A molekuláris genetikai vizsgálatok szerepe a Landsteiner-szabálytól eltérő ABO vércsoport-szerológiai eredmények esetén

Varga Lívია^{1,2}, Nemes Nagy Zsuzsanna¹, Mosonyiné Kőszegi Andrea¹, Nagy Sándor¹, Jakab Judit¹, Szilvási Anikó¹, Vilimszky Zsófia³, Bors András³, Tordai Attila⁴, Zsigmond Soós Ildikó¹, Andrikovics Hajnalka^{3,4,@}

¹Országos Vérellátó Szolgálat, Budapest

²Rácz Károly Doktori Iskola, Semmelweis Egyetem, Budapest

³Dél-pesti Centrumkórház, Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Molekuláris Genetikai Laboratórium, Budapest

⁴Semmelweis Egyetem, Transzfuziológiai Tanszék, Budapest

Klinikai szempontból az ABO a legjelentősebb vércsoportrendszer, amelyről a korábbi kiterjedt kutatások ellenére még mindig jelentős új felfedezések születnek. A vércsoportrendszer genetikai hátterének felderítése tette lehetővé, hogy a kereskedelmi forgalomban több ABO genotípus meghatározási módszer is elérhető legyen. A jelen tanulmány célja az ellentmondó ABO vércsoport-szerológiai eredmények bemutatása esettanulmányok segítségével, a lehetséges klinikai és genetikai okok összefoglalása és az ellentmondások feloldására használható megoldások bemutatása különös tekintettel a molekuláris genetikai módszerekre. Esettanulmányainkban kitérünk az onkohematológiai betegségek kapcsán gyakori csökkent A és B antigénkifejeződésre, valamint a genetikai ABO alcsoportokra. Az esetbemutatókat követően irodalmi áttekintést adunk az ABO vércsoportrendszer alcsoportvariánsairól, valamint olyan, több ezer személy genetikai hátterét vizsgáló populációs tanulmányokat mutatunk be, amelyek a vércsoportrendszerek genetikai variánsait részletező ErythroGene adatbázis alapjául is szolgáltak.

Kulcsszavak: ABO vércsoport, Landsteiner-szabály, ABO alcsoport, molekuláris genetikai tipizálás

The role of molecular genetic testing in resolving violations of the Landsteiner's law in ABO blood group typing

Clinically, ABO is the most important blood group system, about which novel discoveries have recently been published despite previous extensive research. As a consequence of revealing its genetic background, nowadays several technical platforms are commercially available to determine the ABO genotype. The aims of this study are to present contradictory ABO blood group serological results by case studies, to summarize their potential clinical and genetic causes and to provide technical guidelines for solving discrepancies, with special regard to molecular genetic approaches. In our case studies, we discuss A and B antigens expression attenuation common in oncohematologic diseases, as well as germline determined ABO subtypes. Following the case presentations, we provide a review of the ABO blood group system genetic variants furthermore, we present large scale population studies with thousands of individuals, which formed the basis for the ErythroGene database of the blood group system genetic variants.

Keywords: ABO blood group, Landsteiner's law, ABO subtypes, molecular genetic typing

(Beérkezett: 2019. október 4.; elfogadva: 2019. november 25.)

@ Levelezési cím: Dr. Andrikovics Hajnalka, Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Molekuláris Genetikai Laboratórium, 1097 Budapest, Albert Flórián utca 5–7.; Tel.: +36-1-219-6188; E-mail: andrikovics.hajnalka@dpckorhaz.hu

Rövidítések

AF = allélfrekvencia; AML = akut mieloid leukémia; BGMUT = Blood Group Antigen Gene MUTation adatbázis; bp = bázispár; DNS = dezoxiribonukleinsav; ExAC = Exome Aggregation Consortium; gnomAD = Genome Aggregation Database; ISBT = International Society of Blood Transfusion; km = kevert mezős reakció; NGS = új generációs szekvenálás; PCR-SSP = polimeráz láncreakciószekvencia specifikus primerekkel; RFLP = restrikciós fragmenshossz polimorfizmus; SHOT = Serious Hazards of Transfusion; SSCP = egyszálú konformációs polimorfizmus; TCGA = The Cancer Genome Atlas

Bevezetés

A 38 vércsoportrendszer közül az ABO a legjelentősebb transzfuziológiai és szervtranszplantációs szempontból [1–4]. Kiemelt jelentőségét indokolja antigénjeinek immunogenitása, valamint az, hogy antitestjei előzetes vörösvérsejt antigén által kiváltott immunizáció nélkül, természetesen jelen vannak a szérumban (reguláris antitestek). Az ABO inkompatibilis transzfúzió súlyos, életveszélyes állapotot eredményez, ezért a rutin transzfuziológiai kivizsgálás részeként minden esetben kötelezően vizsgáljuk [3–5].

A Humán Genom Projekt befejezése óta, a nemzetközi kutatások már az egyes populációk genetikai variánsainak a feltérképezését, valamint egyes betegségek hátterében álló genetikai információk adatbázisokba történő kiépítését tűzték ki célul. Az új generációs szekvenálási technikáknak (NGS) köszönhetően több ezer egyén teljes genom-, illetve teljes exomszekvenálása is megoldható. A teljesség igénye nélkül megemlíthetjük az 1000 Genom Projektet, amely különböző populációkat vizsgál (2504 személy 26 populációból mind az öt kontinensre kiterjedően) [6, 7]. A Genome Aggregation Database (gnomAD) nagyszabású szekvenálási projektekből származó exom- és genomszekvenálási adatokat gyűjt össze és harmoni-

zál, valamint összefoglaló adatokat bocsát rendelkezésre a szélesebb tudományos közösség számára [8, 9]. A kizárólag exom adatokat tartalmazó első kiadása Exome Aggregation Consortium (ExAC) néven vált ismertté [10, 11]. Kiemelhető a The Cancer Genome Atlas (TCGA) konzorcium törekvése, amely 20 000 daganat és a nekik megfelelően párosított perifériás vérminta-szekvencia analízisét, és a szomatikus mutációk azonosítását végzi [12–15].

A korábbi transzfuziológiai Blood Group Antigen Gene MUTation (BGMUT) adatbázis 15 év kutatási eredményeit tartalmazta, amelynek a frissítése manuálisan történt az irodalomban leírt új eredmények alapján [16, 17]. Az International Society of Blood Transfusion (ISBT) által jegyzett vércsoportaltípusokat a szervezet a honlapján jeleníti meg (www.isbtweb.org) [18]. Az 1000 Genom Projekt adataiból összeállított ErythroGene adatbázis 36 vércsoportrendszer, 43 vércsoportgén, 210 412 alléljáról közöl adatokat webes felületen is mindenki számára elérhető klinikai felhasználásra (www.erythroGene.com) [6, 7]. Az adatbázis többszintű validáción esett át (genomi régió ellenőrzése, Human Genome Variation Society nevezéktan alkalmazása, nukleotid szintű egyezés, aminosavcsere-megfeleltetés), és a közzététel előtti végső felülvizsgálatot is az ISBT-vel együttműködve végezték [7]. Érdekességgé megemlíthető, hogy az 1000 Genom Projektben a megtalált variánsok 9,9%-át korábban még nem azonosították. Ezek a genetikai variánsok a legtöbb esetben nagyon ritkák, vagy nem befolyásolják jelentősen az antigén kifejeződését, ezért maradhattak eddig észrevétlenek [7].

Az ErythroGene adatai felhívják a figyelmet arra, hogy még egy olyan alaposan tanulmányozott vércsoportrendszerben is, mint az ABO, új eredmények tárhatóak fel. A 6 fő ABO allél közül (*ABO*O.01.01*, *ABO*O.01.02*, *ABO*B.01*, *ABO*A1.01*, *ABO*A1.02*, és *ABO*A2.01*, 1. táblázat) az ABO referenciaallél (*ABO*A1.01*) csak a

1. táblázat. A hat leggyakrabban előforduló ABO allél jellemzői (nukleotid eltérések, aminosavcserek, valamint allélfrekvenciája különböző népcsoportokban [7])

Allél	Fenotípus	Nukleotid-eltérések száma	Aminosavcsere [#]	AF ErythroGene (Teljes)	AF ErythroGene (Európa)	AF ErythroGene (Afrika)	AF ErythroGene (Ázsia)
<i>ABO*O.01.01</i>	O	1	Thr88Profs*31	28,4%	33,4%	16,9%	31,9–34,2%
<i>ABO*O.01.02</i>	O	10	Val36Phe; Arg63His; Pro74Ser; Thr88Profs*31	17,9%	12,8%	8,6%	18,9–28,5%
<i>ABO*B.01</i>	B	7	Arg176Gly; Gly235Ser; Leu266Met; Gly268Ala	14,2%	8,4%	13,4%	18,8–22,9%
<i>ABO*A1.01</i>	A1		Referencia	9,5%	18,1%	4,4%	3,5–12,6%
<i>ABO*A1.02</i>	A1	1	Pro156Leu	4,3%	0,3%	4,2%	0,5–14,6%
<i>ABO*A2.01</i>	A2	2	Pro156Leu; Pro354Argfs*23	4,2%	9,1%	5,8%	0–1,4%

[#]Az ABO fenotípust meghatározó aminosavcserek vastaggal kiemelve, aminosav sorrendet nem befolyásoló nukleotid eltérések nem kerültek feltüntetésre. Rövidítések jegyzéke: AF = allélfrekvencia

negyedik leggyakoribb allél (9,54%). A 6 fő allélt közvetlenül követő allélok közül 15 O vércsoportvariánsot határoz meg, ezek közül 14-ben megtalálható a c.261delG. Két allél a 20 leggyakrabban előforduló allél közül, 110 allél az adatbázisban szereplő összes 5 008 allél közül, és 16 aminosavcserével járó variáns a 48 közül nem szerepelt korábbi ABO adatbázisokban [7].

A Landsteiner-szabály értelmében minden egyén székumában tartalmazza a saját vörösvérsejtekről hiányzó A és B antigén(ek) elleni antitest(ek)et. A Landsteiner-szabálytól való eltérések hátterében egyrészt örökletes faktorok, másrészt klinikai háttérrel magyarázható okok állhatnak. Jelen tanulmányban célunk a Landsteiner-szabálytól való ABO-eltérések bemutatása, kiváltó okainak összefoglalása. Esettanulmányok segítségével ismertetjük az eltérések megoldására vonatkozó lehetőségeinket, beleértve a transzfuziológusok körében jelenleg még vitatott jelentőségű molekuláris genetikai módszereket is.

Módszerek

Vércsoport-szerológiai módszerek

A laboratóriumi ABO vércsoport-meghatározás a vérmintha vörösvérsejtjeinek felszínén levő ABO antigéntulajdonság, valamint a szérumban lévő reguláris anti-A- és

anti-B-ellenanyagok párhuzamos meghatározásán alapul („kettős ellenőrzés”) [5]. Hemagglutinációs technikára jellemző, hogy a vizsgálat erőssége/minősége a vizsgálati technikától, a vizsgálatához használt ellenanyag- és vörösvérsejt-szuszpenzió minőségétől függ, ezért a különböző módszerek és a módszerek során használt különböző reagensek vizsgálati eredményei eltérhetnek egymástól. ABO antigén („bal oldal”) meghatározásánál normál esetben alapvető elvárásunk az erős (4+ erősségű) reakció. Reguláris antitestek vizsgálatakor („jobb oldal”) a betegek anti-A és anti-B antitestjével megfigyelt reakció általában nem olyan erős, mint gyári anti-A és anti-B antitest és vörösvérsejt agglutinációja [5]. Az esetismertetések során lemezes és csöves technikához használt reagensek és tesztsejt: CE-Immundiagnostika (1. szett: A-mono-11H5-10, B-mono-6F9-10, AB-mono-5E10-10), Bio-Rad (2. szett: 801325, 801350, 801375), Medion (3. szett: 213506, 213507, 213509); ReaCell AB0 5–10% Reagents Kft. (42140). Oszlopagglutinációs technika használatakor BioRad (001324) gélkártyát és tesztsejteket (003619) alkalmaztunk.

Molekuláris genetikai vizsgálatok

Polimeráz láncreakció a variánsra vagy a normál allélra szekvensspecifikus primerekkel (PCR-SSP) történik.

1. ábra. 1. eset: gyengült ABO antigéntulajdonság csökkent reguláris antitesttiterrel (A panel: vércsoport-szerológiai vizsgálatok eredményei). A klinikai háttér ismerete miatt molekuláris genetikai vizsgálattal csak ABO főcsoport-meghatározás történt, viszont ABO alcsoport nem (B panel). bp = bázispár; km: kevert mezős reakció

ABO főcsoport-meghatározásnál a teszt az A², B, O¹, és O² vércsoport-tulajdonságot vizsgálja eldöntendő kérdések formájában. ABO alcsoportvizsgálathoz az általunk használt gyári kiték a leggyakrabban előforduló genetikai variánsokat (O02, Ax01, Ax02, Ax03, Ax04, Ax05, Ax06, B302, Ael01, Aw06, Aw07, Aw04, Aw11, Bw03, A301, Bx01, Bw09, O21, O51, O60, cisAB01, CisAB08, Bel04, B(A)01) keresik. A molekuláris genetikai vizsgálatokhoz perifériás vérből, fehérvérsejtből izolált DNS-t használunk. A módszer előnye, hogy a beteg genotípusát mutatja politranszfúzió esetén is. A vizsgálatot a transzfundált készítménnyel bejutott donor fehérvérsejt nem befolyásolja, mert a vérkészítmények fehérvérsejt-tartalma elenyésző. Az esetbemutatók során molekuláris genetikai vizsgálatokat az INNOTRAIN, RBC-Ready Gene ABO (001 010 012) és BAG, ABO-Type variant (6641) kittel végeztük.

Esetbemutató

1. eset: A 14 éves, medulloblastoma miatt autológ hematopoietikus őssejt-transzplantáción átesett, korábban A vércsoportú fiatal férfinál 46 hónappal a transzplantáció után akut mieloid leukémia (AML) alakult ki. Vércsoport-szerológiai vizsgálattal ekkor a vörösvérsejt felszínén A antigén nem volt kimutatható, széruma csak gyen-

ge anti-B antitestet tartalmazott (1. ábra). A beteg 3 hónapon belül vörösvérsejt-transzfúziót nem kapott. Molekuláris genetikai vizsgálattal a genotípus O¹A-nak (új nomenklátúra: ABO*O.01.01, *A1.01) bizonyult.

Az ABO antigének gyenge expresszója és az AML összefüggése már az 1950-es évektől, ismert jól dokumentált jelenség [19]. Akut mieloid leukémiában a betegek mintegy 17–37%-át érintheti [4, 20]. Az A és/vagy a B antigének elvesztése hematológiai rendellenességben szenvedő beteg esetében a leukémiás transzformáció vagy a relapszus előjele lehet [4, 19, 20]. Az A és B antigének expressziója a betegség progressziójával változhat, aktív leukémia esetén gyengül, remisszió idején pedig visszatér a normál vércsoportantigén, így egy egyszerű ABO vércsoport-meghatározás prognosztikus jelentőséggel is bírhat [19]. Immunhiányos állapotokban az antitestek szintje csökkenhet [5].

2. eset: A 32 éves férfinál transzfúziós és egyéb hematológiai/onkológiai előzmény nélkül fül-orr-gégészeti kisműtét előtt életében először került sor ABO vércsoport-meghatározásra. Az antigénvizsgálat nagyon gyenge A antigént mutatott ki a vörösvérsejt felszínén, a beteg széruma reguláris anti-B antitestet tartalmazott (2. ábra). A genotípus O¹A^{w30} (új nomenklátúra: ABO*O.01.01, *AW.30.01) (ABO-transzferáz c. 646T>A; p.Phe216Ile) volt.

2. ábra. 2. eset: gyengült ABO antigéntulajdonság, amely kevert mezős reakciót eredményez, irreguláris antitest jelenléte nélkül (A panel). A beteg alapbetegsége és korábbi transzfúziós anamnézise a vércsoport-szerológiai eltérést nem magyarázta, így molekuláris genetikai vizsgálattal mind ABO főcsoport-, mind ABO alcsoport-meghatározás is történt (B panel). bp = bázispár; km: kevert mezős reakció

3. ábra. 3. eset: gyengült ABO antigéntulajdonság irreguláris anti-A1-jelenléttel (A panel). Az egészséges donornál molekuláris genetikai vizsgálattal mind ABO főcsoport-, mind ABO alcsoport-meghatározás is történt (B panel). bp = bázispár; km: kevert mezős reakció

3. eset: A 43 éves nő, véradásra jelentkezett, transzfúziós és egyéb hematológiai/onkológiai előzmény nélkül. A vörösvérsejtek felszínén nagyon gyenge A antigén volt kimutatható, míg széruma anti-B antitestet és nyomokban anti-A1 antitestet tartalmazott (3. ábra). A genotípusa O^1A^{w04} vagy O^1A^{w11} (új nomenklátúra: $ABO^*O.01.01$, $*AW.04$ vagy $ABO^*O.01.01$, $*AW.11$) volt (A kit az ABO-transzferáz c.721C>T; p.Arg241Trp-t azonosítja, amely mind az ABO^*AW04 -ben, mind az ABO^*AW11 -ben előfordul).

Az A_w fenotípusú vörösvérsejtek nem reagálnak, vagy gyenge agglutinációt mutatnak az A antigén kimutatására szolgáló különböző gyári reagensekkel. Irodalmi adatok szerint az A_w fenotípusú egyének immunizálódhatnak, irreguláris anti- A_1 jelenhet meg az egyének szérumában, de ez nem azonos a reguláris anti-A-val [4]. A reguláris anti-B melletti anti- A_1 -termelés veszélyes, mert a vércsoport tévesen 0-s vércsoportúnak határozható meg. Hiányzó A és B antigén mellett, reguláris antitestvizsgálat esetében A1 és B tesztseltekkel észlelt agglutináció nem elegendő a 0-s vércsoport kijelentésére. Ez a jelenség donor vizsgálatok esetében kritikus jelentőséggel bír [5, 21].

Megbeszélés

A vércsoport-szerológiai eltérések típusai

Egy nemrégiben megjelent, nagy mintaszámot feldolgozó, retrospektív vizsgálatsorozat alapján a Landsteiner-szabálytól eltérő ABO vércsoport-meghatározások várható gyakorisága 0,1% (138/135853) betegek és 0,02% (14/62080) donorok között [21]. Ellentmondásos ABO vércsoportvizsgálati eredmény esetén a technikai hiba kizárása után a laboratóriumi ABO meghatározást ismételni kell monoklonális reagensekkel, érzékenyebb módszerekkel (inkubációs idő, reakcióidő vagy reakcióközeg, antigén-antitest egyensúly megváltoztatásával) vagy enzimkezelt vörösvérsejtek alkalmazásával. Speciális esetekben nyál szekréciós vagy adszorpciós-elúciós vizsgálat is elvégezhető [5]. A vörösvérsejtantigén- és antitestvizsgálat esetében tapasztalt eltérések egyszerűen kategorizálhatók, megoldásuk vércsoport-szerológiai módszerekkel a probléma típusától függ (4. ábra) [5, 21, 22].

I. típus: Hiányzó, gyenge, vagy kevert mezős agglutináció vörösvérsejt ABO antigénvizsgálatok esetén a hiányzó vagy gyenge A és B antigén reakciók hátterében legtöbbször klinikai okok állnak. Ezt mutatja be az 1. eset

	Eltérések vörösvérsejt ABO antigénvizsgálatok esetén		Eltérések ABO antitestvizsgálatok esetén	
	I. típus	II. típus	III. típus	IV. típus
	Hiányzó vagy gyenge agglutináció, kevert mezős reakció	Nem várt pluszreakció	Hiányzó vagy gyenge agglutináció	Nem várt pluszreakció
Eltérést kiváltó klinikai okok	<ul style="list-style-type: none"> • Malignus hematológiai betegségek • Nem ABO-azonos vörösvérsejt-transzfúzió • Nem ABO-azonos összejt-transzplantáció • Örökletes ABO alcsoport-tulajdonság • Mikrokimérizmus 	<ul style="list-style-type: none"> • Nem ABO-azonos vörösvérsejt-transzfúzió • Nem ABO-azonos összejt-transzplantáció • Autoimmunmegbetegedések • Fertőzés • Daganatos megbetegedések 	<ul style="list-style-type: none"> • Életkor (újszülött, időskor) • Nem ABO összejt-transzplantáció • Immunhiányos állapot • Nem ABO-azonos plazma-transzfúzió • Közvetlenül ABO-inkompatibilis vörösvérsejt-transzfúzió után • ABO alcsoport-tulajdonság (hiányzó ABO antigén mellett) 	<ul style="list-style-type: none"> • Terhesség • Fertőzések • Hematológiai betegségek • Autoimmunmegbetegedések • ABO alcsoport-tulajdonság (hiányzó ABO antigén mellett)
Kiegészítő szerológiai vizsgálatok	<ul style="list-style-type: none"> • Ismétlés fiziológias sóoldattal mosott vörösvérsejtből készült szuszpenzióval • Ismétlés érzékenyebb módszerrel • Enzimkezelt vörösvérsejt-suszpenzió alkalmazása • Nyálszekréciós vizsgálat • Adsorpciós-elúciós vizsgálat 	<ul style="list-style-type: none"> • Ismétlés fiziológias sóoldattal mosott vörösvérsejtből készült szuszpenzióval • Előmelegített minta használata 	<ul style="list-style-type: none"> • Ismétlés érzékenyebb módszerrel • Enzimkezelt tesztsejtek alkalmazása 	<ul style="list-style-type: none"> • Antitest azonosítása • Célantigén-negatív tesztsejt használatával • Enzimkezelt tesztsejtek alkalmazása • Inkubálás 37°C-on • Fiziológias sóoldat hozzáadása • A vörösvérsejt A1 vizsgálata
Molekuláris genetikai vizsgálatok	Amennyiben a kiegészítő vércsoport-szerológiai vizsgálatok alátámasztják az ABO vércsoporteltérést			
	ABO alcsoport-meghatározás	ABO főcsoport-meghatározás	ABO alcsoportmeghatározás	
	ABO alcsoport?	Szerzett antigén?	1. típussal együtt jelentkezve ABO alcsoport?	

4. ábra. Landsteiner-szabálytól eltérő ABO vércsoport-szerológiai eredmények klinikai okai és kivizsgálási lehetőségei. A gyakran előforduló klinikai okok és a kötelezően elvégzendő kiegészítő vércsoport-szerológiai vizsgálatok vastag betűvel kiemelve

(1. ábra). Malignus hematológiai betegségek esetén jelentkező antigényengülést elsőként akut mieloid leukémiában figyelték meg [4, 19, 20]. A molekuláris genetikai vizsgálatok mellett a nyálból végzett oldott csoportantigén-meghatározás is igazolhatja az eredeti ABO vércsoportot, mert az akut leukémia okozta változás a szolubilis antigéneket nem érinti (a vizsgálat azonban csak szekrétor egyéneknél végezhető el) [4]. Kevert mezős vizsgálati eredményt gyakran akkor tapasztalunk, ha többféle antigéntulajdonságú vörösvérsejt-populáció egyidejűleg van jelen a keringésben. Leggyakrabban nem ABO-azonos vörösvérsejt-transzfúzió vagy összejt-transzplantáció következtében fordul elő [23]. Igen ritkán mikrokimérizmus alakulhat ki ikerterhességek következtében is [24, 25].

Klinikai háttérokok hiányában felmerül az örökletes ABO-alcsoport-tulajdonság lehetősége. Az A alcsoportok elkülönítése anti-A₁ és anti-H reagenssel adott reakció alapján lehetséges (2. táblázat). Az A alcsoportok esetében előfordulhat irreguláris anti-A₁-termelés, így a reguláris antitest vizsgálatok nem várt plusz reakció jelentkeznek (3. ábra, 3. eset). A B antigén esetében is ritkán, de előfordulnak a megszokottól gyengébben reagáló variáns tulajdonságú vörösvérsejtek [26]. Megjegyzendő, hogy egyes ABO-variáns jelenlétében olyan enzim termelődhet, amely mind az A-t, mind a B antigént szintetizálhatja

(például az úgynevezett cisAB vagy B(A) fenotípusok esetében) [4]. Kevert mezős reakció esetén is felmerülhet az ABO-alcsoport lehetősége (2. eset). Első alkalommal 1975-ben Marsh és munkatársai azonosítottak egy családot mozaik A₂ és O-s sejtpopulációval, ún. A_{mos} vércsoport-fenotípussal. Az A_{mos} családokon kívül B_{mos}, A₁B_{mos}, A_{mos}B fenotípusokat is azonosítottak [4].

Klinikai magyarázat hiányában, különösen donorok esetében molekuláris genetikai vizsgálat indokolt (ABO alcsoportvizsgálat). A nagy mintaszámot feldolgozó, retrospektív vizsgálatsorozat keretében a diszkrepanciák hátterében a betegek esetében 12,3%, míg a donoroknál 29%-ban azonosítottak gyenge antigéntulajdonságot [21].

II. típus: A vörösvérsejt ABO antigénvizsgálatnál jelentkező nem várt pluszreakció okai lehetnek nem ABO-azonos vörösvérsejt-transzfúzió vagy összejt-transzplantáció mellett a pénztekercsképződés, a szerzett antigének és az autoantitestek is [4, 5, 21]. A szerzett antigénjelenység tisztázására alkalmas lehet az ABO főcsoportokra irányuló molekuláris genetikai vizsgálat.

III. típus: A reguláris antitestvizsgálat kapcsán jelentkező hiányzó vagy gyenge agglutináció az antitest mennyiségi csökkenését jelzi. A reguláris antitestek 3–6 hónapos korig előzetes idegen vörösvérsejt-expozíció nélkül

2. táblázat. ABO alcsoportok vércsoport-szerológiai jellemzői [4], valamint az ABO alcsoport fenotípusáért felelős genetikai variánsok száma és összesített allélfrekvenciája. A genetikai változások száma az ISBT 2017 [18] és az ErythroGene 2018 [7] adatbázisok alapján készült (a jövőben az azonosított variánsok száma emelkedhet). Az allélfrekvencia-adatok egyes populációkban a feltüntetettől eltérhetnek [7, 28]

Fenotípus	ABO vércsoportszerológiai vizsgálatok										Antigén előfordulása nyálban szekrétorok esetében	Genetikai változások száma	Allélfrekvencia (Európa)
	Vörösvérsejtek antigénvizsgálatai					Szérumantitest vizsgálata							
	anti-A	anti-B	anti-AB	anti-A1	anti-H	A1	A2	B	O				
A2	pozitív/gyengén pozitív	negatív	pozitív/gyengén pozitív	negatív	pozitív	néha pozitív	negatív	pozitív	negatív	A és H	18	6,9–9,5%	
A3	kevert mezős reakció	negatív	kevert mezős reakció	kevert mezős reakció	pozitív	néha pozitív	negatív	pozitív	negatív	A és H	7	0,46%	
Am	negatív*/gyengén pozitív	negatív	negatív/gyengén pozitív	negatív	pozitív	negatív	negatív	pozitív	negatív	A és H	2	nincs adat	
Ael	negatív*	negatív	negatív	pozitív	pozitív	néha pozitív	negatív/néha pozitív	pozitív	negatív	H	8	0,02%	
Aw	negatív*/gyengén pozitív**/kevert mezős reakció	negatív	negatív/gyengén pozitív/kevert mezős reakció	pozitív/kevert mezős reakció/negatív	pozitív	gyengén pozitív/negatív	negatív	pozitív	negatív	A és/vagy H	47	0,10–1,49%	
B3	negatív	kevert mezős reakció	kevert mezős reakció	–	pozitív	pozitív	pozitív	negatív	negatív	B és H	8	0,00%	
Bel	negatív	negatív	negatív	–	pozitív	pozitív	pozitív	néha pozitív	negatív	H	5	0,01%	
Bw	negatív	negatív/gyengén pozitív	negatív/gyengén pozitív	–	pozitív	pozitív	pozitív	néha pozitív/nem	negatív	B és/vagy H	33	0,00–0,10%	
B(A)	nagyon gyengén pozitív**	pozitív	nagyon gyengén pozitív**	–	pozitív	pozitív	pozitív	negatív	negatív	A és/vagy B és/vagy H	6	0,00%	
cisAB	gyengén pozitív****	gyengén pozitív****	gyengén pozitív****	pozitív/kevert mezős reakció/negatív	pozitív	gyengén pozitív/negatív****	gyengén pozitív/negatív****	gyengén pozitív/negatív****	negatív	A, H és kevés B	6	nincs adat	

* anti-A adszorbeálódhat a vörösvérsejtekre és elújlható; ** nagyon erős monoklonális anti-A reagensekkel, amelyek képesek Ax agglutinálására; *** monoklonális anti-B (BS 85) reagenssel; **** változatos kép, családonként más, de a családra jellemző

jelennek meg a szérumban, az antitest mennyisége az életkorral változik, pubertás korig nő, ezt követően pedig csökken. Előfordulhat olyan mértékű csökkenés, hogy hagyományos vércsoport-szerológiai módszerekkel az antitestek nem kimutathatók. Az antitest mennyisége más nem specifikus antigén ingerek (fertőzések, terhesség, aktív immunizáció) hatására is mutathat változást [3]. Nem ABO-azonos plazmatranszfúzió vagy nem ABO-azonos összejt-transzplantáció esetén gyenge vagy hiányzó reguláris antitesteket tapasztalhatunk [3, 23]. ABO-inkompatibilis vörösvérsejt-transzfúziót követően az antitestek szintje először hirtelen lecsökken, majd jelentősen megemelkedik [3]. Abban az esetben, ha a hiányzó antitest mellett az antigén is hiányzik, és klinikai okok nem magyarázzák az eltérést, akkor felmerül az ABO alcsoport lehetősége és molekuláris genetikai vizsgálat javasolt (*ABO alcsoportvizsgálat*).

IV. típus: A reguláris antitest vizsgálatok nem várt pluszreakciót eredményezhetnek betegséggel összefüggő állapotok, mint például: autoantitestek (autoimmun betegségek); alloantitestek (terhesség, fertőzések), szérumfehérjék felszaporodása, poliaagglutináció, szimpexis (egyes hematológiai betegségek) [5, 21]. Ezekre a lehetőségekre az autokontroll pozitívítása is felhívhatja a figyelmet. Többletreakciók megjelenésénél pedig az azonosított irreguláris antitest szerológiai viselkedésének ismeretében tudjuk a módszereinket vagy a tesztsejtek tulajdonságait megváltoztatni az ABO vércsoport tisztázásához [21]. Egyes alcsoport-tulajdonságok esetén immunizációs eseményt követően a betegek anti-A1, ritkán anti-B termelésére képesek (lásd: I. típusnál részleteztük), ebben az esetben molekuláris genetikai vizsgálat javasolt (*ABO alcsoportvizsgálat*).

A molekuláris genetikai technikák által kínált lehetőségek

A vércsoport-szerológiai módszerek kiegészítésére több molekuláris genetikai módszert is kifejlesztettek az ABO glikoziltranszferázok genetikai variációi vizsgálatára, ilyenek például a restrikciós fragmenshossz-polimorfizmus (RFLP), a szekvenciaspecifikus primer (SSP) PCR, az egyszálú konformációs polimorfizmus- (SSCP-) analízis, illetve a DNS microarray hibridizáció. A legtöbb molekuláris tipizálási módszer az ABO gén katalitikus doménjét kódoló, 6. és 7. exont vizsgálja, amely a kódoló szekvencia többségét (77%-át) foglalja magában [4, 25, 27, 28]. A célzott molekuláris genetikai tesztek csak a leggyakoribb genetikai variánsokat vizsgálják. Bár ezekkel a módszerekkel az új, ritka allélok azonosítása nem lehetséges, mégis általában elegendőek a legtöbb ellentmondó vércsoport-szerológiai eredmény hátterének a felderítésére [25, 28]. A bemutatott eseteinkben alkalmazott molekuláris genetikai módszer a rutinlaboratóriumokban széles körben alkalmazott PCR-SSP technikák közé tartozik. A vizsgálat értékelésénél fontos megjegyezni, amennyiben azonosí-

tunk a vizsgált betegnél az ABO fenotípusváltozást eredményező variánst, úgy a molekuláris teszt alátámasztja az örökletes variáns tényét, de negatív PCR-SSP eredmény esetén a ritka variáns lehetőségét kizárni nem tudjuk.

A teljes ABO glikozil transzferáz DNS-szekvencia meghatározása lehet a megoldás a pontosabb genotipizálási eredmények eléréséhez. Az új generációs szekvenálás (NGS) képes lesz orvosolni a jelenleg alkalmazott módszerek korlátait, egyre olcsóbb és általánosan is elérhető lesz [25]. Számos tanulmány tárgyalta, hogy az NGS az ABO genotípus meghatározására is megfelelő módszer [6, 7, 25, 28–34], azonban a rutin transzfuziológiai gyakorlatban még nem alkalmazzák. Az NGS-t a vércsoport-szerológiai ellentmondások tisztázására alkalmazta Wu és munkatársai: 24 szerológiai ellentmondó esetből 22-ben sikeresen azonosították a genetikai hátteret (17 korábban ismert és 2 újonnan leírt ABO allél, 1 eset mikrokimerizmus, 2 eset feltehetően nem genetikai eltérés) [25]. Az NGS nagy mintaszámú vizsgálatok kivitelezését is lehetővé teszi. Az Erythrogene az első adatbázis, amely 36 vércsoportrendszer NGS-en alapuló információinak feldolgozását és kategorizálását végezte, ezért globálisan hosszú távú platformot jelenthet a jövőbeli kutatások számára [6, 7]. A legtöbb ritka variánsról korábban csak vércsoport-szerológiai adatok álltak rendelkezésünkre, de 11 000, főként német egyén új generációs szekvenálással történő ABO genotípus elemzésével pontos adatokat kaphattunk egyes ritka ABO allélok gyakoriságáról is (2. táblázat) [28].

Az NGS technika által biztosított nemzetközi adatbázisok elérhetősége megfordíthatja a transzfuziológiai kutatások menetét. Eddig a vércsoport-szerológiai módszerekkel azonosított fenotípuseltérések alapján lehetett egyes variánsok gyakoriságára következtetni, illetve a fenotípusból kiinduló kutatások vezettek a genotípusok azonosítására. Hasonló alapokon nyugodott az ISBT katalógus [7, 18]. Jelenleg az adatbázisokból egyes genetikai variánsok gyakoriságára közvetlen adatokat nyerhetünk. Új fenotípuseltérést eredményező variánsokat azonosíthatunk a genetikai adatbázisokból [7]. Az Erythrogene adatbázis 43 vércsoportgén 1241 aminosavcserével járó variánsát azonosította, ezek közül csupán 241 volt ismert vércsoportantigén. A fennmaradó 1000 variáns közül 357 aminosavcsere a fehérje extracelluláris részét érinti, így elképzelhető, hogy további, korábban még nem azonosított vércsoportantigének azonosíthatók [7]. Hult és munkatársai az Erythrogene adatbázis segítségével 1108 svéd donor vizsgálat során először írtak le egy homozigótamutációt a FORS1 antigén expressziójáért felelős GBGT1 génben, ami korai stop kodont eredményez [35]. Ez a mechanizmus nagyban hasonlít a O-s vércsoportot meghatározó leggyakoribb c.261.delG-mutációhoz.

Az ABO vércsoport esetében az Erythrogene adatbázisban azonosítottak egy új O allélt, amely becsléseik szerint a harmadik leggyakoribb mechanizmus a O allélok hátterében (5–7 exont érintő 5821bp deléción; *ABO*O.16*, amely főleg afrikai egyéneknél fordul elő), valamint két

allél további változatát, az egyik az $ABO^*O.01.01$ c.190G>A ($ABO^*O.01.82$), a másik $ABO^*O.01.05$ c.106G>T és c.188G>A ($ABO^*O.01.83$) variáns [6]. Ugyanez a cikk felhívja a figyelmet arra is, hogy a genetikai adatbázisok adatait mindig validálni kell.

Az ABO alcsoportok háttérében álló genetikai variánsok

Az ABO a legintenzívebben és legalaposabban tanulmányozott vércsoportrendszer, 2016-ig mintegy 367 ABO allélt azonosítottak, és közel 100 új allélt írtak le az elmúlt 10 évben [28], és ez a tendencia hasonló ütemben folytatódik napjainkban. Az ABO alcsoportok vércsoport-szerológiai előfordulási gyakoriságára vonatkozó adataink nem megbízhatóak, mivel a vércsoportvariánsok nyilvánvalóan O allél, vagy az ellenkező vércsoportallél mellett (például abnormális A fenotípus O vagy B allél mellett, nem pedig A_1 vagy A_2 mellett) jelenik meg.

A legtöbb gyenge ABO alcsoport egy ritka allél öröklődéséből származik az ABO lókuszból (főleg a 6–7 exon), amely rendszerint aminosavcserével járó mutációkat, esetleg inszerciákat vagy deléciókat tartalmaz a kódoló régióban, de néhány molekuláris mechanizmus máig nem tisztázott [6, 7, 27, 28]. Ezek a genetikai változások megváltoztatják a kódolt enzim aktivitását vagy specificitását, így a vörösvérsejt felszínén a klasszikus A és B vércsoporttól eltérő mennyiségben és minőségben jelenik meg az A és/vagy a B antigén, a H antigén egyidejű megmaradása mellett [4, 25].

A genetikai háttér pontos felderítése a ABO alcsoportnevezéktan egységesítését is eredményezte. Az új nomenklátúra az alcsoportok csoportosításánál A alcsoport esetén: A_2 , A_3 , A_m , A_{el} és A_w altípusokat és B alcsoport esetén B_3 , B_{el} , B_w altípusokat különített el (2. táblázat). Több korábban külön A alcsoport (pl. A_x , A_{finn} vagy A_{bantu}) az A_w osztályba került besorolásra, így jelenleg az A_w a genetikailag legheterogénebb A alcsoport. Az ISBT legutolsó állásfoglalása szerint 47 genetikai változat határozható meg A_w fenotípust [18].

A vércsoport-szerológiai módszerekkel végzett antigénvizsgálatok során az ABO alcsoportok gyenge vagy nem reagáló, esetleg kevert mezős (I. típus: A_m , A_{el} , A_w , A_3 , B_{el} , B_w , A_w , B_3) eredményeket mutathatnak. Antigénvizsgálatban nem reagáló variánsokra a hiányzó antigén mellől hiányzó vagy gyenge antitest hívja fel a figyelmet (III. típus: A_{el} , A_w , B_{el} , B_w , cisAB).

Klinikai jelentőség és Landsteiner-szabályeltérés esetén javasolt kivizsgálási algoritmus

A vércsoport-szerológiai módszerekkel kimutatott ABO-diszkrpanciák előfordulási gyakorisága nagymértékben függ a vizsgált populáció etnikai összetételétől, korától, általános állapotától, betegek esetében a kivizsgáló laboratórium ellátási területén előforduló kórházak és rendelőintézetek profiljától, valamint a laboratóriumban alkalmazott vizsgálati módszerektől.

Egyes tanulmányok szerint az ABO-inkompatibilis vértranszfúziójának veszélye $10\times$ vagy $100\times$ nagyobb, mint a transzfúzióval történő fertőzésátvitel kockázata [21, 36, 37]. Az évente megjelenő Serious Hazards of Transfusion (SHOT) riport szerint az Egyesült Királyságban 2016 és 2018 között 8 utólag felismert ABO-inkompatibilis vörösvérsejt-transzfúziót, valamint 907 időben felismert, potenciálisan ABO-inkompatibilis transzfúzióhoz vezető hibát tártak fel évi mintegy 1,9 millió transzfúzió mellett [38]. A transzfúziók kockázatának csökkentéséhez tehát elengedhetetlen az ABO státusz pontos meghatározása, de más a stratégia a donor- és a betegvizsgálatok szintjén. Míg a Landsteiner-szabálynak ellentmondó vércsoport-szerológiai eredménnyel rendelkező recipiensek O-s vércsoportú vörösvérsejt-készítménnyel biztonságosan transzfundálhatók, addig donorok esetén az ABO alcsoportba tartozó vércsoportvariánsok fel nem ismerése transzfúziós reakciókat okozhat [21, 25, 26]. Az alapbetegséggel nem magyarázható antigénvesztés/-gyengülés, váratlan antigén megjelenése, illetve hiányzó antigén mellett hiányzó reguláris vagy váratlanul megjelenő irreguláris antitest esetén, amennyiben az eltérés vércsoport-szerológiai módszerekkel nem tisztázható, molekuláris genetikai módszerekkel történő vizsgálat javasolt.

A vércsoport-szerológia továbbra is a transzfuziológia alapmódszere marad az ABO vércsoport-meghatározás vonatkozásában, de a molekuláris genetika a klasszikus vércsoport-szerológiai vizsgálatok felbecsülhetetlen kiegészítése. A molekuláris genetikai tesztek széles körű elterjedése új megoldásokat ad a transzfúzió problémáira, azonban az antigénváltozatok hatékonyabb kimutatása biztosan újabb kihívásokat is jelent majd transzfúziós és transzplantációs szempontból az antigénmegfeleltetés számára.

Nyilatkozat: A közlemény beküldésre nem került, más folyóiratban még nem jelent meg. A levelező szerző a szerzői útmutatót megismerte, elolvasta.

Érdeklőségek: A szerzőknek nincsenek érdeklőségeik.

Anyagi támogatás: A közlemény az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (A. H.: BO/00579/17/5, B. A.: BO/00809/18/8) és az Emberi Erőforrások Minisztériuma (AH) ÚNKP-18-4-SE-11 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

Szerzői munkamegosztás: V.L., A.H. – adatgyűjtés, vércsoport-szerológiai és molekuláris genetikai vizsgálatok végzése, eredmények értékelése, kézirat megírása; N.N.Zs., M.K.A., J.J., Zs.S.I. – vércsoport-szerológiai vizsgálatok értékelése; Sz.A., V.Zs., B.A., T.A. – molekuláris genetikai vizsgálati eredmények értékelése. A kéziratot valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Irodalom

- [1] Stenfelt L, Hellberg A, Moller M, et al. Missense mutations in the C-terminal portion of the B4GALNT2-encoded glycosyltrans-

- ferase underlying the Sd(a-) phenotype. *Biochem Biophys Rep.* 2019; 19: 100659.
- [2] Omae Y, Ito S, Takeuchi M, et al. Integrative genome analysis identified the KANNO blood group antigen as prion protein. *Transfusion* 2019; 59: 2429–2435.
 - [3] Klein HG, Anstee DJ. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 12th edition. John Wiley & Sons. Ltd. 2014; 4: 118–166.
 - [4] Daniels G. *Human Blood Groups* 3rd edition. Blackwell Publishing Ltd. 2013; 3: 11–95.
 - [5] Meny GM. Recognizing and resolving ABO discrepancies. *Immunohematology* 2017; 33: 76–81.
 - [6] Moller M, Hellberg A, Olsson ML. Thorough analysis of unorthodox ABO deletions called by the 1000 Genomes project. *Vox Sang.* 2018; 113: 185–197.
 - [7] Moller M, Joud M, Storry JR, et al. ErythroGene: a database for in-depth analysis of the extensive variation in 36 blood group systems in the 1000 Genomes Project. *Blood Adv.* 2016; 1: 240–249.
 - [8] Diaio JA, Kohane IS, Manrai AK. Biomedical informatics and machine learning for clinical genomics. *Hum Mol Genet.* 2018; 27: 29–34.
 - [9] Haeussler M, Zweig AS, Tyner C, et al. The UCSC Genome Browser database: 2019 update. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47: 853–858.
 - [10] Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B, et al. The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45: 840–845.
 - [11] Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016; 536: 285–291.
 - [12] Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487: 330–337.
 - [13] Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490: 61–70.
 - [14] Tomczak K, Czerwinski P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol.* 2015; 19: 68–77.
 - [15] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339: 1546–1558.
 - [16] Patnaik SK, Helmberg W, Blumenfeld OO. BGMUT: NCBI dbRBC database of allelic variations of genes encoding antigens of blood group systems. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 1023–1029.
 - [17] Patnaik SK, Helmberg W, Blumenfeld OO. BGMUT database of allelic variants of genes encoding human blood group antigens. *Transfus Med Hemother.* 2014; 41: 346–351.
 - [18] Names for ABO (ISBT 001) Blood Group Alleles. International Society of Blood Transfusion (ISBT). Blood Group Allele Terminology. Available at: <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>. [accessed 23 October 2017].
 - [19] Zhang W, Liu J, Zhang W, et al. The potential association of the transcription levels of the ABO gene with the disease phases in AML patients. *Transfus Apher Sci.* 2017; 56: 719–722.
 - [20] Vezendi K. *Transfusion*. [Transzfúzió.] Medicina könyvkiadó, Budapest, 2014; pp. 33–93. [Hungarian]
 - [21] Makroo RN, Kakkar B, Agrawal S, et al. Retrospective analysis of forward and reverse ABO typing discrepancies among patients and blood donors in a tertiary care hospital. *Transfus Med.* 2019; 29: 103–109.
 - [22] Yudin J, Heddle NM. A 13-question approach to resolving serological discrepancies in the transfusion medicine laboratory. *Lab Med.* 2014; 45: 193–206.
 - [23] Akkoc CA, Seghatchian J. Immunohematologic issues in ABO-incompatible allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci.* 2018; 57: 812–815.
 - [24] Sharpe C, Lane D, Cote J, et al. Mixed field reactions in ABO and Rh typing chimerism likely resulting from twin haematopoiesis. *Blood Transfus.* 2014; 12: 608–610.
 - [25] Wu PC, Lin YH, Tsai LF, et al. ABO genotyping with next-generation sequencing to resolve heterogeneity in donors with serology discrepancies. *Transfusion* 2018; 58: 2232–2242.
 - [26] Chaurasia R, Rout D, Dogra K, et al. Discrepancy in Blood Grouping: Subgroups of B-Challenges and Dilemma. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2017; 33: 628–629.
 - [27] Huang H, Jin S, Liu X et al. Molecular genetic analysis of weak ABO subgroups in the Chinese population reveals ten novel ABO subgroup alleles. *Blood Transfus.* 2018; 1–6.
 - [28] Lang K, Wagner I, Schone B et al. ABO allele-level frequency estimation based on population-scale genotyping by next generation sequencing. *BMC Genomics* 2016; 17: 374.
 - [29] Cai X, Jin S, Liu X et al. Molecular genetic analysis of ABO blood group variations reveals 29 novel ABO subgroup alleles. *Transfusion* 2013; 53: 2910–2916.
 - [30] Fichou Y, Audrezet MP, Gueguen P, et al. Next-generation sequencing is a credible strategy for blood group genotyping. *Br J Haematol.* 2014; 167: 554–562.
 - [31] Hyland CA, Roulis EV, Schoeman EM. Developments beyond blood group serology in the genomics era. *Br J Haematol.* 2019; 184: 897–911.
 - [32] Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016; 536: 285–291.
 - [33] Montemayor-Garcia C, Karagianni P, Stiles DA et al. Genomic coordinates and continental distribution of 120 blood group variants reported by the 1000 Genomes Project. *Transfusion* 2018; 58: 2693–2704.
 - [34] Tilley L, Grimsley S. Is Next Generation Sequencing the future of blood group testing? *Transfus Apher Sci.* 2014; 50: 183–188.
 - [35] Hult AK, McSherry E, Moller M, et al. GBGT1 is allelically diverse but dispensable in humans and naturally occurring anti-FORS1 shows an ABO-restricted pattern. *Transfusion* 2018; 58: 2036–2045.
 - [36] Sharma T, Garg N, Singh B. ABO blood group discrepancies among blood donors in Regional Blood Transfusion Centre GTB Hospital, Delhi, India. *Transfus Apher Sci.* 2014; 50: 75–80.
 - [37] Chiaroni J, Legrand D, Dettori I, et al. Analysis of ABO discrepancies occurring in 35 French hospitals. *Transfusion* 2004; 44: 860–864.
 - [38] Narayan S, Bellamy M, Spinks C, et al. The 2018 Annual SHOT Report 2019; 3: 11–18.

A cikk a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) feltételei szerint publikált Open Access közlemény, melynek szellemében a cikk bármilyen médiumban szabadon felhasználható, megosztható és újraközölhető, feltéve, hogy az eredeti szerző és a közlés helye, illetve a CC License linkje és az esetlegesen végrehajtott módosítások feltüntetésre kerülnek. (SID_1)