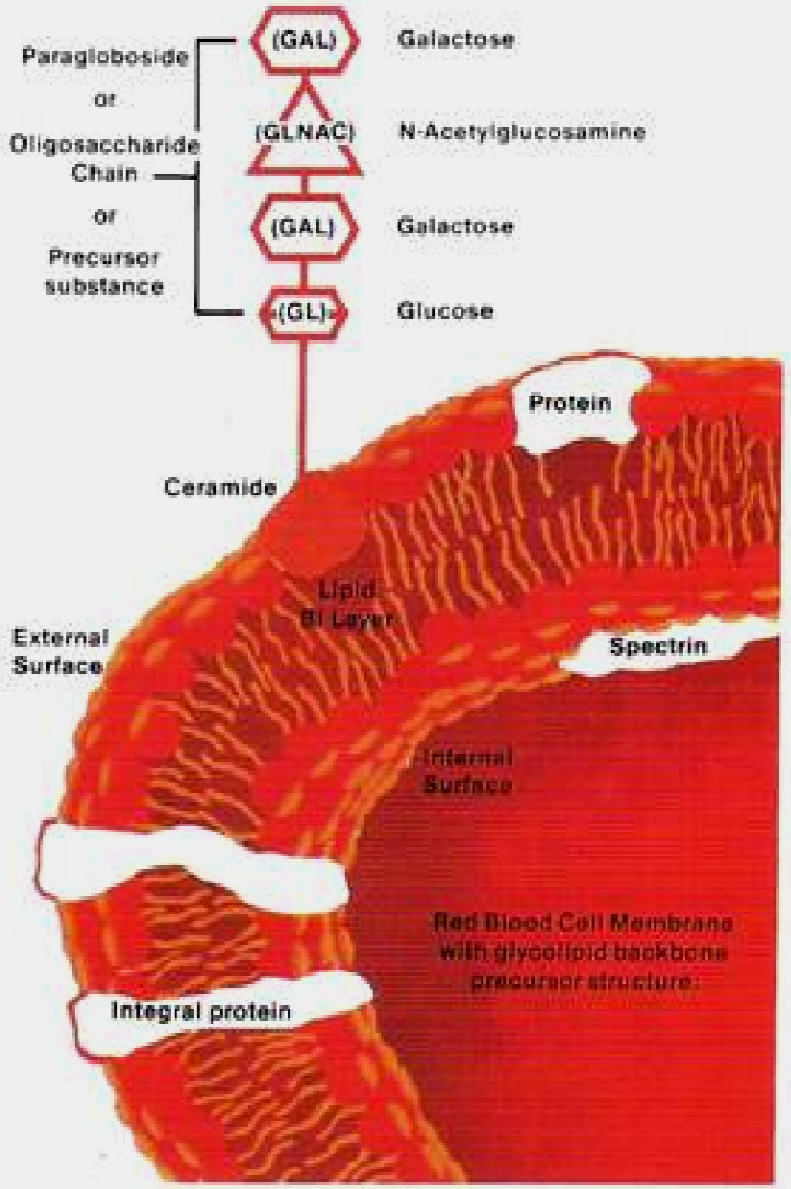


Plate 3. Red blood cell precursor structure (which represents a paragloboside).

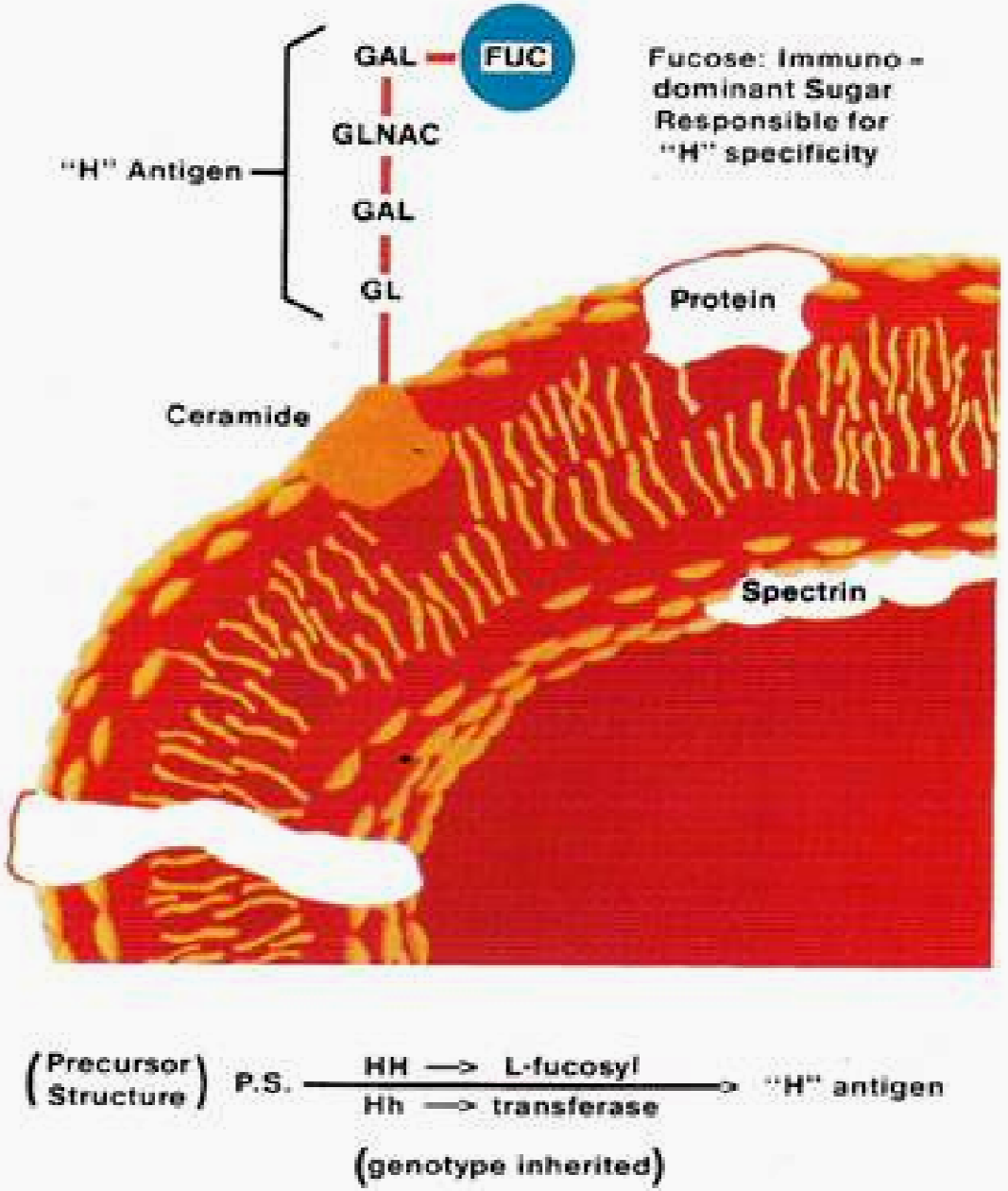


Plate 4. Formation of the H antigen.

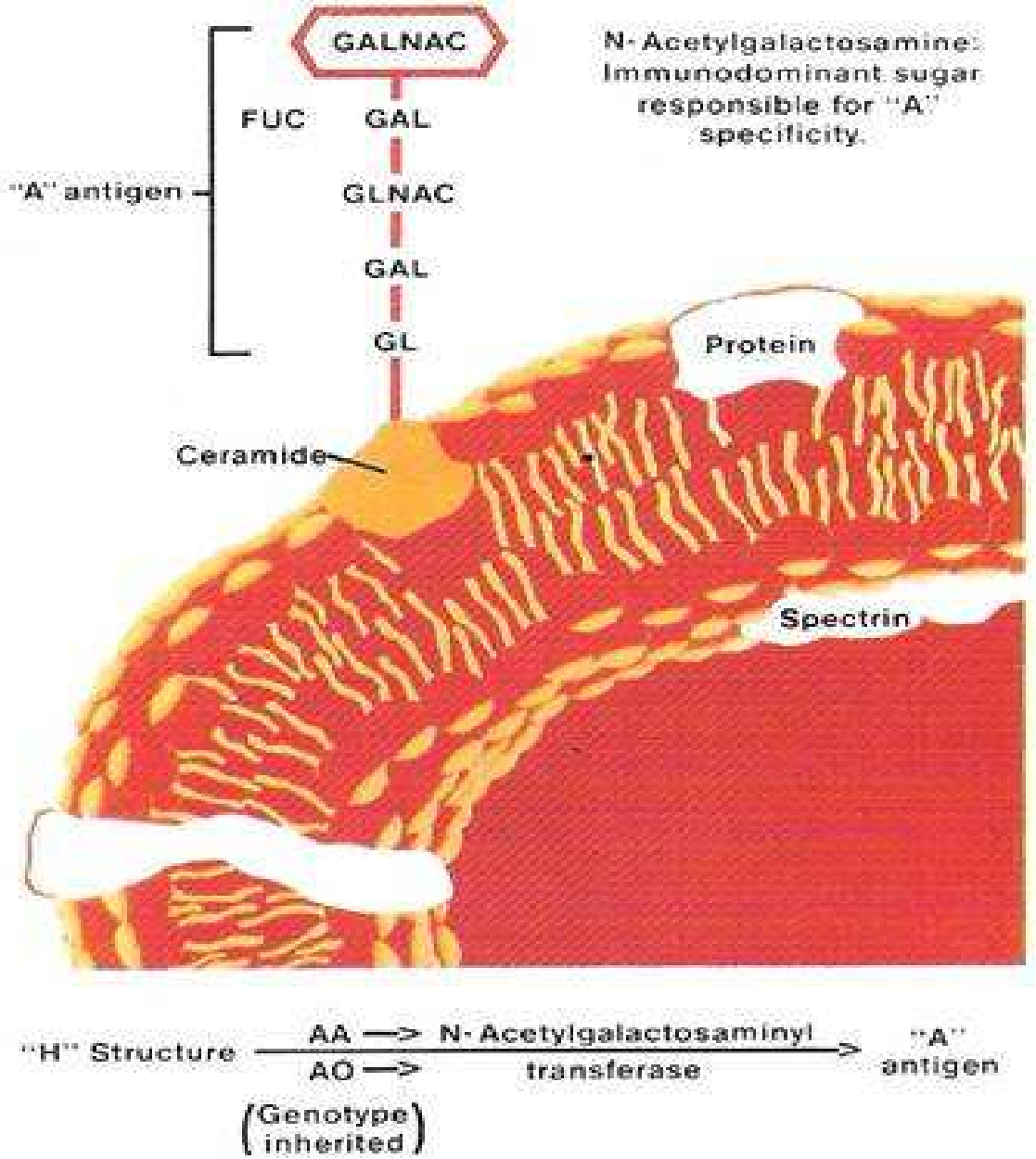


Plate 5. Formation of the A antigen.

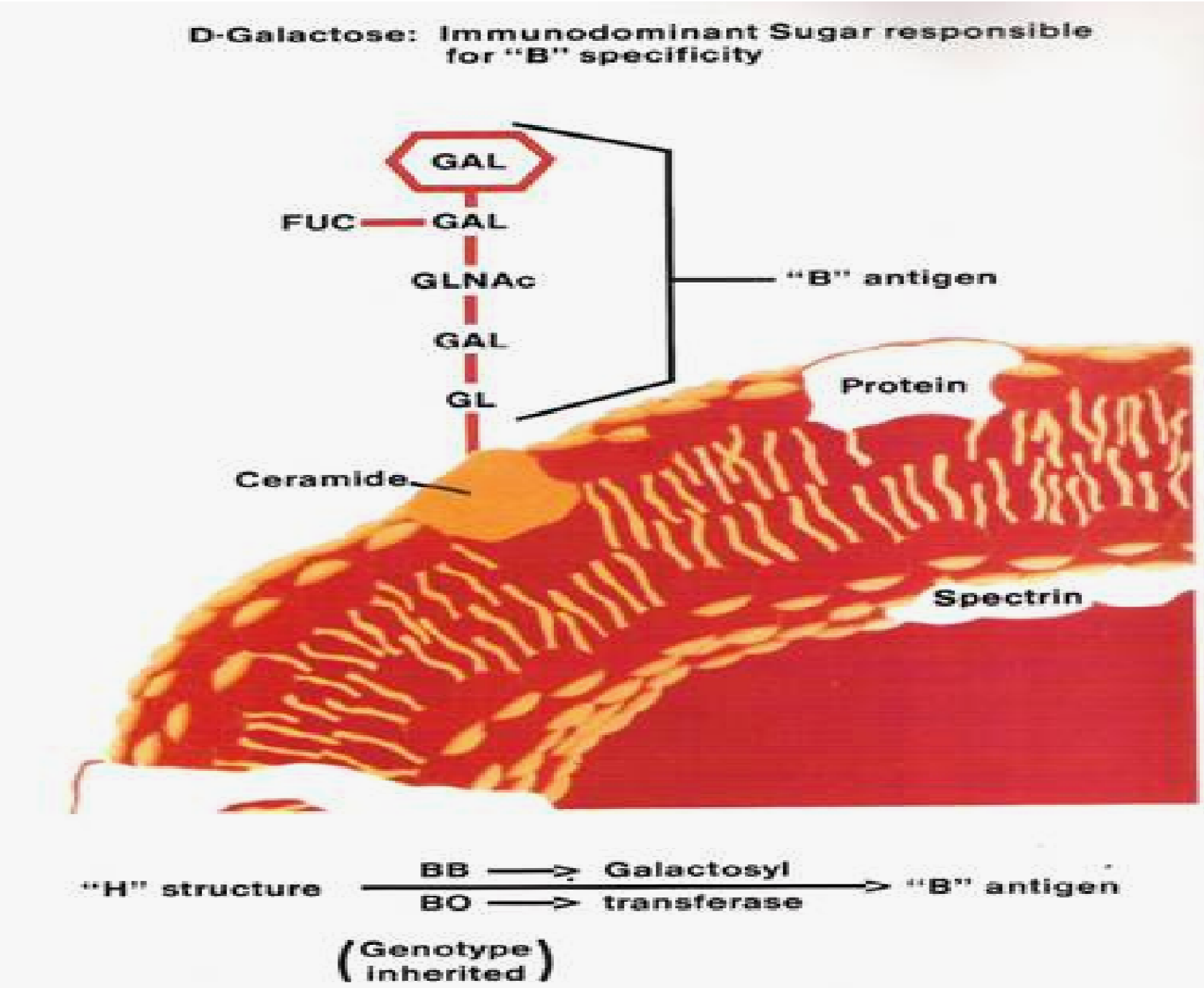


Plate 7. Formation of the B antigen.

Σύστημα Η

- Δυο γονίδια: H and h
  - H> 99.9%
  - h<0.1%
- Παραγωγή Η αντιγόνου -πρόδρομου μορίου των Ακαι Β αντιγόνων
- ***Ulex europaeus*** = anti-H
- Η μετατροπή του Η αντιγόνου σε Α και Β αντιγόνα ποκίλλει στις διάφορες ομάδες αίματος.
- $0>A^2>B>A^2B>A^1>A^1B$

- Αντιθέτως άτομα με τον σπάνιο Oh(hh) φαινότυπο (δεν έχουν Α,Β ή Η αντιγόνα στα ερυθροκύτταρα τους) αναπτύσσουν ισχυρά κλινικά αντι-Η αντισώματα με μεγάλο θερμικό εύρος και αντιδρούν με όλα τα ερυθροκύτταρα εκτός αυτών της ομάδος Oh.

Αντισωματα Η

- H-like αντιγόνα απαντώνται στην φύση
- Anti-H ανιχνεύονται σε A^1, A^1B και σπανιότερα σε άτομα ομάδας Β και μπορεί να προκαλέσουν ψευδώς θετική αντίδραση στον έλεγχο της ανάστροφης ομάδας
- Μικρές ποσότητες Η στα κύτταρα μπορεί να σχηματίσουν αντι-Η αντισώματα
  - Σχετικά ασθενή
  - Σχεδόν πάντα αντιδρούν σε RT
  - Θεωρούνται μη κλινικά σημαντικά

O_H Phenotype (Bombay)

- Συμβαίνει όταν κληρονομούνται δυο hh γονίδια απο τον Hh επίτοπο
  - Έχουν φυσιολογικά A και B γονίδια αλλά δεν μπορούν να εκφραστούν.

- Χρησιμοποιείται ο όρος "Bombay" διότι ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στην Ινδία

O_H Phenotype (Bombay)

- Το σύμβολο "O_h" καταδεικνύει αυτόν τον φαινότυπο
  - Τα ερυθροκύτταρα των ατόμων αυτών δεν συγκολλώνται με anti-A, -B ,η –A,B
  - Ο ορός/πλάσμα τους συγκολλά όλα τα A και B κύτταρα
- Δεν αναγνωρίζεται μέχρις ότου ο ορός τους ελεγχθεί με κύτταρα O με τα οποία δίνει ισχυρή συγκόλληση.
  - Έχουν anti-A, -B, -A,B και –H
  - Μεταγγίζονται μόνο με ερυθρά ομάδας Bombay (<0.01%)

O_H Phenotype (Bombay)

- Επιβεβαιωτική δοκιμασία
  - Anti-H lectin (Ulex europaeus) – αρνητική
  - Συγκόλληση των A, B, AB και O κυττάρων
  - Ο ορός τους δεν συγκολλά μόνο τα Oh κύτταρα

Εκκριτικοι γονοι

- Α, Β και Η αντιγόνα ανιχνεύονται στα διάφορα υγρά του σώματος.
- Ελέγχονται απο τα Se και se, εκκριτικά γονίδια.
- Απαιτείται μόνο ένα αντίγραφο του Se γόνου.
- Ο γόνος se είναι άμορφος.
- Κληρονομείται ανεξάρτητα απο το ΑΒΟ σύστημα
- Η μελέτη των εκκριτικών τύπων βοηθά στην ανίχνευση ασθενών υποομάδων ή επιλύει προβλήματα στον καθορισμό σπανίων ομάδων αίματος
- 80% των Καυκασίων είναι εκκριτικοί τύποι

Υποομαδες ABO

- Οι υποομάδες ABO διαφέρουν στην ποσότητα του αντιγόνου που ανιχνεύεται στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη
  - Οι υποομάδες έχουν λιγότερη ποσότητα αντιγόνου
- Είναι αποτέλεσμα λιγότερο δραστικών ενζύμων .
- Δεν μετατρέπουν άρκετά Η αντιγόνα σε Α ή Β αντιγόνα
- Οι Α υποομάδες είναι πιο συχνές απο τις Β

Μηχανισμοι γενεσης υποομαδων ABO

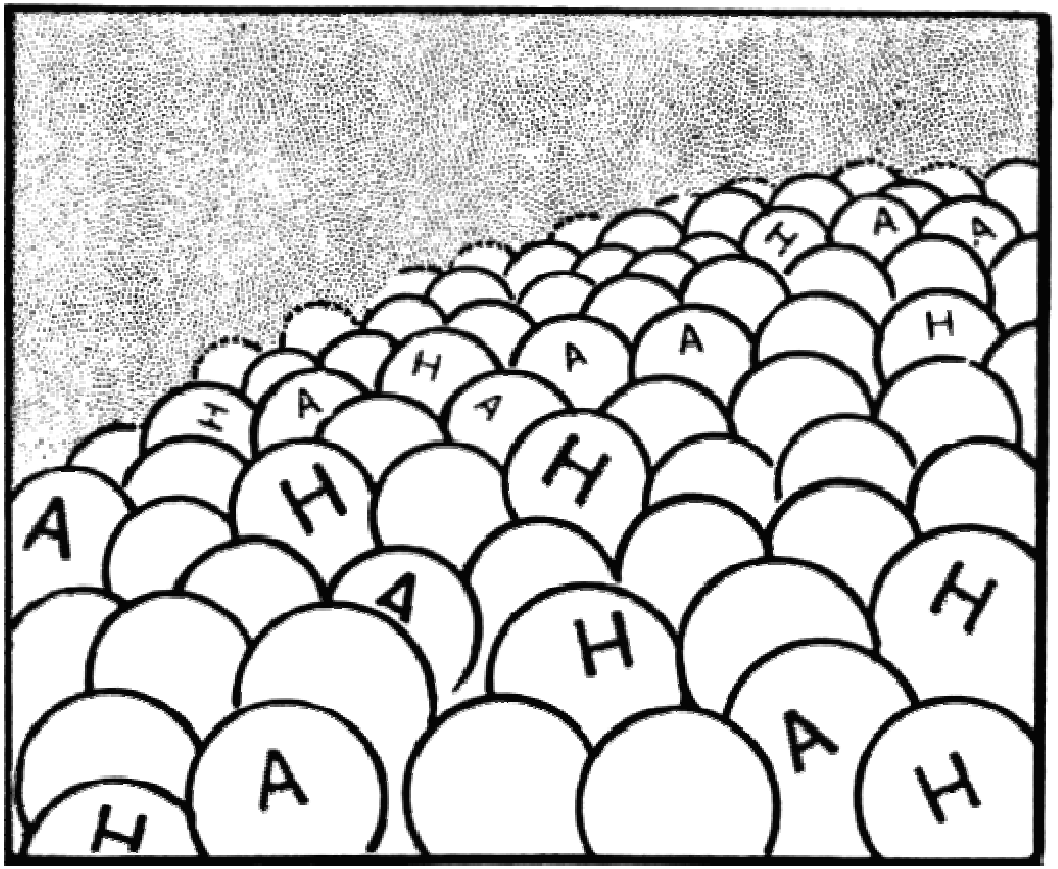
- Μεταλλάξεις στην καταλυτκή περιοχή των γλυκοσυλτρανσφερασών
- Μεταλλάξεις στην μη καταλυτική δομή των γλυκοσυλτρανσφερασών
- Ανεπαρκής παραγωγή γλυκοσυλατρανσφεράσης
- Ανεπαρκής παραγωγή πρόδρομης ουσίας
- Δομικές αλλαγές πρόδρομης ουσίας
- Επίκτητα αντιγόνα
- Διαταραχή της βιοσύνθεσης

Μηχανισμοι γενεσης υποομαδων ABO

- Μη ABO γλυκοσυλτρανσφεράσες παράγουν ABO αντιγόνα
- Παραγωγή λάθος ABO αντιγόνων απο τις γλυκοσυλτρανσφεράσες
- Μη ευαίσθητα συστήματα ανίχνευσης
- Χείμερα/μεταμόσχευση/μετάγγιση
- Λοιμώξεις
- Φυσιολογικά

ΥΠΟΟΜΑΔΕΣ Α

- Οι δύο κύριες υποομάδες Α είναι : A_1 και A_2
  - Και οι δυο αντιδρούν ισχυρά με anti-A
  - Ο διαχωρισμός των A_1 απο A_2 ερυθροκύτταρα γίνεται χρησιμοποιώντας την λεκτίνη *Dolichos biflorus* (anti-A_1)
  - 80%των ατόμων ομάδας Α ή ΑΒ ανήκουν στην υποομάδα A_1
  - 20% είναι A_2 και A_2B



A_2

ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ A^1 ΚΑΙ A^2

- Γιατί είναι σημαντικός ο A_2 φαινότυπος ?
  - A_2 και A_2B άτομα μπορεί να παράγουνanti-A_1
  - Ασυμβατότητα στην διαδικασία της διασταύρωσης
- Ποιά είναι η διαφορά μεταξύ των A_1 καιA_2 αντιγόνων?
  - Ποσοτική διαφορά
  - Ο A_2 γόνος δεν μετατρέπει επαρκώς τα Η σε Α
  - Λιγότερες Α2 αντιγονικές θέσεις σε σχέση με τις Α1

Anti-A^1

- 1-8% των A2 και 22-35% των A2B ατόμων αναπτύσσουν anti-A1
- Προβλήματα στον έλεγχο της ανάστροφης ομάδας
- Ασυμβατότητα αν ο δότης είναι A1
- ΟΧΙ κλινικά σημαντικά εκτός αν δρούν στους 37C ή AHG.
- Κλινικά σημαντικά– προκαλουν καταστροφή των ερυθροκυττάρων– αιμολυτική νόσο νεογνού

Αλλες Α υποομαδες

- Άλλες υποομάδες Α περιλαμβάνουν
  - A_{int} (intermediate), $\mathbf{A_3}$, A_x, A_m, A_{end}, A_{el}, A_{bantu}
- **Τα A_3** ερυθροκύτταρα προκαλούν **mixed field agglutination** όταν χρησιμοποιείται πολυκλωνικός anti-A ή anti-A,B
- Μπορεί να περιέχουν anti-A

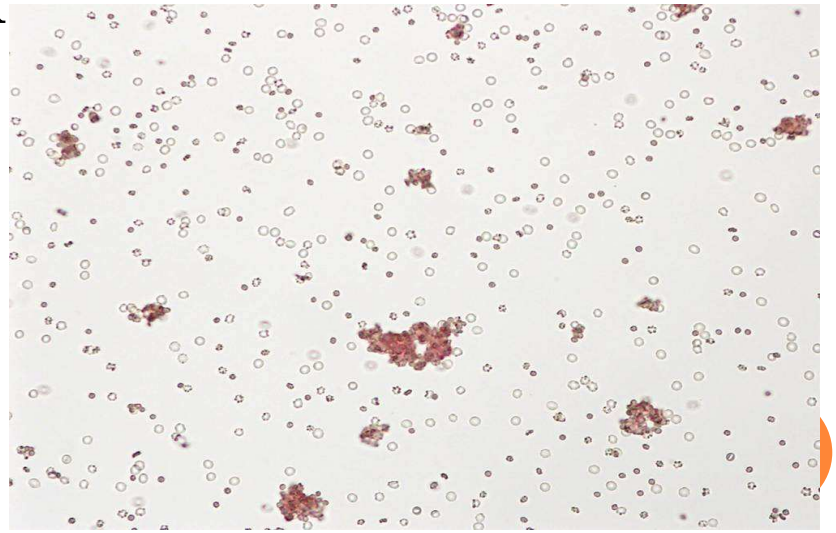


Table 7. Serological reaction patterns adopted from current text books. A negative reaction is noted by 0 and positive reactions are denoted from + (very weak agglutination) to 4+ (maximal agglutination).

Subgroup of A	RBC reactions with				ABO substances in saliva	Anti-A_1 in serum
	Anti-A	Anti-A,B	Anti-A1	Anti-H		
A_1	4+	4+	4+	0	A, H	No
A_2	4+	4+	0	4+	A, H	Sometimes
A_{int}	4+	4+	2+/3+	2+/3+	A, H	No
A_3	2+/+[mf]	2+/+[mf]	0	4+	A, H	No
A_x	0/+	2+/+	0	4+	H	Often
A_{el}	0[§]	0[§]	0	4+	H	Sometimes
A_{end}	+	+	0	4+	H	Sometimes
A_{finn}	+	+	0	4+	H	Yes
A_{bantu}	+(+)	+(+)	0	4+	H	Yes
A_m	0/+	0/+	0	4+	A, H	No
A_y	0[§]	0[§]	0	4+	A, H	No

[§] anti-A can adsorbed and eluted from these cells despite absence of agglutination.
[mf] mixed field agglutination
B^{weak} alleles

Table 3 Expression of ABO antigens per red blood cell surface

Blood group type		Expression
A_1	adult	810,000 ~ 1,170,000
A_1	newborn	250,000 ~ 370,000
A_2	adult	240,000 ~ 290,000
A_2	newborn	140,000
A_1B	adult	460,000 ~ 850,000
A_1B	newborn	240,000 ~ 290,000
A_2B	adult	120,000
A_3		7,000 ~ 100,000
A_x		1,400 ~ 10,000
A_{end}		1,100 ~ 4,400
A_m		200 ~ 1,900
A_{el}		100 ~ 1,400
B	adult	610,000 ~ 830,000
B	newborn	200,000 ~ 320,000
A_1B	adult	310,000 ~ 560,000

Υποομαδες Β

- Λιγότερο συχνές απο τις υποομάδες Α
- Τα κριτήρια μοιάζουν με αυτά των Α υποομάδων
- Συνήθως δεν αναπτύσσονται anti-Β
- Η Β3 προκαλεί εικόνα μικτού πληθυσμού
- Οι Β υποομάδες διαφοροποιούνται απο τις αντιδράσεις με anti-Β, anti-Α,Β, και anti-Η
- B_3, B_x, B_m, and B_{el}

Table 8. Characteristics of some more frequent, B_{weak} phenotypes

Subgroup of B	RBC reactions with				ABO substance in saliva	Anti-B in serum	GTB in serum
	Anti-A	Anti-B	Anti-A,B	Anti-H			
B	0	++++	++++	++	B, H	None	Yes
B_3	0	mf	mf	+++	B, H	None	Yes
B_x	0	w	w	+++	(B_x), H	Yes	None
B_m	0	*/w	0/w	+++	B, H	None	Yes
B_{el}	0	0	0	+++	H	Sometimes	None

mf, mixed field; w, very weak agglutination

*Anti-B may be adsorbed onto and eluted from these cells

(B_x), may require inhibition of agglutination of B_x cells for detection

ΕΠΙΚΤΗΤΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ Β

- Δράση αποακετυλάσης στην Ν –ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνη ⟶ D-γαλακτόζη
- Άτομα ομάδας Α
- Μερικοί Β-αντιοροί αντιδρούν με το επίκτητο Β και δίνουν εικόνα ΑΒ
- Ασθενείς με καρκίνο συνήθως παχέος εντέρου
- Passenger antigen :προσρόφηση Β-like αντιγόνων σε άτομα ομάδας Α και Ο

ΥΠΟΟΜΑΔΕΣ ΑΒ

- Ανιχνεύονται εννέα υποομάδες ανάλογως των αντιγόνων Α και Β που περιέχουν
- AχB,A1Bχ,AmB,A1Bm,AelB,A1Bel,cisA2B3, cisA1B,cisA1B3

Cis AB

- Στον φαινότυπο cis AB τα δυο αλλήλια βρίσκονται στην ίδια πλευρά και έτσι πχ ένας πατέρας AB και μια μητέρα O έχουν παιδί AB.
- Ο ορός απο τα περισσότερα cis AB άτομα περιέχει αντι –B,γεγονός που υποδεικνύει ότι το B αντιγόνο στην cis AB είναι διαφορετικό απο το φυσιολογικό B.

B(A) ΚΑΙ A(B)

- Ο όρος Β(Α) φαινότυπος χρησιμοποιείται όταν μικρής ποσότητας αντιγόνο Α εκφράζεται επι παρουσίας άφθονου αντιγόνου Β.
- Οι περισσότεροι είναι Νέγροι και στον ορό τους έχουν 5-6 φορές περισσότερο Β-ένζυμο απο άτομα με φυσιολογικό Β

Μοριακη δομη αβο

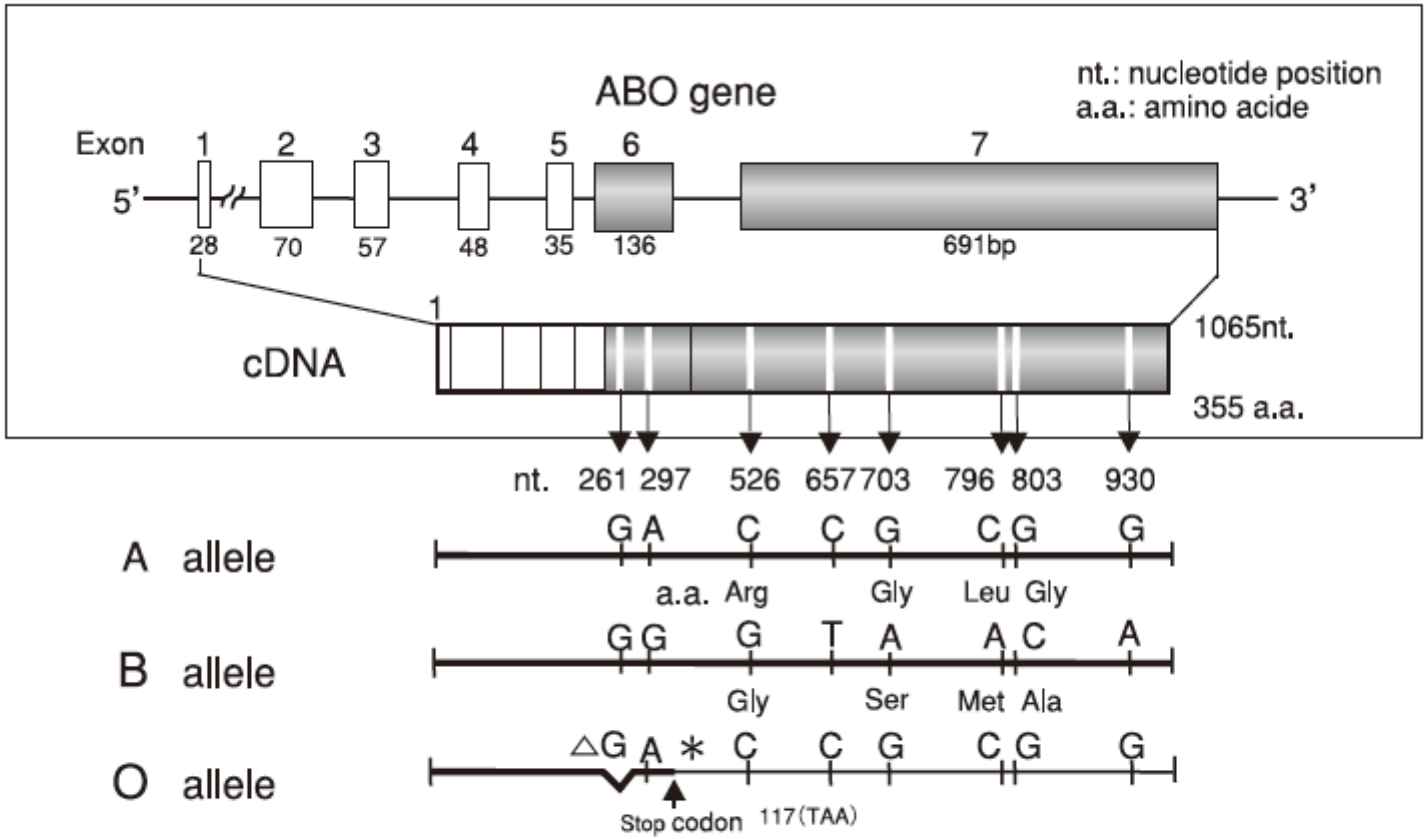
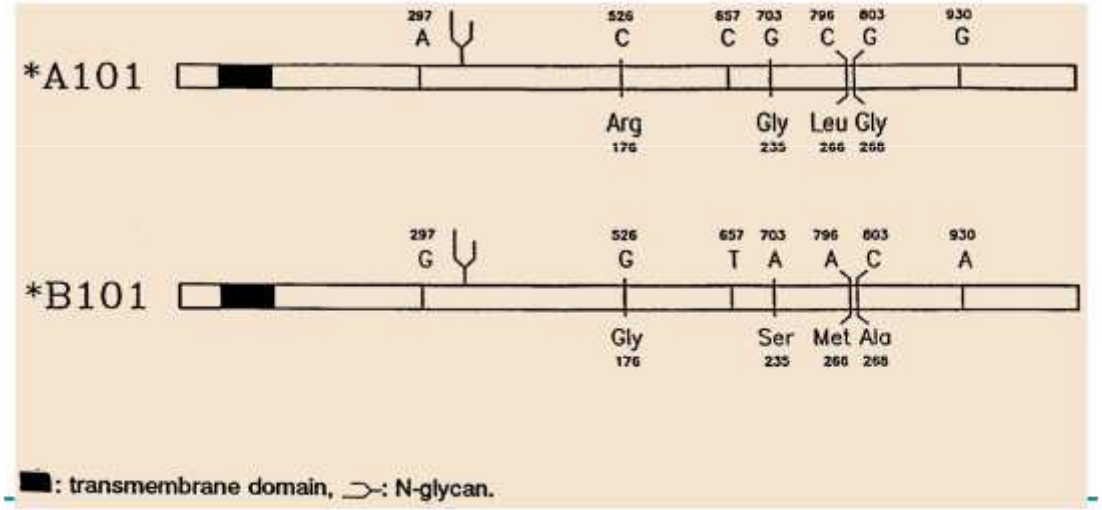


Figure 3. Structure of the ABO gene locus and nucleotide sequences of A, B and O alleles.
Diagram of exon organization of the protein coding sequences (upper shaded). * ; Entirely different deduced amino acid sequence in O alleles due to frame-shifting caused by a single base deletion (lower).

Αλληλουχία νουκλεοτιδίων και αμινοξέων των A1 και B αλληλίων

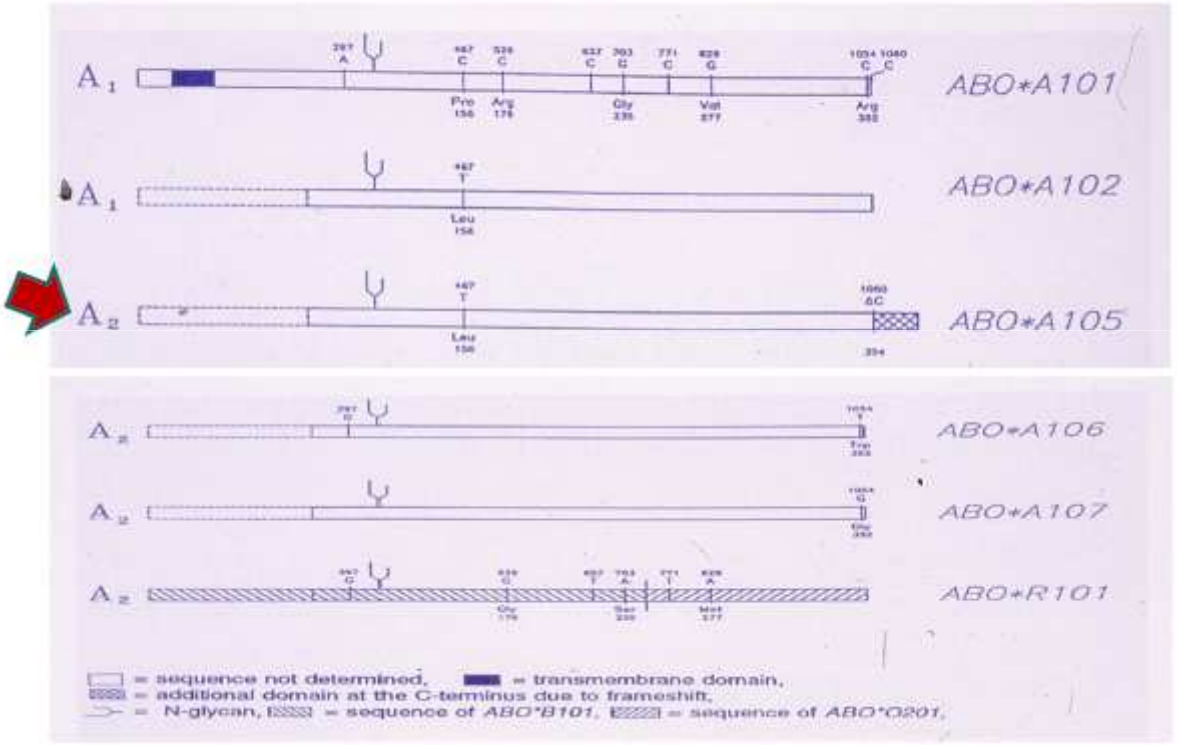
(σιωπηλές μεταλλαγές $A^{297} \rightarrow G$, $C^{657} \rightarrow T$, και $G^{930} \rightarrow A$
δομικές μεταλλαγές $C^{526} \rightarrow G$, $G^{703} \rightarrow A$, $C^{796} \rightarrow A$, και $C^{803} G \rightarrow C$)



Yamamoto at al, 1990

Η κύρια γενετική διαφορά ανάμεσα στο A1(A101)και A2 αλλήλιο(A201)είναι μια σημειακή μετάλλαξη στο εξόνιο 7 ,467C>T(Pro156Leu) και ένα έλλειμμα στις μία από τις τρείς κυτοσίνες στην θέση 1059-1061 με αποτέλεσμα να έχομε επέκταση του πλαισίου ανάγνωσης κατα 64 αμινοξέα.Τελικό αποτέλεσμα είναι η παραγωγή μιας ασθενέστερης γλυκοσυλυτρανσφεράσης.

Υποομάδα A2


A1
ABO*A101
A1
ABO*A102
A2
ABO*A105
A2
ABO*A106
A2
ABO*A107
A2
ABO*R101
= sequence not determined, = transmembrane domain,
= additional domain at the C-terminus due to frameshift,
= N-glycan, = sequence of ABO*B101, = sequence of ABO*O201.

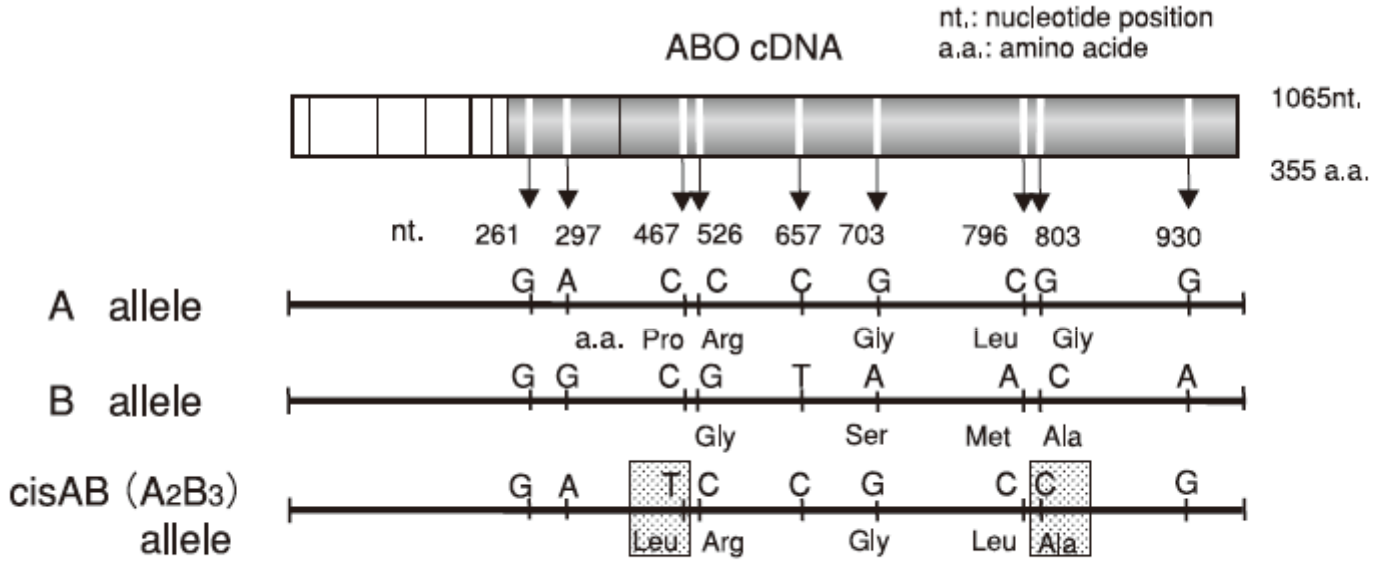


Figure 4. Structure of the ABO gene locus and nucleotide sequences of A, B and cisAB alleles. Diagram of exon organization of the protein coding sequences (upper shaded).

Figure 4. Structure of the ABO gene locus and nucleotide sequences of A, B and cisAB alleles. Diagram of exon organization of the protein coding sequences (upper shaded).

Table 4 Comparison of the nucleotide sequences of alleles in A, B and AB subgroups

	Entire coding sequence determined with cDNA														
	261	297	467	526	646	657	703	796	802	803	871	930	1054	1059-1061	nt.
A_1 allele	G	A	C	C	T	C	G	C	G	G	G	G	C	C	
A_2 allele			T											C-del	
A_3 allele											A				
A_x allele					A										
B allele		G		G		T	A	A		C		A			
B_3 allele		G		G		T	A	A		C		A	T		
cis AB allele			T							C					

(Vox Sang, 1995, Yamamoto et al.)

ABO polymorphisms

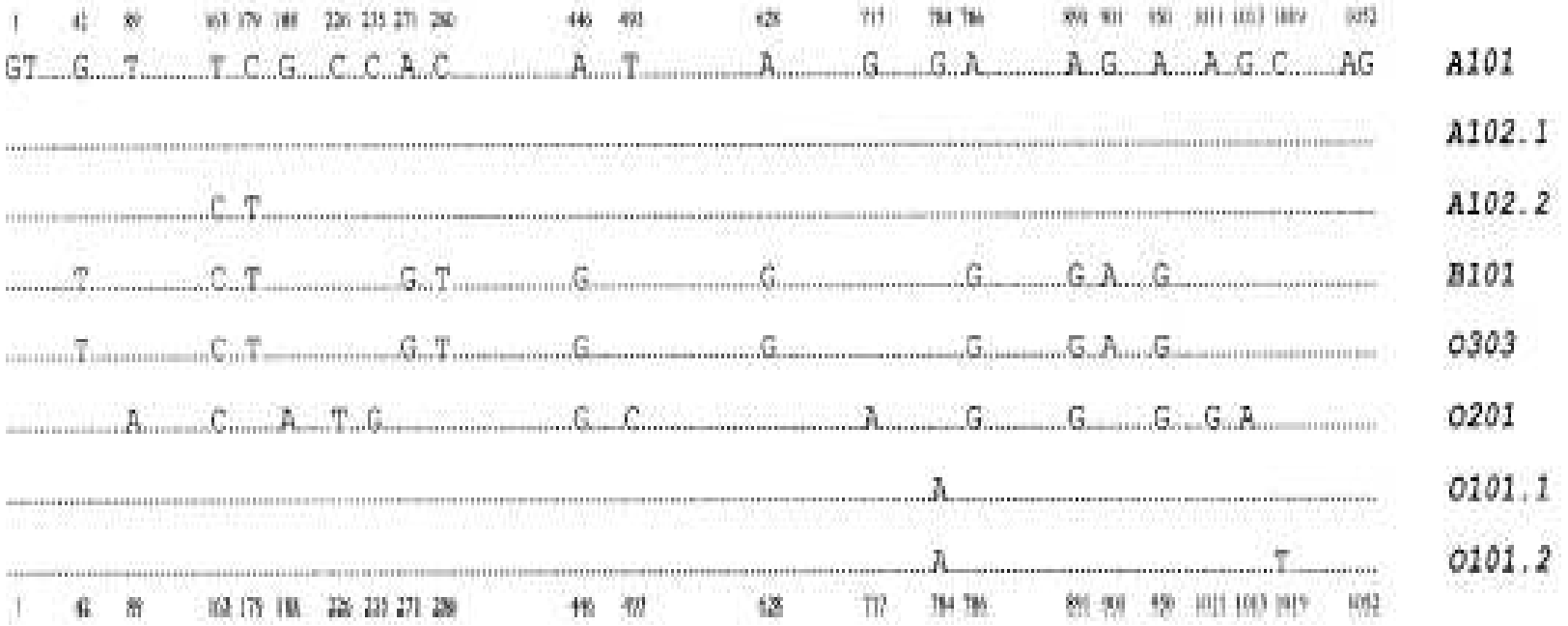
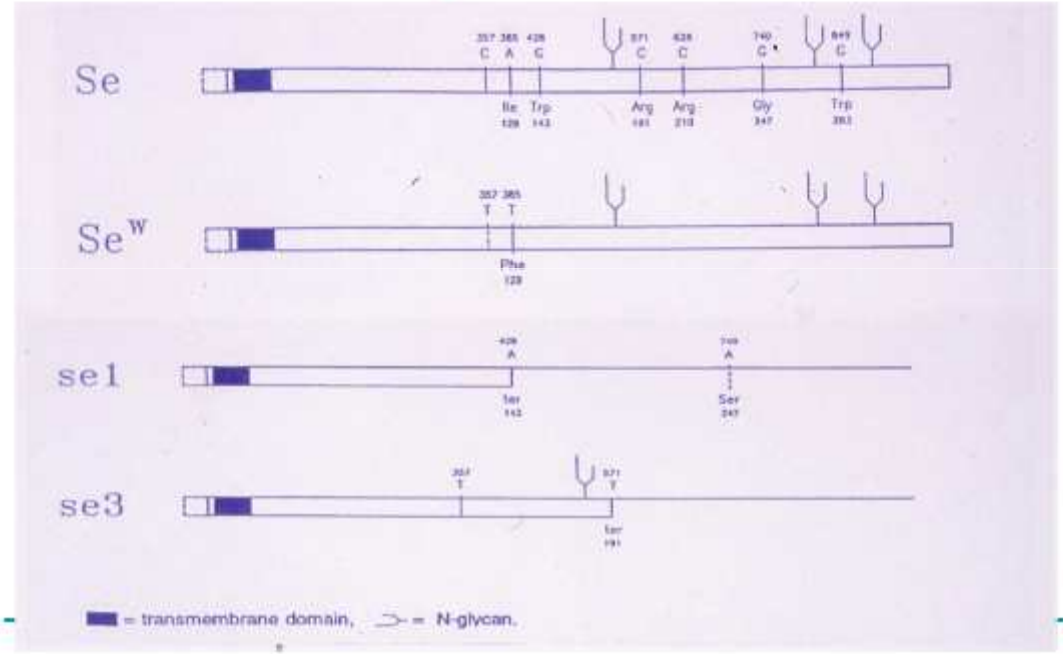


Fig. 4. Schematic comparison of the nucleotide sequence for intron 6 of the *ABO* gene. The *A101* allele is used as the reference for comparison and only differences from this sequence are indicated.

Μοριακή δομή και παραλλαγές του Sese γονιδίου



ABO ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

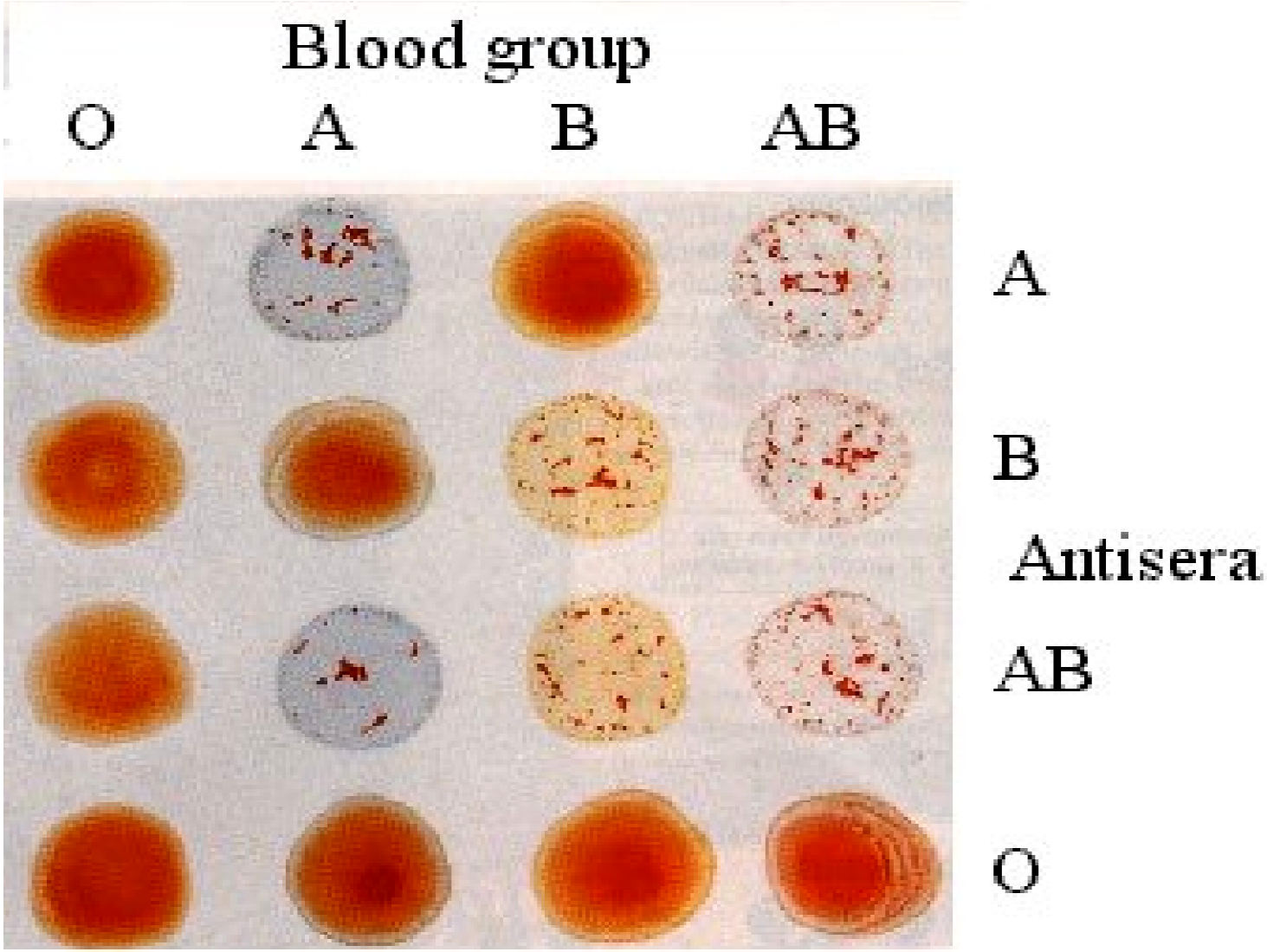
- Η παραγωγή των ABO αντισωμάτων είναι "non-red blood cell stimulated" πιθανόν λόγω έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και αναφέρονται σαν "αναμενόμενα αντισώματα"
- Ο τίτλος των ABO Abs συχνά ελαττώνεται με την πάροδο της ηλικίας και σε ασθενείς με υπογαμμασφαιριναιμία.
- Τα νεογνά δεν παράγουν Abs μέχρις ηλικίας 3-6 μηνών.
- Τα νεογνά έχουν μητρικά επίκτητα αντιγόνα τα οποία διέρχονται τον πλακούντα(IGG)

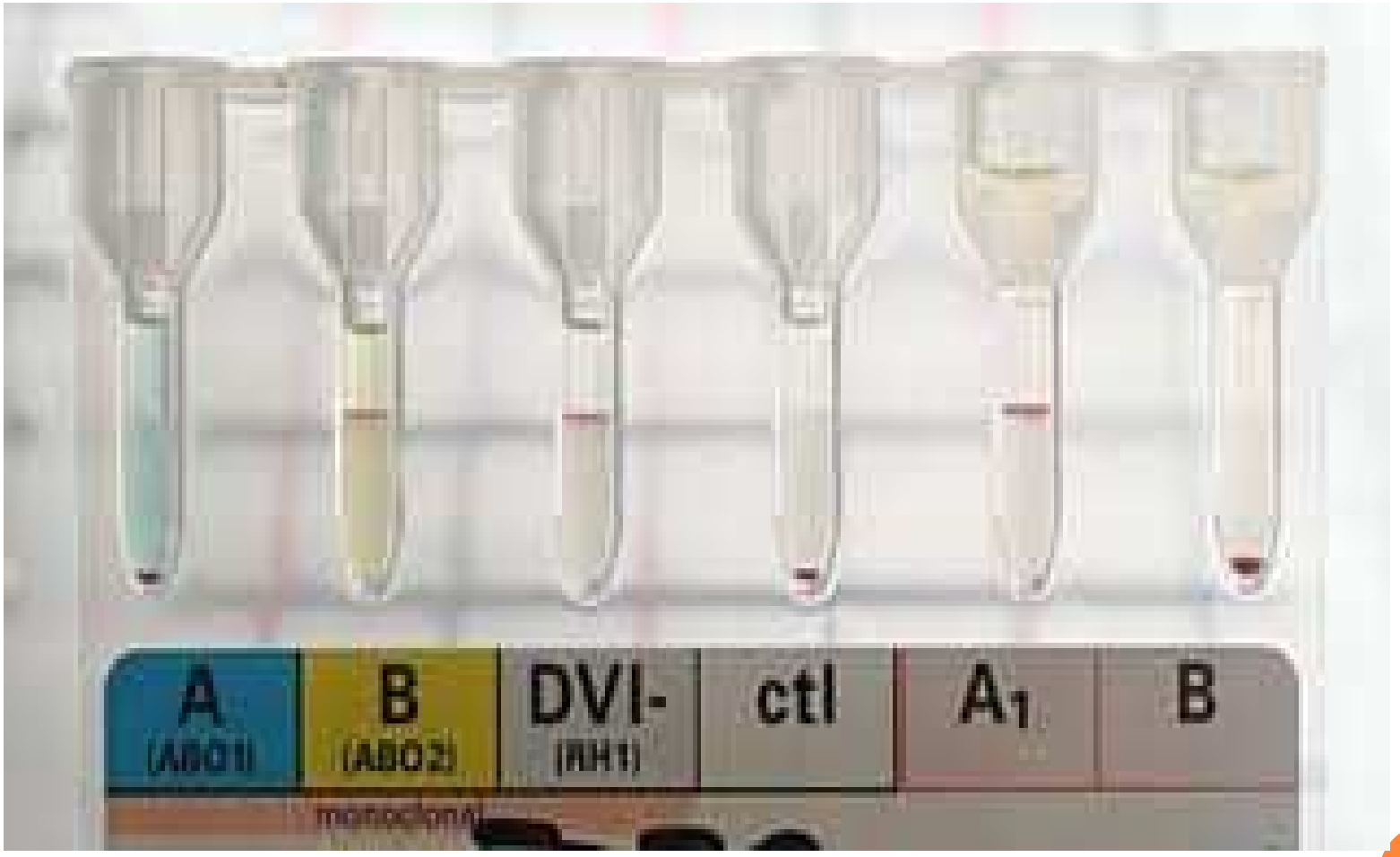
- Είναι γενικά IGM
- Για τις ομάδες Α και Β είναι IGM
- Για την ομάδα Ο είναι IGG (σε μικρό ποσοστό IGM)
- Ενεργοποιούν το συμπλήρωμα
- Προκαλούν αιμολυτική αντίδραση

Ορολογικος ελεγχος ABO αντιγονων

- Ορθή ομάδα
- Ανάστροφη ομάδα
- ΠΑΝΤΑ ταύτιση
- Ανοσολογικές τεχνικές

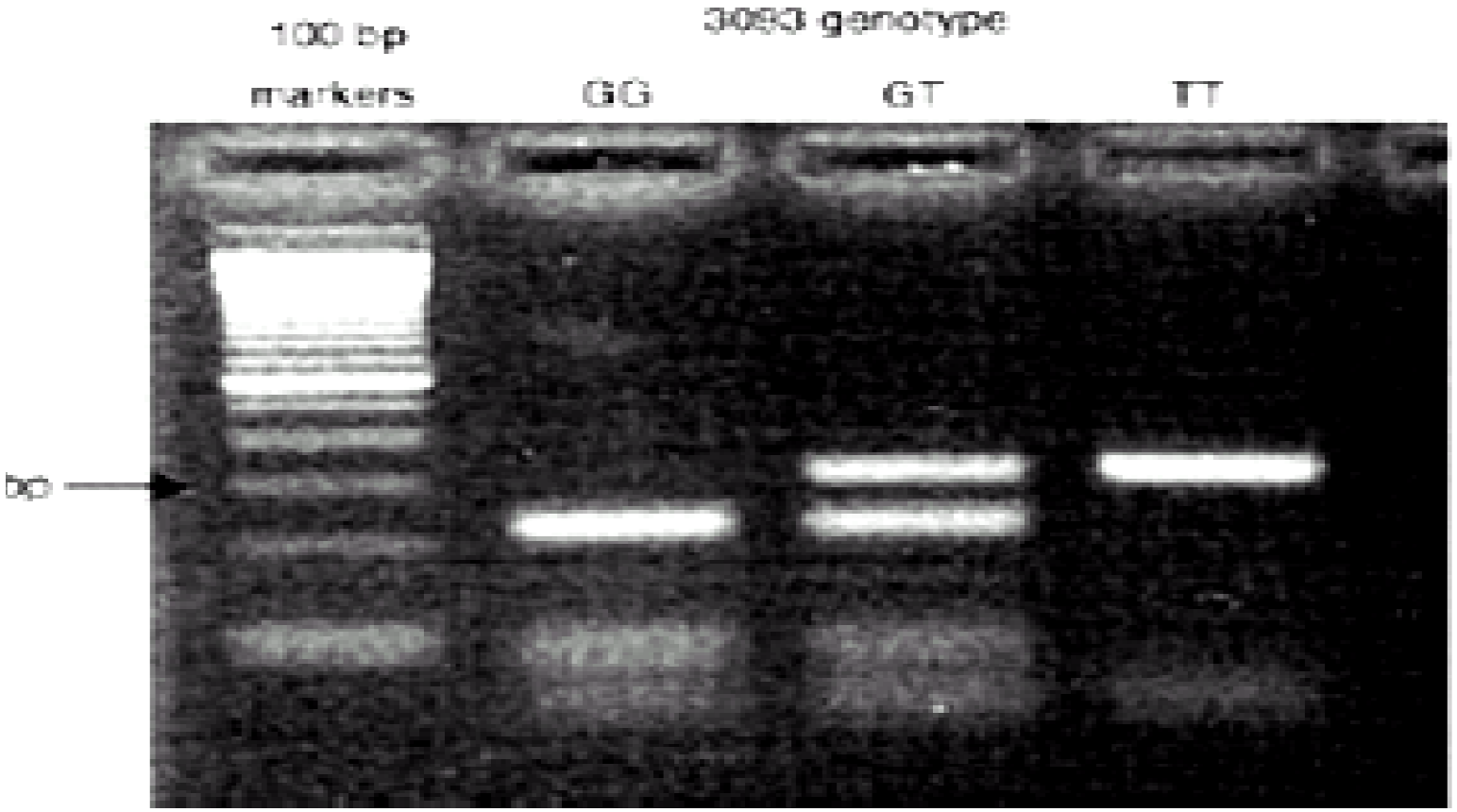
ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ




A
(ABO1)
B
(ABO2)
DVI-
(RH1)
ctl
A1
B
monoclonal

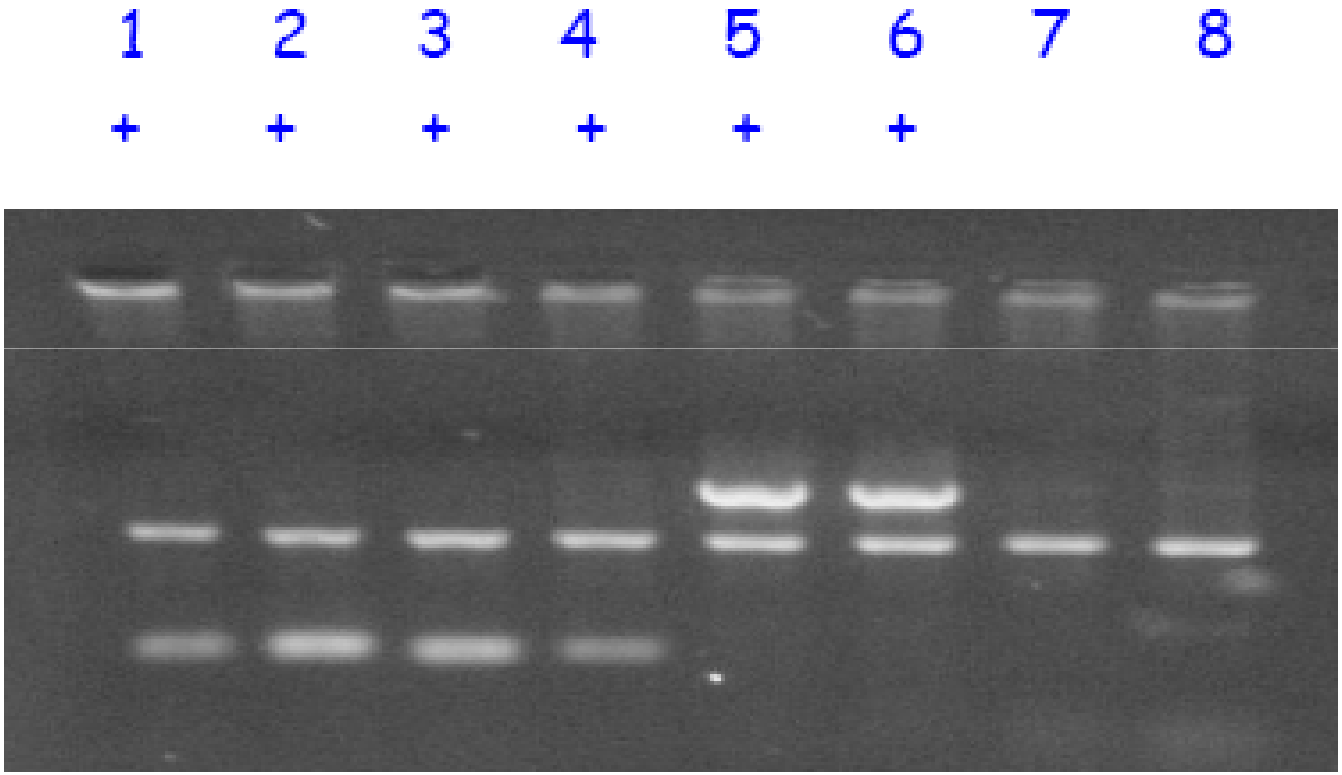
Μοριακος ελεγχος

PCR- RFLP
(Restriction Fragment Length Polymorphism)



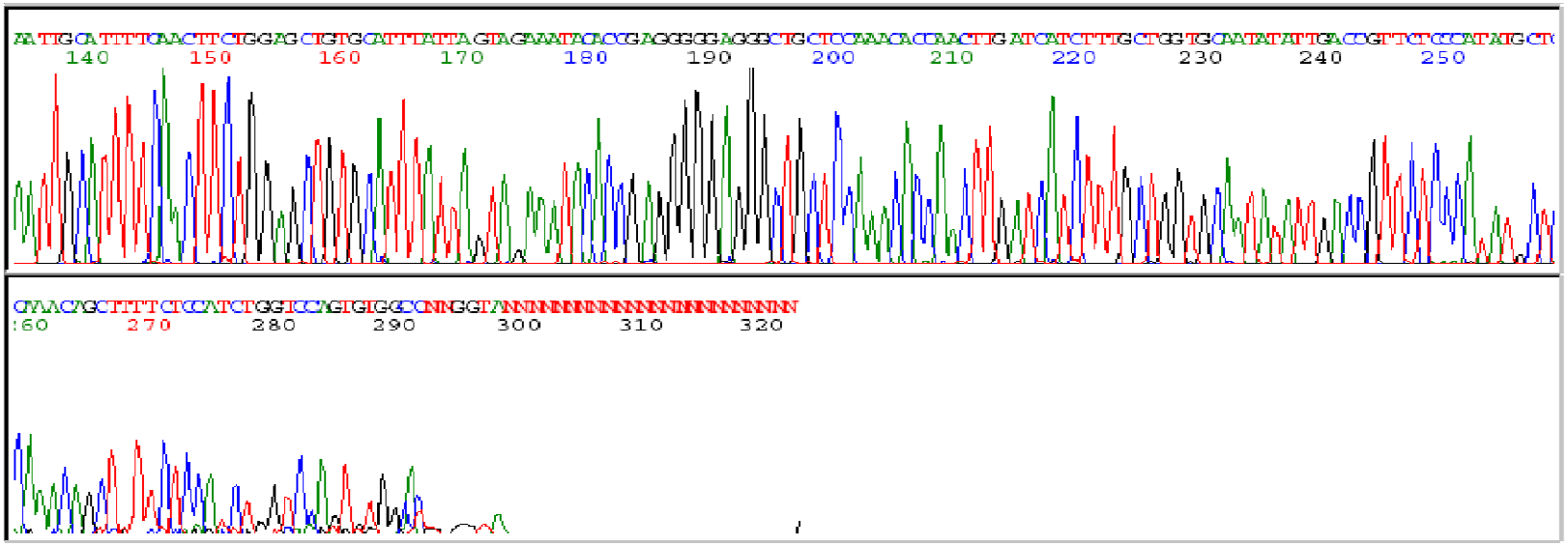
Allele Specific PCR

Also called SSP (site specific primer)

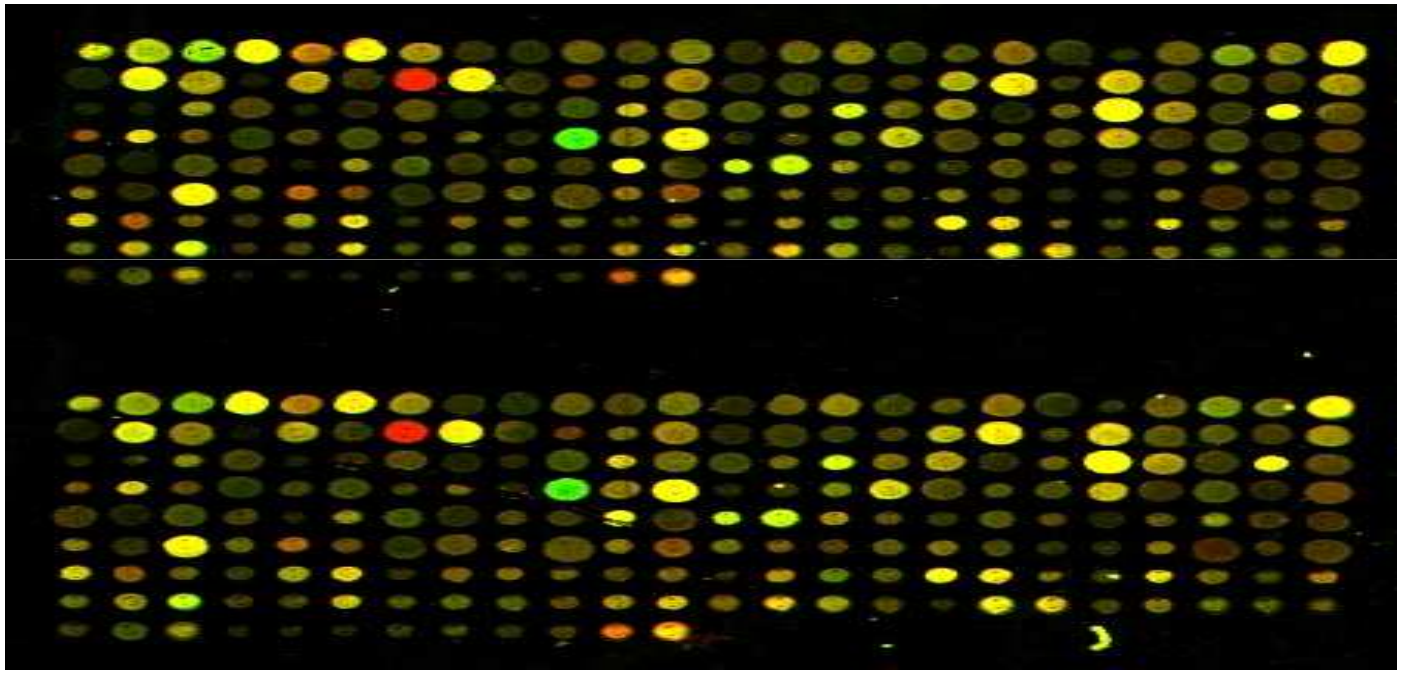


Real-Time PCR

DNA Sequencing



Microarray Genotyping



ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ Η ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ?

Serological Typing	DNA Typing
Short Turnaround time	Long Turnaround time
ABO/D typing is simple, proven and reliable	ABO/D typing is complex and not fully understood
Extended typing is difficult, slow and expensive	Extended typing is relatively easy, fast, cheap
Extended typing is difficult on recently transfused patients	Extended typing is reliable including recently transfused patients
Typing of DAT positive samples is difficult	Typing is not affected by DAT status
Automated	To be Automated

ΤΙ ΕΜΜΟΝΗ ΙΔΕΑ ΕΙΝΑΙ ΑΥΤΗ, ΝΑ ΠΕΡΠΑΤΑΕΙ ΠΡΟΣ ΤΑ ΠΙΣΩ! ΤΙ ΖΩΑΚΙ ΧΩΡΙΣ ΜΕΛΛΟΝ!
ΕΙΣΑΙ ΕΝΑ ΑΝΟΗΤΟ ΖΩΑΚΙ, ΧΩΡΙΣ ΜΕΛΛΟΝ!
Η ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ ΕΙΝΑΙ ΤΟΣΟ ΑΣΧΗΜΟ, ΠΟΥ ΑΥΤΟ ΕΔΩ ΚΑΝΕΙ ΑΠΟ ΤΩΡΑ ΠΙΣΩ;

Ευχαριστώ