

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biologických a lékařských věd

# OSTATNÍ KREVNĚSKUPINOVÉ SYSTEMY

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Vít Řeháček

Hradec Králové 2010

Helena Košťálková

## 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.“

V Hradci Králové.....

.....

Podpis

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu primáři MUDr. Vítu Řeháčkovi a MUDr. Martinovi Písačkovi za cenné rady a připomínky při vedení mé bakalářské práce. Zároveň děkuji své rodině a přátelům za jejich trpělivost a podporu.

## OBSAH

1. Úvod.....	7
2. Systém MNSs (002) .....	9
2.1. Historie .....	9
2.2. MNSs antigeny .....	9
2.2.1. U fenotyp.....	9
2.3. Biochemie.....	10
2.4. Protilátky systému MNSs .....	11
3. P1 SYSTÉM (003).....	12
3.1. Historie .....	12
3.2. Antigeny.....	12
3.3. Biochemie.....	13
3.4. Protilátky P systému .....	13
3.5. P antigen – Receptor pro bakterie a viry .....	14
4. LUTHERAN SYSTÉM (005) .....	14
4.1. Historie .....	14
4.2. Antigeny Lu <sup>a</sup> a Lu <sup>b</sup> .....	14
4.2.1. Lutheran-null fenotyp (Lu <sub>null</sub> ) .....	15
4.3. Biochemie Lutheran antigenů .....	16
4.4. Protilátky systému Lutheran.....	17
4.4.1. Klinický význam protilátek anti-Lu <sup>a</sup> a anti-Lu <sup>b</sup> .....	17
5. Systémy Kell a Kx (006+019) .....	18
5.1. Úvod .....	18
5.2. Kell glykoprotein .....	18
5.3. Antigeny systému Kell.....	18
5.3.1. Antigen Kx.....	20
5.3.2. K <sub>0</sub> fenotyp.....	20
5.4. Mc Leod syndrom, Mc Leod fenotyp a Kx (XK1) antigen.....	20
5.5. Kell protilátky .....	21
5.5. Sérologické charakteristiky senzibilizace anti-K a anti-k.....	22
6. LEWIS SYSTÉM (007) .....	22
6.1. Úvod .....	22
6.2. Lewis antigeny .....	23
6.3. Sekretorství.....	23
6.4. Biochemie a syntéza.....	24

## Ostatní krevněskupinové systémy

6.5. Protilátky systému Lewis.....	24
7. DUFFY SYSTÉM (008) .....	26
7.1. Historie .....	26
7.2. Duffy systém.....	26
Duffy systém je polymorfní krevněskupinový systém, který je definován 6 znaky.....	26
7.3. Duffy glykoprotein, receptor pro chemokiny .....	27
7.4. Protilátky systému DUFFY .....	28
7.5. Duffy systém a onemocnění malárie .....	28
8. KIDD systém (009) .....	29
8.1. Historie .....	29
8.2. Antigeny systému Kidd .....	29
8.3. Kidd glykoprotein a nosič močoviny .....	30
8.4. Protilátky systému Kidd.....	31
9. DIEGO SYSTÉM (010).....	32
9.1. Úvod .....	32
9.2. Band 3, erytrocytární anion měnič.....	32
10. PRAKTICKÁ ČÁST .....	34
10.1. PRINCIPY METOD .....	34
10.1.1 Capture metoda.....	34
10.1.2. Princip metody gelového systému DIANA .....	36
10.2. Frekvence záchytu protilátek na transfuzním oddělení ÚVN Střešovice.....	37
11. DISKUSE .....	39
12. ZÁVĚR.....	41
13. SEZNAM LITERATURY .....	42

## **CÍL PRÁCE**

Cílem této práce je:

- podrobněji se seznámit s jednotlivými antigeny krevních skupin (kromě ABO a Rh systému),
- popsat biochemickou strukturu jednotlivých antigenů,
- ukázat na nebezpečí některých protilátek a naopak zmírnit obavy z nich ve vztahu proti erytrocytárním antigenům,
- poukázat na další funkce erytrocytárních antigenů.

## 1. Úvod

Krevní skupiny byly objeveny na začátku 20. století rakouským lékařem a badatelem Karlem Landsteinerem, který zaznamenal tzv. „aglutinaci“ erytrocytů s plazmou. V roce 1945 Coombs, Mourant a Race vyvinuli tzv. antiglobulinový test detekující protilátky IgG. V roce 1947 byly zavedeny enzymové testy a v roce 1974 roztok o nízké iontové síle (LISS), které napomohly k objevení dalších skupinových systémů [2,9].

Od objevení prvních skupinových systémů až po současnost bylo prokázáno kolem 270 krevněskupinových antigenů. Každý skupinový systém se skládá z určitého počtu antigenů kódovaných jedním samostatným genem nebo více velmi těsně vázanými geny. Nomenklatura podle ISBT (International Society of Blood Transfusion) pro krevněskupinové systémy je rozdělena do 26 skupinových systémů. Každému systému byl přidělen číselný symbol, skládající se ze 3 číslic a z abecedních symbolů (viz tabulka 1) [2].

Tabulka 1: Krevněskupinové systémy ISBT nomenklatura [7]

KS	ISBT označení	Symbol konvenční	Systém symbol ISBT	Chromozomální lokace
ABO	001	ABO	ABO	9q34.1-q34.2
MN	002	MN	MNS	4q28-q31
P	003	P	P1	22q11.2-qter
Rh	004	Rh	RH	1p36.2-p34
Lutheran	005	Lu	LU	19q12-q13
Kell	006	K	KEL	7q33
Lewis	007	Le	LE	19p13.3
Duffy	008	Fy	FY	1q22-q23
Kidd	009	Jk	JK	18q11-q12
Diego	010	Di	DI	17q12-q21
Cartwright	011	Yt	YT	7q22
Xg	012	Xg	XG	Xp22.32
Scianna	013	Sc	SC	1p36.2-p22.1
Dombrock	014	Do	DO	12p13.2-p12.1
Colton	015	Co	CO	7q14
LW	016	LW	LW	19p13.2-cen
Chido/Rodgers	017	Ch/Rg	CH/RG	6p21.3
Hh	018	H	H	19q13
Kx	019	Kx	XK	Xp21.1
Gerbich	020	Ge	GE	2q14-q21
Cromer	021	Cromer	CROM	1q32
Knops	022	Kn	KN	1q32
Indian	023	In	IN	11p13



## 2. Systém MNSs (002)

### 2.1. Historie

První protilátky proti *M* a *N* erytrocytárním antigenům byly nalezeny u králíků, kteří byli naimunizováni lidskými erytrocyty. Jednalo se o cílený výzkum Landsteinerja a Levina v roce 1927, který měl odhalit další krevní skupiny. Během studie bylo zjištěno, že anti-*M* a anti-*N* protilátky se vyskytují relativně vzácně a obecně patří mezi protilátky nevýznamné.

### 2.2. MNSs antigeny

*M* a *N* jsou alely, které kódují 3 typy genotypů, *MM*, *MN* a *NN*, s frekvencí výskytu u bělošské populace kolem 28%, 50% a 22%. Odpovídající fenotypy se zapisují ve formě *M+N-*, *M+N+* a *M-N+*.

*S* a *s* jsou další pár antigenů systému MNSs. Dědičnost antigenů *S* a *s* je úzce spjatá s *M* a *N* antigeny. *Ss* lokus se nachází velice blízko lokusu pro antigeny *MN*. Antigen *S* se častěji objevuje společně s *MM* než s *NN* homozygotní formou antigenu [1].

Frekvence výskytu jednotlivých kombinací fenotypů systému MNSs je patrná z tabulky 2.

#### 2.2.1. U fenotyp

Antigen *U* byl pojmenován v roce 1953 *Wienerem a spol.* a patří mezi antigeny s vysokou frekvencí výskytu. Antigen *U* se nachází u všech jedinců bělošské populace a u 99% černošské populace. Jedinci, kteří jsou *U* negativní, jsou též vždy fenotypu *S-s-* [1,2].

*U* antigen se nachází na glykoforinu *B*. Antigen *U* je přítomen na erytrocytech jedinců, kteří jsou *S* pozitivní a/nebo *s* pozitivní. Avšak *U* antigen je rovněž přítomen na erytrocytech, u kterých chybí jak *S*, tak *s* antigen. [11]

Tabulka 2: Fenotypy MN a Ss [4]

Fenotyp	Výskyt	
	Bělošská populace	Černošská populace
M+N-	28%	25%
M+N+	50%	49%
M-N+	22%	26%
S+s-	11%	5,9%
S+s+	44%	24,5%
S-s+	45%	68,1%
S-s-	0%	1,5%

### 2.3. Biochemie

Antigeny systému MNSs se nacházejí na dvou glykoproteinech. M a N antigeny se nacházejí na glykoforinu A (GPA, MN glykoprotein). Antigeny S a s se nacházejí na glykoforinu B (GPB, Ss glykoprotein). Ss lokus se nachází velice blízko lokusu MN. V bělošské populaci je přibližně 55% S pozitivních jedinců a 89% s pozitivních jedinců.

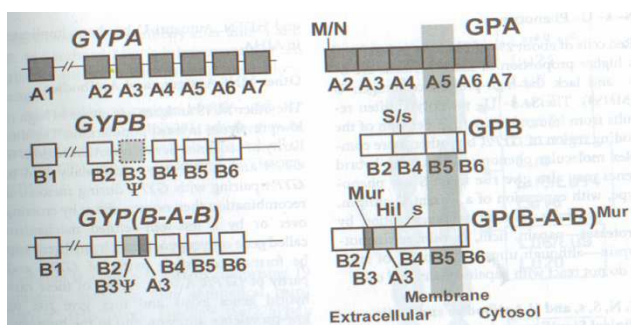
Jediný rozdíl mezi antigeny M a N je v ukončení jejich polypeptidického řetězce:

Aminokyselina: 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8

M typ: **Ser**-Ser-Thr-Thr-Gly-Val-Ala-Met...

N typ: **Leu**-Ser-Thr-Thr-Glu-Val-Ala-Met...

Rozdíl mezi antigenem S a antigen s je v nahrazení aminokyseliny na pozici 29, kde u antigenu S se nachází aminokyselina methionin a u antigenu s v této pozici se nachází threonin. [4]



Obrázek 1 GYPR, GYPB proteiny, které kódují MNSs systém[1].

## 2.4. Protilátky systému MNSs

### Anti-M

Anti-M je poměrně běžně se vyskytující protilátka, optimálně reagující při teplotě 4°C; obvykle nereaguje či velice slabě při teplotě 37°C. Prevalence p řirozeně se vyskytující anti-M, detekovaná v mikrodestičce při pokojové teplotě je v 1 z 2500 případů s erytrocyty M+N- a v 1 z 5000 případů s M+N+ erytrocyty. Vyšší záchyt této protilátky lze prokázat za pomoci použití roztoků o nízké iontové síle.

Protilátka anti-M se vyskytuje v podobě IgM i IgG. Většina anti-M protilátek reaguje silněji v albuminu než v solném prostředí. Anti-M protilátka velice zřídka aktivuje komplement.

### Anti-N

Výskyt protilátky anti-N je nižší v porovnání s výskytem anti-M. Anti-N je typická IgM chladová protilátka, inaktivní při teplotě 20-25°C. Jen velice vzácn ě anti-N tvoří imunizované protilátky. Chladová protilátka anti-N může být v podobě autoprottilátky[2]..

Natrávením erytrocytů enzymy (bromelin, papain, trypsin) se odstraní část glykoforinu A, na kterém jsou umístěny M a N antigeny. Výsledkem je, že M a N antigeny nejsou na erytrocytech dále detekovatelné. Anti-M a anti-N protilátky nelze tedy detekovat pomocí krvinek ošetřených enzymem [11].

### Anti-S

Jen příležitostně se vyskytuje ve formě přirozené protilátky. Běžně se nalézá po transfuzích jako imunní protilátka. Senzibilizovaná anti-S protilátka je většinou třídy IgG – podskupiny IgG1.

Anti-S způsobuje hemolytickou potransfuzní reakci a hemolytické onemocnění novorozence a plodu (HON). Autoanti-S způsobuje onemocnění AIHA [2].

### Anti-s

Je detekována velice vzácně; může být typu IgM nebo IgG převážně podskupiny IgG3. Anti-s způsobuje hemolytické onemocnění novorozence a plodu a pozdní potransfuzní reakce.

Anti-U

se vyskytuje velice ojediněle a neaktivuje komplement. Protilátka je výhradně zachycena u černošské populace. Anti-U může být v podobě tepelné autoprotilátky.

Anti-U způsobuje akutní i pozdní potransfuzní hemolytické reakce a těžké hemolytické onemocnění novorozence a plodu. Autoanti-U způsobuje onemocnění AIHA.

Protilátky anti-S, anti-s a anti-U neaktivují komplement.

S, s a U protilátky obvykle reagují při 37°C, ale jsou reaktivnější při teplotě 10-22°C za pomoci nepřímého antiglobulinového testu [2].

**3. P1 SYSTÉM (003)****3.1. Historie**

V roce 1927 Landsteiner a Levin, objevili pomocí imunizaci králíků, tzv. P krevněskupinový systém.

V roce 1955 byl P systém rozšířen *Sangerem*, který zjistil, že všechny erythrocyty nesoucí velice vzácný fenotyp Tj (a-) byly současně P -. Proto P systém byl pozměněn tak, aby odpovídal novému fenotypu: P+ se změnil na P1, P- na P2, a Tj (a-) byl přejmenován na p. V roce 1959 byl rozpoznán další vzácný fenotyp P<sup>k</sup>. P<sup>k</sup> antigen je transformován na P antigen a není nadále detekovatelný. Pokud není přítomen P antigen stejně jako P<sup>k</sup> a P<sub>1</sub> antigeny, jedná se o genotyp pp, který je velmi vzácný. P<sup>k</sup> erythrocyty mohou obsahovat také P<sub>1</sub> nebo P<sub>2</sub> antigen[4,11].

**3.2. Antigeny**

Tabulka 3 Frekvence výskytu P systému

Frekvence %	Fenotyp	Antigeny na erythrocytech	Protilátky systému P1
75	P <sub>1</sub>	P1P	Žádný
25	P <sub>2</sub>	P	Anti-P1
Velice vzácné	P <sup>k</sup> <sub>1</sub>	P1Pk	Anti-P
	P <sup>k</sup> <sub>2</sub>	Pk	Anti-P
	p	žádný	Anti-PP1Pk

P1 a P antigeny se nacházejí na trombocytech, na lymfocytech a fibroblastech.

### 3.3. Biochemie

Syntéza antigenů P<sup>k</sup>, P a P1 probíhá postupným připojováním cukrů na laktosylkeramid. Prvním krokem je syntéza antigenu P<sup>k</sup>, výchozího prekurzoru všech glykosfingolipidů globulárního typu. Při vzniku antigenu P<sup>k</sup> spojuje  $\alpha$  1,4 galaktosyltransferáza 1 ( $\alpha$ -4Gal T1) terminální galaktózu vazbou  $\alpha$  1-4 na laktosylkeramid. Antigen P<sup>k</sup> pak může sloužit jako substrát pro  $\alpha$  1,3-N-acetyl galaktosaminyltransferázu I ( $\alpha$ -Gal-NacT1 nebo  $\alpha$ -3Gal T3), která napojuje  $\alpha$ 1-3 N-acetylgalaktosamin na terminální galaktózu antigenu PK(Gb3) za vzniku antigenu P. U některých buněk, včetně erytrocytů, je antigen P dále prodlužován za tvorby dalších antigenů globulárního typu, jako jsou Luke (LKE), ABH antigeny s řetězcem typu 4 (globo-ABH) a NOR. NOR je vzácný fenotyp polyaglutinabilních erytrocytů, charakterizovaných naojením  $\alpha$  1-4 galaktózy na terminus antigenu P a příslušné globoglykolipidy s dlouhými řetězci.

Na rozdíl od antigenů P<sup>k</sup> a P není antigen P1 globulární glykosfingolipid, ale patří do skupiny neolakto (řetězce sfingolipidů typu 2). U osob s P1 existuje hypotéza, že  $\alpha$ 4GalT1 nebo P<sup>k</sup> syntéza je odpovědná za připojení  $\alpha$ 1-4 galaktózy na terminální konec paraglobosidu za tvorby P1.

### 3.4. Protilátky P systému

#### Anti-P1

Anti-P1 protilátky se mohou vyskytovat u jedinců s P2 antigenem. Anti-P1 reagují při nízké teplotě. Jsou to IgM chladové aglutininy. U 90% těhotných žen s P2 antigenem byla nalezena protilátka anti-P1, ale nebylo zjištěno, že by docházelo k alloimunizaci během těhotenství. Anti-P1 protilátka byla nalezena u některých mužů, kterým nikdy nebyl podán transfuzní přípravek. Anti-P1 protilátka reaguje při 25°C a v menší míře je aktivní při 37°C. Séra obsahující anti-P1 protilátky, které jsou zachyceny při 37°C anti-globulinovým nepřímým testem, mohou vázat komplement a způsobit potransfuzní hemolytické reakce[1].

Anti-P1 protilátky mohou být neutralizovány přidáním P1 substancí[11].

#### Anti-PP1P<sup>k</sup> (anti-Tja)

Kombinace protilátek anti-P+anti-Pk+anti-P1, nazývaná rovněž anti-Tja, se nachází pouze u lidí s genotypem pp, u kterých chybí P, P<sup>k</sup> a P<sup>1</sup> antigeny. Tato protilátka může způsobit potrat v raném těhotenství. Protilátky Anti-PP<sub>1</sub>P<sup>k</sup> jsou IgM nebo IgG, obvykle vážou komplement a způsobují urychlenou potransfuzní hemolytickou reakci

### Anti-P

Anti-P se odlišuje od protilátky anti-PP<sub>1</sub>P<sup>k</sup> tím, že nereaguje s erytrocyty obsahujícími antigen Pk1 a Pk2. Anti-P reaguje sérologicky stejně jako anti-PP<sub>1</sub>P<sup>k</sup>, tj. jako aglutinin při pokojové teplotě a při teplotě 37°C způsobuje hemolytickou reakci. Anti-P se může objevit v podobě autoprotilátky, která funguje jako dvoufázový hemolyzin. Bifázické hemolyziny jsou chladové protilátky IgG třídy, které silně vážou komplement. Aktivita protilátek se projevuje ve dvou fázích: v průběhu první fáze se protilátky vážou na erytrocyty při nízké teplotě (0-4°C), při této teplotě nejsou schopny způsobit hemolýzu. Jakmile teplota dosáhne více než 28°C, dojde k aktivaci komplementu s následnou lýzou erytrocytů (druhá fáze)[1, 11].

Protilátky systému P jsou imunoglobulinové třídy IgM i IgG. U IgG typu jsou převážně podtřídy IgG3 [1].

### **3.5. P antigen – Receptor pro bakterie a viry**

Krevní skupina P substance, která se vyskytuje v tkáních, zajišťuje adhezi některých druhů patogenních bakterií.

- P<sub>1</sub> a P<sup>k</sup> glykolipidy, které se vyskytují na epitelových buňkách močového ústrojí, dokážou navázat *Escherichia coli*.
- *Streptococcus suis*, původce meningitidy, se rovněž váže na P<sup>k</sup> a P<sub>1</sub> substanci.
- *Pseudomonas aeruginosa* se navazuje prostřednictvím PA-I lektinu na P<sup>k</sup> a P<sub>1</sub> determinanty lidské tkáně.
- P antigen je receptorem pro parvovirus B19, který způsobuje Erythema infectiosum (Pátá nemoc u dětí). V případě, kdy P antigen chybí, je jedinec přirozeně rezistentní vůči infekci vyvolané tímto virem. [4]

## **4. LUTHERAN SYSTÉM (005)**

### **4.1. Historie**

První antigen skupiny Lutheran byl objeven Callenderem v roce 1945 a původně měl být pojmenován Lutteran, po prvním Lu(a+) dárci. Nesprávný popis štítku se vzorkem jeho krve vedl k pojmenování Lutheran. [5]

### **4.2. Antigeny Lu<sup>a</sup> a Lu<sup>b</sup>**

V současné době je známo 19 antigenů systému Lutheran. Čtyři páry z těchto antigenů jsou alelicky příbuzné: Lu<sup>a</sup>(LU1)/Lu<sup>b</sup>(LU2); Lu6/Lu9; Lu8/Lu14 a Au<sup>a</sup>/Au<sup>b</sup>.

Tabulka 4 Frekvence výskytu fenotypu Lutheran

Tradiční symbol/jméno	Číselný symbol	Frekvence
Lu <sup>a</sup>	Lu1	Nízká
Lu <sup>b</sup>	Lu2	Vysoká
Mull	Lu9	Nízká
Jan	Lu14	Vysoká
Hof	Lu14	Nízká
M.T.	Lu8	Vysoká
Au <sup>a</sup>	Lu18	Vysoká
Au <sup>b</sup>	Lu19	Nízká

Antigen Lu<sup>a</sup> je přítomen na membráně erytrocytů přibližně u 8% Evropanů, Afričanů a Severních Američanů a u ostatních populací se tento antigen nevyskytuje vůbec či velice zřídka. Lu<sup>b</sup> se vyskytuje přibližně u 99,85% jedinců všech populací. Přibližně 92% populace má fenotyp Lu(a-b+). Velmi vzácně se vyskytuje kombinace fenotypu Lu(a-b-).

Vývoj antigenů Lu<sup>a</sup> a Lu<sup>b</sup> se dokončuje až po skončení fetálního období.

Dle číselné nomenklatury je Lu<sup>a</sup> označován jako Lu1 a Lu<sup>b</sup> jako Lu2; Lu3 je antigen, který je přítomen kromě Lu(a-b-) na všech erytrocytech [1].

#### 4.2.1. Lutheran-null fenotyp (Lu<sub>null</sub>)

Lutheran systém má i tzv. null fenotyp. Tento fenotyp byl poprvé popsán *Crawfordem et al.* v roce 1961. Bývá označován jako Lu(a-b-).

Rozlišujeme 3 typy Lu<sub>null</sub> fenotypu:

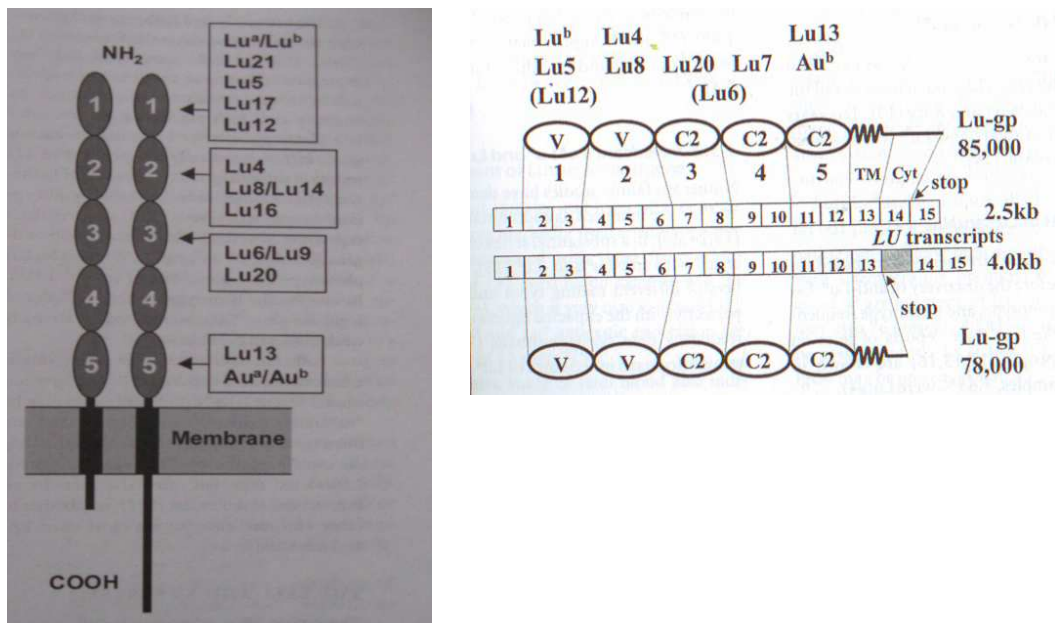
1. Homozygotní typ recesivní alely Lu genu. Na erytrocytech zcela schází exprese Lutheran antigenů a jednotlivci mohou vytvářet protilátku nazývanou anti-Lu3, která je zaměřena proti vysoce se vyskytujícím Lutheran antigenům.
2. Heterozygotní typ dominantního řízeného genu, In (Lu), geneticky samostatný LU gen, vedoucí k expresi velice slabých Lutheran antigenů. Tyto antigeny jsou pouze detekovány eluční metodou, které taktéž regulují expresi několika dalších krevněskupinových antigenů.

3. Hemizygotní forma, která je vázaná na X chromozom. [3]

### 4.3. Biochemie Lutheran antigenů

Lutheran lokus se nachází na chromozómu 19 q13.2-q13.3. Antigeny  $Lu^a$ ,  $Lu^b$  a další antigeny systému Lutheran jsou antigeny s vysokou frekvencí výskytu. Jsou lokalizovány na dvou glykoproteinech spojených disulfidickými můstky. Velký protein má molekulární hmotnost 85 kDa a malý protein, nesoucí  $Lu^b$ , 78 kDa [1].

Lutheran glykoprotein má extracelulární doménu, která se skládá z pěti imunoglobulinů ze IgSF domén (V- V- C2- C2- C2) a obsahuje pět možných míst pro navázání N-glykosylovaných skupin. Jedno místo je v doméně 3 a čtyři v doméně 4. Polymorfní antigeny  $Lu^a/Lu^b$  a  $Au^a/Au^b$  se nachází v první a páté doméně.



Obrázek 2: Schéma Lu-glykoproteinu, produkt dvou transkriptů. Umístění systému Lutheran antigenů na IgSF doménách (V a C2) na Lu glykoproteinu[3].

Lutheran – specifická substance se nalézá na mnoha buňkách a tkáních organismu. Pomocí imunofluorescenční metody bylo zjištěno, že Lutheran antigeny jsou přítomny v endotelu cév, především v artériích různorodých tkání. Lutheran antigeny se též nacházejí na povrchových epitelích a kolem hlenových žláz. Lutheran glykoproteiny jsou přítomny na glomerulech a na tubulárních epitelích ledvin dospělého člověka.

Přepokládá se, že Lutheran glykoprotein může mít funkci receptoru nebo funkci adhezivní molekuly pro navázání lamininu. Laminin se účastní diferenciaci, adheze,



migrace a proliferace tkáňových buněk, ale taktéž hraje úlohu při vzniku metastáz rakovinného onemocnění[4].

Lu antigeny nelze detekovat na trombocytech, Lu<sup>b</sup> nelze detekovat na lymfocytech, monocytech nebo granulocytech [1].

#### 4.4. Protilátky systému Lutheran

##### Anti-Lu<sup>a</sup>

Protilátka anti-Lu<sup>a</sup> se objevuje po senzibilizaci při těhotenství nebo po podání transfuze. Velmi často se vyskytuje společně s ostatními protilátkami proti erytrocytům, reagujícími s HLA protilátkami (anti-Bg). Anti-Lu<sup>a</sup> se vyskytuje i jako přirozená protilátka.

Anti-Lu<sup>a</sup> protilátky jsou převážně typu IgM, ale vyskytují se i v podobě IgG a IgA, tak jako další protilátky systému Lutheran. Anti-Lu<sup>a</sup> často aglutinují přímo erytrocyty Lu<sup>a+</sup> při pokojové teplotě. Anti-Lu<sup>a</sup>, které reagují v antiglobulinovém testu, jsou především typu IgG. Protilátka Lu<sup>a</sup> se může vyskytovat i ve směsi IgM a IgG či ve formě IgA.

##### Anti-Lu<sup>b</sup>

Tato protilátka se vyskytuje velice vzácně; jak napovídá vzácný výskyt fenotypu Lu(a+b-). Přibližně 99,8% populace má Lu<sup>b</sup> pozitivní erytrocyty. Senzibilizace nastává při těhotenství a/nebo po podání transfuze. Protilátka anti-Lu<sup>b</sup> nebyla ještě popsána jako „přirozeně se vyskytující“.

Protilátky anti-Lu<sup>b</sup> jsou zachyceny pomocí antiglobulinového testu, ale taktéž byly zaznamenány případy záchytu přímou aglutinací, mnohé z nich převážně při pokojové teplotě. Protilátka anti-Lu<sup>b</sup> se většinou objevuje ve směsi IgM a IgG, taktéž může být přítomna v podobě IgA.

Protilátka anti-Lu<sup>b</sup> třídy IgG se vyskytuje ve formě podtříd IgG1, IgG2 a IgG4 [2].

##### Anti-Lu3

Anti-Lu3 vzniká pouze u jednotlivců, kteří byli senzibilizováni velice vzácným recesivním typem Lu(a-b-)[5].

#### 4.4.1. Klinický význam protilátek anti-Lu<sup>a</sup> a anti-Lu<sup>b</sup>

Protilátky systému Lutheran jsou klinicky nevýznamné. Lutheran antigeny nejsou většinou exprimovány na erythrocytech novorozenců, z tohoto důvodu nebylo zaznamenáno hemolytické onemocnění novorozence a plodu. Lutheran systém se vytváří až po několika měsících po narození[1].

Vyšetření přímého antiglobulinového testu (PAT) novorozenců, jejichž matkám byl detekován vysoký titr protilátek proti systému Lutheran typu IgG1, je negativní. Důvodem může být Lu-glykoprotein, který se nachází na placentární tkáni a je pravděpodobné, že tyto protilátky jsou adsorbovány na placentární buňky, čímž zabraňují průchodu přes placentární bariéru.

Lutheran protilátky nejsou příčinou náhlé potransfuzní hemolytické reakce, ale mohou být zodpovědné za pozdní potransfuzní hemolytické reakce [2].

## 5. Systémy Kell a Kx (006+019)

### 5.1. Úvod

V roce 1946 byl Coombsem pomocí antiglobulinového testu objeven K (KEL 1) antigen, též nazývaný jako Kell. O tři roky později byl Levinem nalezen jeho antagonist, antigen k (KEL2) [2].

V roce 1957 byly popsány *Allenem et al.*, nové antigeny Kp<sup>a</sup> a krátce poté Kp<sup>b</sup>. *Chown et al.* popsal K<sub>0</sub> (Knull) antigen. Antigen Js<sup>a</sup> byl objeven v roce 1958 *Gilblettem* a Js<sup>b</sup> v roce 1963 *Walkerem et al.*[7].

### 5.2. Kell glykoprotein

Glykoprotein (CD238), který nese antigeny systému Kel, je kódován genem vyskytujícím se na chromozómu 7, skládajícím se z 19 exonů. Kel glykoprotein prostupuje 1x erythrocytární membránou. Kel protein patří mezi zinek-dependentní endopeptidázy. Molekulová hmotnost je 93kDa a obsahuje 732 aminokyselin [1,6].

Kel antigen lze detekovat ve varleti, na příčně pruhovaných kosterních svalech a na lymfatických tkáních. Kell antigeny nebyly, ani pomocí fluorescenční průtokové cytometrie, detekovány na lymfocytech, monocytech či granulocytech nebo trombocytech. [1].

### 5.3. Antigeny systému Kell

Seznam známých antigenů, které patří do systému Kell, se nachází v tabulce 5.

Z klinického pohledu nejdůležitější antigen z Kell systému je K (K1). Protilátky proti antigenu Kell mají za následek hemolytické potransfuzní reakce a hemolytické onemocnění novorozence a plodu (HON) mnohem častěji než ostatní protilátky s výjimkou ABO a Rh systémů.

Mezi klinicky důležité antigeny Kell systému patří Kp<sup>a</sup>, Kp<sup>b</sup> a Kp<sup>c</sup> (K3, K4, K21) a Js<sup>a</sup> a Js<sup>b</sup> (K6, K7).

Tabulka 5: Výpis antigenů systému Kell a jejich frekvence [1]

Historický název	Označení Antigenu	Označení číselné	Označení ISBT	%zastoupení v bílé populaci
Kelleher	K	K1	KEL1	9,1
Cellano	k	K2	KEL2	99,8
Penney	Kp <sup>a</sup>	K3	KEL3	2,0
Rautenberg	Kp <sup>b</sup>	K4	KEL4	>99,9
Peltz	Ku	K5	KEL5	>99,9
Sutter	Js <sup>a</sup>	K6	KEL6	<1,0 u bílé populaci 19,5 u černé populaci
Matthews	Js <sup>b</sup>	K7	KEL7	>99,9
Kahula	Ula	K10	KEL10	2,6
Coté		K11	KEL11	>99,9
Bøt		K12	KEL12	>99,9
Sgro		K13	KEL13	>99,9
Santini		K14	KEL14	>99,9
k-like		K16	KEL16	99,8
Weeks	Wka	K17	KEL17	0,3
Marshall		K18	KEL18	>99,9
Sublett		K19	KEL19	>99,9
Km		K20	KEL20	>99,9
Levay	Kp <sup>c</sup>	K21	KEL21	<0,1
Ikar		K22	KEL22	>99,9
Centauro		K23	KEL23	<0,1
Callois	Cls	K24	KEL24	<0,1
VLAN		K25	KEL 25	<0,1
TOU		K26	KEL 26	>99,9
RAZ		K27	KEL 27	>99,9

VONG		K28	KEL 28	<0,1
------	--	-----	--------	------

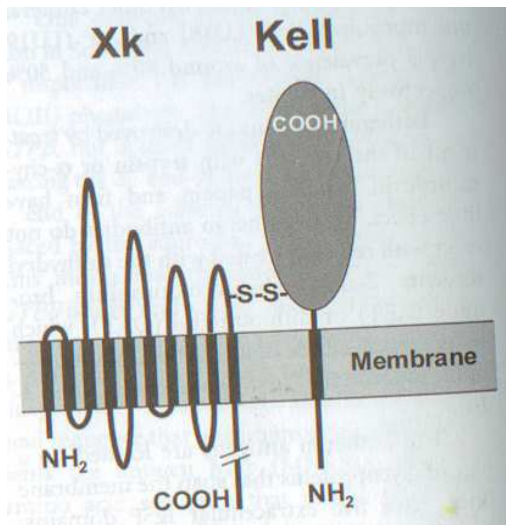
Kw (dříve K8), KL (Dříve K9 a Kx (dříve K15) nepatří do Kell systému

### 5.3.1. Antigen Kx

Antigen Kx je přítomen na membráně erytrocytů silněji než ostatní Kell antigeny, např. K<sub>0</sub> erytrocyty.

Kx je jediným antigenem Kx systému; jeho dědičnost je řízena recesivním genem Xk na Xp21. Gen kóduje protein o 444 aminokyselin o molekulární hmotnosti 51kDa s 10 údajnými transmembránovými doménami, s velmi krátkou cytosolovou amino-terminální doménou a delší cytosolovou karboxy-terminální doménou. Jediný extracelulární zbytek cysteinu na páté extracelulární smyčce je pomocí disulfidického můstku navázán na Cys72 Kel proteinu (viz obr. 3).

Funkce Kx proteinu je neznámá. Kx je přítomen na všech erytrocytech s výjimkou erytrocytů, které patří do velmi vzácného McLeod fenotypu, u tohoto fenotypu jsou všechny Kell antigeny deprimovány. [1]



Obrázek 3: Schéma proteinů Kell a Xk spojené jednoduchou disulfidickou vazbou [3].

### 5.3.2. K<sub>0</sub> fenotyp

Chown a spol. našli na erytrocytech nový fenotyp K-k-, Kp (a-b-) a označili jej jako K<sub>0</sub>. K<sub>0</sub> jedinci mohou vytvářet protilátku anti-Ku (anti-KEL5). Tato protilátka může reagovat se všemi krvinkami, kromě K<sub>0</sub> fenotypu.

## 5.4. Mc Leod syndrom, Mc Leod fenotyp a Kx (XK1) antigen

McLeod syndrom, který je spojován se vznikem akantocytů a mnoha svalových a neurologických poruch, je velice vzácný. Je vázán na chromozóm X, a vyskytuje se tedy především u chlapců. Výsledkem hemizygótní formy je inaktivace mutací a delecí XK genu, který je příčinou absence XK proteinu, který exprimuje Kx antigen (jediný antigen Kx systému). XK protein je genově spojen s Kell glykoproteinem přes jednu disulfidickou vazbu.

Delece části X chromozómu, který zahrnuje i XK gen, může také zodpovídat za X autosomální chronické granulomatózní onemocnění (CGD). CGD pacienti s McLeod syndromem v případě transfuze obvykle vytvářejí anti-Kx a anti-Km protilátky, které zcela znemožňují kompatibilitu[6].

### **5.5. Kell protilátky**

#### Anti-K

Přirozeně se vyskytující IgM protilátka anti-K se objevuje velmi vzácně. Anti-K protilátky typu IgM se mohou objevit během některých nemocí (např. infekce E. coli, TBC, Campylobacter jejuni či C. coli), nicméně, po залéčení zmizí [1].

Anti-K je nejběžnější senzibilizovaná erytrocytární protilátka mimo ABO a Rh systémy, vytvářena K negativními jedinci po transfuzi K+ erytrocytů, či během těhotenství. Konstad a Hiesto provedli průzkum, který je dovedl k výsledku, že u 10% pacientů K-, kterým byla transfundována jedna jednotka krve K+, byla prokázána protilátka anti-K [7].

Možnost alloimunizace protilátkou K je během těhotenství relativně běžná. Přibližně u 1 z 3500 případů může být prokázán výskyt HON, který je zapříčiněn protilátkou anti-K u druhého těhotenství.

U screeningu protilátek se k detekci protilátky anti-K většinou používají erytrocyty Kk. Jen v některých případech byla protilátka anti-K detekována pouze erytrocyty KK.

#### Anti-k

Tato protilátka se vyskytuje velice vzácně. Vysvětlení vyplývá ze vzácného výskytu k-negativního (KK) fenotypu. Výskyt u bílé populace v různých částech Evropy: 0,04-2%, u černošské populace v USA: 0,005% a velmi vzácně u Japonců.

#### Ostatní protilátky K a Kx systémů

Anti-Kp<sup>a</sup>, anti-Kp<sup>b</sup>, anti-Js<sup>a</sup> a anti-Js<sup>b</sup> jsou velice vzácně se vyskytující protilátky.

Anti-Kp<sup>a</sup> a Kp<sup>b</sup> se mohou vyskytovat i jako autoprottilátky.

Ostatní zmiňované protilátky byly prokázány pouze jako alloimunní.

Anti-Ku reaguje se všemi vzorky kromě K<sub>0</sub> a to bylo zjištěno u K<sub>0</sub> jedince.

Pacient s McLeod fenotypem může vytvářet pouze 2 alloprotilátky po transfuzi – anti-Kx a anti-Km. Km antigen je přítomen na erytrocytech s běžným Kell fenotypem, ale ne na K<sub>0</sub> erytrocytech nebo na erytrocytech McLeod fenotypu.

### 5.5. Sérologické charakteristiky senzibilizace anti-K a anti-k

Anti-K a anti-k jsou obvykle typu IgG. Kell protilátky jsou výhradně podtřídy IgG1. V mnoha případech anti-K typu IgG aktivuje komplement pouze do C3 složky a reakce jsou nehemolytické.

Anti-K může být typu IgM. Velice vzácně dochází k IgM senzibilizaci erytrocytů a zároveň k přímé aglutinaci.

#### Klinický význam

Anti-K a méně často se vyskytující anti-k mohou být příčinou potransfuzní hemolytické reakce; anti-Js<sup>a</sup> a Js<sup>b</sup> mohou způsobit pozdní hemolytickou potransfuzní reakci. Anti-Kp<sup>a</sup> a méně se vyskytující anti-Kp<sup>b</sup> a anti-Js<sup>b</sup> mohou způsobit HON.

Protilátky systému Kell, především anti-Kp<sup>b</sup>, se mohou vyskytovat jako autoprottilátky, způsobující autoimunitní hemolytické anémie (AIHA).

Přechodné deprese Kell antigenů, s vytvořením alloprotilátek reagujících s vysoce frekventním Kell antigenem nebo s K<sub>0</sub> erytrocyty, byly zaznamenány ve spojitosti s autoimunitní trombocytopenickou purpurou[1].

## 6. LEWIS SYSTÉM (007)

### 6.1. Úvod

Krevněskupinový systém Lewis je odlišný od ostatních lidských krevněskupinových systémů.

1. Lewis antigeny jsou navázány na solubilní glykolipidy přítomné ve slinách a v plazmě, které jsou adsorbovány na erytrocytární membránu z plazmy.

- 2.. Lewis fenotyp erytrocytů je ovlivněn ABH sekretorstvím (ačkoliv Lewis gen a geny sekretoru jsou děděny nezávisle).
3. Jako produkty ABH a Le se dělí o stejný substrátový prekurzor, Lewis systém může být modifikován AB0 fenotypem. Např. A1 může zvýšit expresi Le<sup>b</sup> a také Le<sup>a</sup> antigenu[3].

## 6.2. Lewis antigeny

Lewis systém se skládá ze dvou hlavních antigenů: Le<sup>a</sup> a Le<sup>b</sup> a vytváří tři typy fenotypů: Le(a+b-), Le(a-b+), a Le(a-b-)[3].

Tabulka 6 Lewis fenotypy

Fenotyp	Frekvence výskytu	
	Bělošská populace	Černošská populace
<b>Le (a+b-)</b>	22%	19,5%
<b>Le (a-b+)</b>	72%	52%
<b>Le (a-b-)</b>	6%	28,5%
<b>Le (a+b+)</b>	Velice vzácné	Velice vzácné

Pomocí cytotoxického testu a fluorescenčního průtokového cytometru byly Lewis antigeny prokázány v heterozygotní formě na lymfocytech a na trombocytech. Lewis antigeny nebyly nalezeny na granulocytech a na monocytech.

## 6.3. Sekretorství

Tabulka 7: Lewis fenotypy a ABH sekretorství

Genotyp		Fenotyp na erytrocytech	Antigeny u vylučovatelů	
Lewis	Sekretor		Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>
Le/Le nebo Le/le	Se/Se nebo Se/se	Le(a-b+)	+	+
Le/Le nebo Le/le	Se <sup>w</sup> /Se <sup>w</sup> nebo Se <sup>w</sup> /se	Le(a+b+)	+	+
Le/Le nebo Le/le	se/se	Le(a+b-)	+	-
le/le	se /se	Le(a-b-)	-	-

Krevní skupinové antigeny A, B a H se mohou vyskytovat i v tělesných tekutinách, např. ve slinách, žaludeční a pankreatické šťávě, ve spermatu, v obsahu cyst apod. Lidé, kteří mají schopnost vylučovat svoji skupinovou vlastnost do tělních tekutin, se označují jako sekretoři, vylučovatelé; lidé, kteří tuto vlastnost nemají, se nazývají non-sekretoři, nevylučovatelé.

Všichni sekretoři vylučují antigen H a kromě toho i antigen A nebo B podle své skupinové příslušnosti.

Nonsekretoři nevylučují ani svůj skupinový antigen, ani antigen H.

Vylučovatelství skupinových vlastností je podmíněno párem genů označených zkratkami Se a se. Vylučovatelé mají buď genotyp SeSe nebo Sese, nevylučovatelé genotyp sese. Nevylučovatelé jsou přitom Le<sup>a</sup> pozitivní i negativní, vždy Le<sup>b</sup> negativní, kdežto vylučovatelé jsou Le<sup>a</sup> negativní a Le<sup>b</sup> pozitivní nebo i negativní [8].

#### 6.4. Biochemie a syntéza

Syntéza antigenu Lewis závisí na dvou různých fukosyltransferázách Lewis (FUT1) a Sekretor (FUT2). Na rozdíl od H nebo FUT1, které jsou specifické pro substráty s řetězcem typu 2, Lewis a Sekretor přednostně fukosylují substráty s řetězcem typu 1. Sekretor (FUT2) se může připojovat na terminální  $\alpha$  1-2 fukozu na prekurzor s řetězcem typu 1 za tvorby antigenu H s řetězcem typu 1. Gen Lewis kóduje  $\alpha$  1-3/4 fukosyltransferázu, která přenáší fukózu ve vazbě  $\alpha$  1-4 na předposlední N-acetylglukosamin prekurzoru s řetězcem 1 („Lewis c“) za tvorby antigenu Le<sup>a</sup>. Lewis (FUT3) může být také připojen na druhou fukózu na antigen typu 1H a vytvořit antigen Le<sup>b</sup>. Se a Le transferázy soutěží o stejnou prekurzorovou substanci. Se transferáza je mnohem účinnější než Le transferáza. Z tohoto důvodu je u jednotlivců, kteří mají oba enzymy (Lewis a Sekretor), tvořen více H antigen a tedy i více Le<sup>b</sup> antigenu než Le<sup>a</sup> antigen. Výsledkem je, že většina syntetizovaných Lewis antigenů jsou Le<sup>b</sup> fenotyp Le (a-b+)[3,11].

Z plazmy jsou Lewis antigeny absorbovány na erytrocytární membránu[11].

#### 6.5. Protilátky systému Lewis

##### Anti-Le<sup>a</sup>

Anti-Le<sup>a</sup> se objevuje relativně běžně v lidském séru. Anti-Le<sup>a</sup> je nalezena pouze u lidí, kteří jsou Le (a-b-) a vylučují ABH substanci.



### Anti-Le<sup>b</sup>

Anti-Le<sup>b</sup> je často prokázána jako slabá protilátka v séru, které obsahuje relativně silnou protilátku anti-Le<sup>a</sup>. Anti-Le<sup>b</sup> se vyskytuje jako samostatná protilátka velice vzácně. V tomto případě protilátka anti-Le<sup>b</sup> objevuje u jedinců s fenotypem Le (a-b-) nebo Le (a+b-). Některé anti-Le<sup>b</sup> v séru mohou silně reagovat s erytrocyty krevní skupiny 0 nebo A2.

Existují dva druhy protilátek Le<sup>b</sup>

1. běžné, které jsou inhibovány ABH sekretorstvím ve slinách; tyto protilátky se nazývají anti-Le<sup>bH</sup>, reagují pouze se vzorky krevní skupiny 0 a A2.
2. protilátky, které jsou inhibovány slinami člověka fenotypu Le(a-b-). Tyto protilátky anti-Le<sup>b</sup> reagují s krevní skupinou A1 Le(a-b+) skoro tak dobře jako s ostatními krevními skupinami AB0 systému, nazývají se anti-Le<sup>bL</sup>.

### Anti-Le<sup>c</sup>

Protilátka Anti-Le<sup>c</sup> reaguje s erytrocyty fenotypu Le (a-b-) non-sekretorskými, od jednotlivců genotypu lele, sese; protilátka je inhibována slinami jednovlivce o stejném genotypu. Le<sup>c</sup> nepochází z alely na Le lokusu, ale je nefukozylozovatelná a je považována za prekurzor typu 1.

### Anti-Le<sup>d</sup>

Anti-Le<sup>d</sup> reaguje s erytrocyty fenotypy Le (a-b-) sekretorskými, např. genotyp jednovlivce lele, SE. Nejsilnější reakce jsou s krevní skupinou 0 nebo A2. Struktura antigenu Le<sup>d</sup> je typu 1 H, tudíž není součástí Lewis systému.

Lewis protilátky většinou aktivují komplement. Jsou detekovatelné pomocí NAT testu za použití reagentu, který obsahuje antikomplementární složku. Reakce jsou silnější za přítomnosti enhanceru – roztoku o nízké iontové síle, nebo za pomoci použití enzymem natrávených erytrocytů.

### Klinický význam

Lewis protilátky jsou typu IgG i IgM.

Protilátky Lewis velice vzácně způsobují potransfuzní hemolytické reakce. Vyskytují se u jedinců s krevní skupinou 0 a Le(a+) erytrocyty. Lewis antigeny jsou slaběji vyjádřeny na erytrocytech krevních skupin A, B a AB a více na krevní skupině 0.

U Lewis protilátek není známo, že by způsobovaly hemolytické onemocnění novorozence a plodu, pravděpodobně z důvodu, že protilátky Lewis systému jsou především typu IgM a také proto, že erythrocyty novorozence reagují jen velice slabě nebo vůbec s Lewis protilátkami[1].

## 7. DUFFY SYSTÉM (008)

### 7.1. Historie

Duffy systém byl objeven Cutbushem v roce 1950. Systém byl pojmenován po prvním pacientovi, u kterého byly nalezeny protilátky proti antigenu tohoto systému. Zkráceným názvem Duffy je Fy.

### 7.2. Duffy systém

Duffy systém je polymorfní krevněskupinový systém, který je definován 6 znaky.

- 2 hlavní antigeny Fy<sup>a</sup> (=Fy1) a Fy<sup>b</sup> (=Fy2). Na základě přítomnosti, či absence těchto antigenů, jsou definovány 4 typy fenotypů Fy (a+b-), Fy (a-b+), Fy (a+b+) a Fy (a-b-),
- znaky Fy3 (=Fy3), Fy5 (=Fy5) a Fy6 (=Fy6) mají spojitost s expresí antigenů Fy<sup>a</sup> a Fy<sup>b</sup> a jsou přítomny na všech lidských erythrocytech kromě erythrocytů majících fenotyp Fy (a-b-). Tyto antigeny jsou tudíž zastoupeny epitopy lokalizovanými na oddělené doméně Duffy krevněskupinové substance,
- Fy4 (=Fy4) je přítomen skoro na všech erythrocytech Fy(a-b-) a na některých Fy (a+b-), či Fy (a-b+) u negroidní skupiny [4].

Tabulka 8: Antigeny systému Duffy [4]

ISBT nomenklatura	Běžný název	Výskyt (%) evropská populace	černoši
<b>FY1</b>	Fya	42,5	8
<b>FY2</b>	Fyb	55,7	92
<b>FY3</b>	Fy3	>99,9	
<b>FY4</b>	Fy4	>99,9	
<b>FY5</b>	Fy5	>99,9	
<b>FY6</b>	Fy6	>99,9	

Tabulka 9: Frekvence výskytu Duffy fenotypu u populace černošské, bělošské, asijské [6]

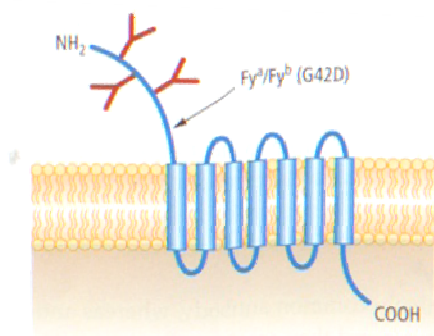
Fenotyp	Frekvence (%)		
	Evropská	Africká	Japonská
Fy (a+b-)	20	10	81
Fy (a+b+)	48	3	15
Fy (a-b+)	32	20	4
Fy (a-b-)	0	67	0

Gen pro Duffy systém je umístěn na chromozómu 1, stejně jako gen pro systém Rhesus.

Za pomocí metody průtokové cytometrie bylo prokázáno, že Duffy systém se nevyskytuje na trombocytech, ani na lymfocytech, monocytech a granulocytech [5].

### 7.3. Duffy glykoprotein, receptor pro chemokiny

Duffy glykoprotein, též označován Duffy Antigen Receptor pro Chemokiny (DARC), je erytrocytární receptor pro různé druhy chemokinů, např. interleukin-8 (IL-8), monocyt chemotaktický protein-1 (MCP-1) a melanom growth stimulating activity (MGSA). Glykoprotein prochází membránou erytrocytů 7x. Skládá se z 63 aminokyselin na extracelulární N-terminální doméně obsahující dva N-glykosylované konce.



Obrázek 4: Duffy glykoprotein (DARC), glykosylovaná skupina N-terminálního konce a cytoplazmatický C-terminální konec [6].

#### 7.4. Protilátky systému DUFFY

##### Anti-Fy<sup>a</sup>

Tato protilátka je zachycena především po podání transfuzí, méně běžně je zachycena během těhotenství; jako přirozeně se vyskytující protilátka skoro neexistuje. Anti-Fy<sup>a</sup> je většinou typu IgG; přibližně v 50% případů aktivuje komplement do stádia C3.

##### Anti-Fy<sup>b</sup>

Anti-Fy<sup>b</sup> se vyskytuje 20x méně často, než anti-Fy<sup>a</sup>. Obvykle se nachází v séru s dalšími erytrocytárními protilátkami.

Anti-Fy<sup>a</sup> (a anti-Fy<sup>b</sup>) jsou převážně IgG1 typu.

##### Anti-Fy3

Anti-Fy3 reaguje se všemi lidskými erytrocyty, kromě erytrocytů fenotypu Fy (a-b-). Tento fenotyp je běžnější u černošské populace. Přesto se tato protilátka vyskytuje velice vzácně.

##### Klinický význam

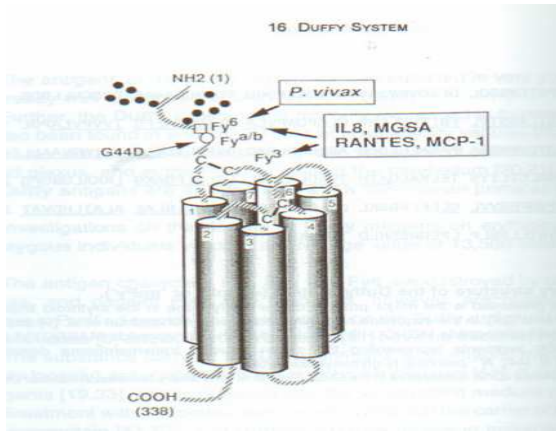
Protilátky systému Duffy velice zřídka způsobují hemolytickou potransfuzní reakci a HON.

#### 7.5. Duffy systém a onemocnění malárie

Jedinci mající na svých erytrocytech fenotyp Fy (a-b-) jsou chráněni před infekcí vyvolanou *Plasmodium vivax*. V některých částech Afriky je výskyt fenotypu Fy (a-b-) 100%, proto v těchto oblastech se nevyskytuje onemocnění malárií vyvolané *Plasmodium vivax*. Fenotyp Fy (a-b-) je výsledkem mutace místa, kde se navazuje GATA-1. GATA-1 je transkripční faktor, regulující expresi erytroidního genu. Mutace Fy (a-b-) zabraňuje navázání GATA-1 faktoru, takže Fy gen není přepsán a Fy glykoprotein se nevyskytuje na membráně erytrocytů.

Antigen Fy6 je pravděpodobně zodpovědný za to, že *Plasmodium vivax* může penetrovat do erytrocytů.

*Plasmodium falciparum* se neváže na antigeny Duffy systému. Proto jsou černoši náchylní k onemocnění malárií stejně, jako běloši [1].



Obrázek 5: Model struktury Duffy glykoproteinu [4]

## 8. KIDD systém (009)

### 8.1. Historie

Kidd systém byl objeven Allenem v roce 1951. V rámci tohoto systému jsou známy tři antigeny. Za tento krevně skupinový systém je zodpovědný jeden gen se třemi alelami. Kidd systém se zkráceně nazývá Jk.

### 8.2. Antigeny systému Kidd

Kidd systém se skládá ze tří antigenů – Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup> a Jk<sup>3</sup> [1].

Tabulka 10 Frekvence výskytu Kidd antigenů [6]

Antigen	Frekvence výskytu %		
	Evropané	Afričané	Asiaté
Jk <sup>a</sup>	76	92	73
Jk <sup>b</sup>	72	49	76

Fenotyp Jk (a-b-) se dědí recesivně a byl nalezen u Filipinců, jihovýchodních Asiatů, Číňanů a především u Polynézanů – přibližně 1%; tento fenotyp je extrémně vzácný u bělochů [1].

Antigeny Jk<sup>a</sup>(Jk1) a Jk<sup>b</sup> (JK2)

Jk<sup>a</sup> a Jk<sup>b</sup> jsou produkty alel, které se liší pouze v jedné aminokyselině a to na pozici 280. U glykoproteinu Jk<sup>a</sup> se v uvedeném místě se nachází kyselina asparagová Asp a u Jk<sup>b</sup> asparagin Asn [6].

Jk(a-b-) a Jk3

Obdobně jako fenotyp Jk null; Jk(a-b-); vzniká fenotyp Jk3 z homozygotní formy tzv. tichého genu na Jk lokusu. Výskyt tohoto fenotypu je velice vzácný u mnoha populací. Kidd null se relativně často objevuje u Polynézanů s frekvencí výskytu kolem 1 ze 400. Mutace polynézké null alely je zapříčiněna slepením místa v intronu 5, které vede ke ztrátě exonu 6 z mRNA.

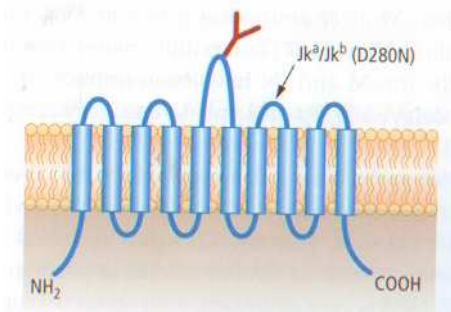
Tabulka 11: Fenotyp Kidd u třech populací

Fenotyp	Výskyt %		
	Běloši	Černoši	Asiaté
Jk (a+b-)	26	52	23
Jk (a+b+)	50	40	50
Jk (a-b+)	24	8	27

Kidd antigeny se nenacházejí na lymfocytech, granulocytech, monocytech a trombocytech [1].

**8.3. Kidd glykoprotein a nosič močoviny**

Kidd glykoprotein (HUT-B1) se skládá z 389 aminokyselin a prostupuje 10 x erytrocytární membránou s N-cytoplazmatickou a C-terminální doménou a na extracelulární třetí smyčce s navázanou N-glykosylovou vazbou[1].



Obrázek 6: Kidd glykoprotein, močovinný transportér s N-cytoplazmatickou a C-terminální doménou a N-glykan na třetí extracelulární smyčce.

Antigeny Kidd jsou umístěny na erytrocytárním přenašeči močoviny, nazývaném také lidský přenašeč močoviny 11 (HUT 11 nebo UT-B1). Když erytrocyty vstoupí do renální meduly, kde je vysoká koncentrace močoviny, přenašeč močoviny zajistí její rychlé odebrání a zamezí tak zborcení krvinek v hypertonickém prostředí. Při opuštění renální meduly je močovina z erytrocytů rychle odstraněna, což zabrání nabobtnání krvinek a přenosu močoviny mimo ledvinu. HUT 11 byl detekován na endoteliálních buňkách vasa recta, což je vaskulární dodavatel pro renální dřeň, ale není přítomen v renálních tubulech.

Normální erytrocyty jsou ve 2M močovinně rychle lyzovány, protože močovina transportovaná do krvinek způsobí hypertonii a následné prasknutí díky osmotickému přetlaku vody.

Protože krvinky Jk (a-b-) neobsahují přenašeč močoviny, nejsou 2M močovinou hemolyzovány, což může být využito jako metoda pro screening dárců Jk (a-b-).

#### **8.4. Protilátky systému Kidd**

Anti-Jk<sup>a</sup> a anti-Jk<sup>b</sup> se vyskytují pouze jako imunní protilátky. Jsou obecně nalézány ve směsi s jinými protilátkami. Kidd protilátky jsou především typu IgG podtřídy IgG1 a IgG3, ale některé jsou i typu IgG2, IgG4 nebo IgM. Kolem 50% protilátek anti-Jk<sup>a</sup> a anti-Jk<sup>b</sup> váže komplement. Protilátky systému Kidd jsou velice těžko detekovatelné. Nejdůležitějším testem pro zachycení protilátek proti systému Kidd je nepřímý antiglobulinový test a pro zachycení nízkého titru těchto protilátek se používají enzymaticky ošetřené krvinky.

#### Klinický význam Kidd protilátek

Kidd protilátky, které není snadno detekovat, jsou rizikové při podání krevní transfuze.

Anti-Jk<sup>a</sup> je zodpovědná za těžké a smrtelné náhlé potransfuzní hemolytické reakce a taktéž způsobuje pozdní potransfuzní hemolytické reakce. Průběh pozdní potransfuzní reakce způsobené protilátkami proti Kidd systému jsou vážné. Vedou k oligurii, renálnímu selhání a někdy dokonce k úmrtí.

Anti-Jk<sup>b</sup> je taktéž možnou příčinou vážných pozdních potransfuzních reakcí.

Pravděpodobnou hlavní příčinou pozdních potransfuzních reakcí, způsobených protilátkami systému Kidd, je jejich sklon k rychlému snížení titru protilátky, až k nedeteko-

vatelnému množství v plazmě. *Pineda a spol.* odhadli, že více, než 1/3 pozdních posttransfuzních reakcí byla způsobena protilátkou anti-Jk<sup>a</sup>.

Ačkoliv Kidd protilátky způsobují hemolytické reakce při inkompatibilních krevních transfuzích, anti-Jk<sup>a</sup> a anti-Jk<sup>b</sup> jsou velice vzácně zodpovědné za těžké HON. Důvodem, proč Kidd protilátky ojediněle způsobují HON, i přes relativně vysoký titr těchto protilátek, je nejasný.

Bylo popsáno několik případů detekce autoprotilátek anti-Jk<sup>a</sup>, které způsobily autoimunitní hemolytické anémie (AIHA) [2].

Kidd protilátky se též po transplantaci ledvin chovají jako histokompatibilní antigeny a mohou být zodpovědné za akutní transplantační odmítnutí [3].

## 9. DIEGO SYSTÉM (010)

### 9.1. Úvod

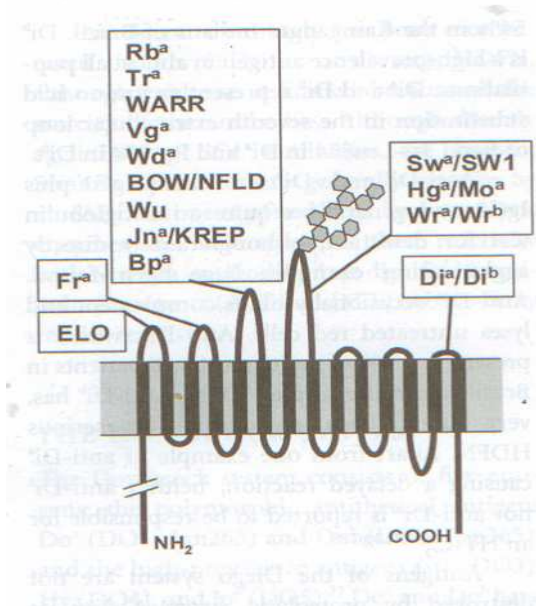
Diego systém se skládá z 21 antigenů, které se nacházejí na Band 3, což je běžné pojmenování pro erytrocytární aniontový měnič, AE1 [6].

Krevněskupinový systém Diego zahrnuje dva protikladné páry Diego antigenů: Di<sup>a</sup> a Di<sup>b</sup> a Wright antigenů: Wr<sup>a</sup> a Wr<sup>b</sup> a antigeny s nízkou frekvencí výskytu – Vd<sup>a</sup>, Rb<sup>a</sup>, WARR, ELO, Wu, Bp<sup>a</sup>, Mo<sup>a</sup>, Hg<sup>a</sup>, Vg<sup>a</sup>, Sv<sup>a</sup>, BOW, NFLD, Jn<sup>a</sup>, KREP, Tr<sup>a</sup>, Fr<sup>a</sup> a SW1 [1].

### 9.2. Band 3, erytrocytární anion měnič

Band 3 je hlavní erytrocytární membránový glykoprotein s přibližně 10<sup>6</sup> kopií na erytrocyt. Tento glykoprotein má dlouhou cytoplazmatickou N-terminální doménu, transmembránovou doménu, která 14x prostupuje membránou a cytoplazmatickou krátkou C-terminální doménu. Band 3 plní 2 funkce: funkci rychlého měniče HCO<sup>3-</sup> a Cl<sup>-</sup> iontů, které jsou důležité pro transport CO<sub>2</sub> a zároveň uchycuje erytrocytární membránu na cytoskelet [6].





Obrázek 7: Schéma Band 3, Diego glykoprotein a anion měnič. Umístění 21 antigenů Diego systému na extracelulární smyčce.

### 9.3. Antigeny systému Diego

#### Di<sup>a</sup> a Di<sup>b</sup>

Di<sup>a</sup> je poměrně běžný antigen u Indiánů v Severní Americe a u Číňanů a Japonců (frekvence výskytu 5-15%), ale velice vzácně se vyskytuje u bílé a černošské populace. Di (b+) je vysokofrekventní antigen, který se vyskytuje u 99,9% bělochů.

Antigen Di<sup>b</sup> nebyl detekován na lymfocytech, monocytech, ani na granulocytech.

Mnoho případů zachycení protilátek anti-Di<sup>a</sup> a anti-Di<sup>b</sup> se uskutečňuje během těhotenství; oba typy protilátek jsou často typu IgG1 + IgG3.

#### Klinický význam

Anti-Di<sup>a</sup> způsobuje HON, ale ještě nebyl prokázán případ potransfuzní hemolytické reakce. Anti-Di<sup>b</sup> taktéž způsobuje závažné HON a taktéž byla popsána pozdní potransfuzní hemolytická reakce.

#### Wr<sup>a</sup> a Wr<sup>b</sup>

Wr<sup>a</sup> a Wr<sup>b</sup> jsou antithetické antigeny (Wren a Issitt 1988). Četnost výskytu Wr<sup>a</sup> je kolem 0,1% u bělošské populace; výskyt u ostatní populace nebyl ještě dostatečně prostudován. Všichni Wr(a-) jedinci jsou Wr(b+), s výjimkou jedinců, kteří jsou GPA

deficientní.  $Wr^b$  je místem interakce mezi band 3 a GPA. Mutace aminokyseliny 658 (Glu→Lys) na pruhu 3 definuje jednotlivě  $Wr^b$  a  $Wr^a$ .

Anti- $Wr^a$  je relativně běžně se vyskytující přirozená protilátka, která se nalézá asi v 1% všech krevních vzorků. Často se vyskytuje u jedinců se senzibilizovanými protilátkami a u pacientů s AIHA onemocněním. Anti- $Wr^a$  aglutinuje erythrocyty v solném prostředí a reaguje silněji při pokojové teplotě, než při 37°C.

Anti- $Wr^b$  se relativně často objevuje v podobě autoprottilátky u onemocnění AIHA.

Klinický význam:

Anti- $Wr^a$  způsobuje potransfuzní hemolytické reakce a HON.

Auto-anti- $Wr^b$  je zodpovědný za smrtelné hemolýzy[1,3].

## 10. PRAKTICKÁ ČÁST

Transfuzní oddělení Vojenské nemocnice Střešovice (ÚVN) v Praze je součástí konsolidovaného pracoviště OKBHTO (oddělení hematologie, biochemie a krevní transfuze).

Na transfuzním oddělení vyšetřujeme screening erythrocytárních protilátek dvěma metodami: metodou pevné fáze - Capture, která se provádí na plně automatizovaném přístroji firmy ImmucorGamma –GALILEO a na gelovém systému DIANA společnosti GRIFOLS.

### 10.1. PRINCIPY METOD

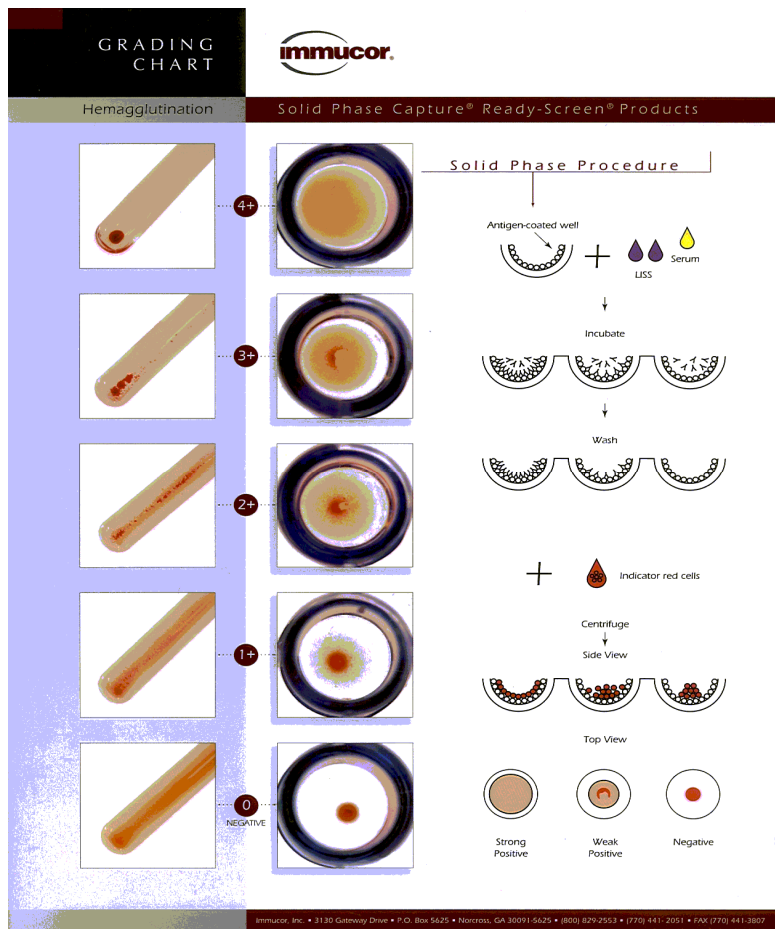
#### 10.1.1 Capture metoda

Capture-R Ready-Screen, metoda pevné fáze je modifikovanou metodou detekce protilátek, která je založena na postupech podle: Plapp a spol.<sup>5</sup> a Juji a spol.<sup>6</sup> Membrány erythrocytů jsou navázány a vysušeny na povrchu jamek polystyrénových mikrodestiček. Membránové antigeny jsou používány k vazbě specifických antierythrocytárních protilátek, přítomných v plazmě nebo sérech pacientů a dárců. Po krátké inkubaci jsou nenavázané zbytkové imunoglobuliny vyprány z jamek a přidává se suspenze indikátorových erythrocytů s navázanou anti-IgG. Centrifugace vede ke kontaktu indikátorových erythrocytů s protilátkami, vázanými na imobilizované membrány diagnostických erythrocytů. V případě pozitivity jsou indikátorové erythrocyty zadrženy na dně jamek tím, že na

povrchu imobilizované reagenční vrstvy vytvoří pevné anti-IgG-IgG komplexy. Následkem tohoto přemostění se indikátorové erythrocyty připojují ke screeningovým krvinkám jako druhá imobilizovaná vrstva. Naproti tomu v případě nepřítomnosti interakce mezi antigenem a protilátkou (negativní test), nejsou indikátorové erythrocyty zadrženy vazbou při jejich migraci a usadí se uprostřed mikrotitračních jamek jako pevně stmelené, dobře definovatelný terčík. Obrázek 8 znázorňuje popis postupu metody a zároveň porovnání reakcí se zkumavkovým testem.

Pro vyšetření erythrocytárních protilátek u dárců krve používáme Capture-R Pool. Obsahují navázané a vysušené erythrocytární membrány směsi, tvořené erythrocyty 0 od dvou dárců.

Pro vyšetření erythrocytárních protilátek u pacientů používáme Capture-R Ready-Screen(3). Obsahují navázané a vysušené erythrocytární membrány skupiny 0 od 3 různých dárců, a čtvrtá jamka je využita jako pozitivní kontrola obsahující IgG senzibilizované membrány erythrocytů.

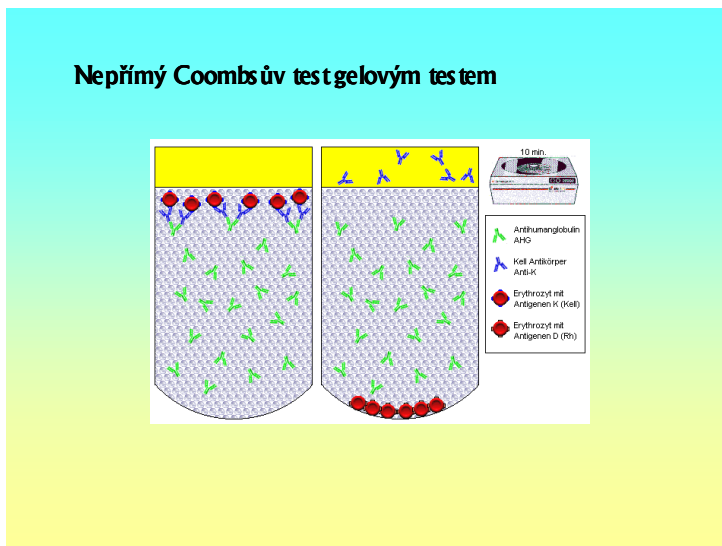


Obrázek 8: Popis postupu metody Capture

### 10.1.2. Princip metody gelového systému DIANA

Princip testu je založen na gelové technice popsané pro detekci aglutinačních reakcí červených krvinek Y. Lapierrrem. K aglutinaci dochází, když se na antigeny červených krvinek naváží odpovídající protilátky přítomné v reagenzii nebo ve vzorku séra či plazmy.

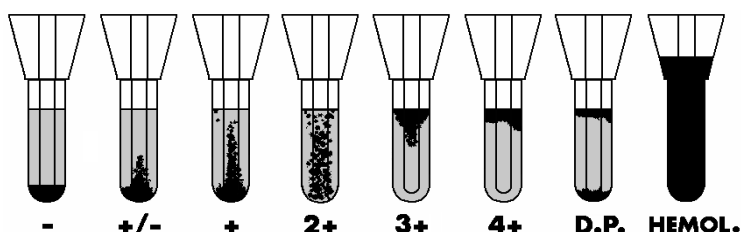
Karta DG Gel je tvořena plastovým nosičem, který se sestává z 8 mikrozkušavek. Každá mikrozkušavka je tvořena sloupcem a reakční/inkubační komůrkou. Každý sloupec obsahuje polymerizované mikročástice dextransu v pufovaném médiu, které slouží jako filtr. Částice dextransu jsou smíšeny s reagenzií, která obsahuje lidský antiglobulin. Během centrifugace jsou aglutináty červených krvinek v závislosti na jejich velikosti zachyceny na povrchu nebo uvnitř gelového sloupce. Neaglutinované červené krvinky procházejí ke dnu mikrozkušavky.



Obrázek 9: Gelový systém

Velikost gelových mikročástic byla pečlivě volena tak, aby aglutinované erythrocyty byly během centrifugace karty zachycovány v gelovém sloupci a naopak, aby volné erythrocyty snadno sedimentovaly na dno mikrozkušavky. Podle konečného rozmístění krvinek v gelovém sloupci je možné provést vyhodnocení výsledků příslušného testu (viz obrázek 10)[13].

#### Interpretace výsledků



- 4+ kompletní aglutinace v horní části gelového sloupce
  - 3+ 80% krvinek v horní třetině gelového sloupce
  - 2+ 80% krvinek ve dvou horních třetinách gelového sloupce
  - 1+ 80% krvinek ve dvou dolních třetinách gelového sloupce
  - +/- 100% krvinek v dolní třetině gelového sloupce
    - 100% krvinek na dně gelového sloupce
- D.P. dvojí populace    HEMOL. hemolýza

Obrázek 10: Interpretace výsledků

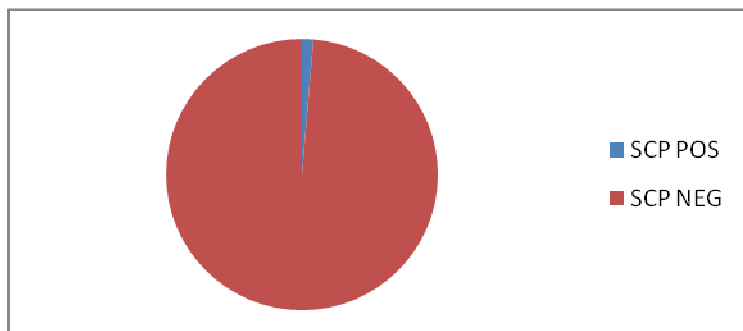
## 10.2. Frekvence záchytu protilátek na transfuzním oddělení ÚVN Střešovice

Na transfuzním oddělení ÚVN Střešovice bylo za období od 1.1.2002 do 20.4.2010 vyšetřeno, metodou Capture a gelovým systémem DIANA, celkem 128 048 screeningu erytrocytárních protilátek. Z tohoto počtu bylo 1702 pozitivních vyšetření, viz tabulka č. 10.

Tabulka 10: Screening protilátek - výsledky vyšetření

Výsledek vyšetření	počet	%
negativní	126 346	98,68
pozitivní	1702	1,32

Graf 1: Screening protilátek - výsledky vyšetření

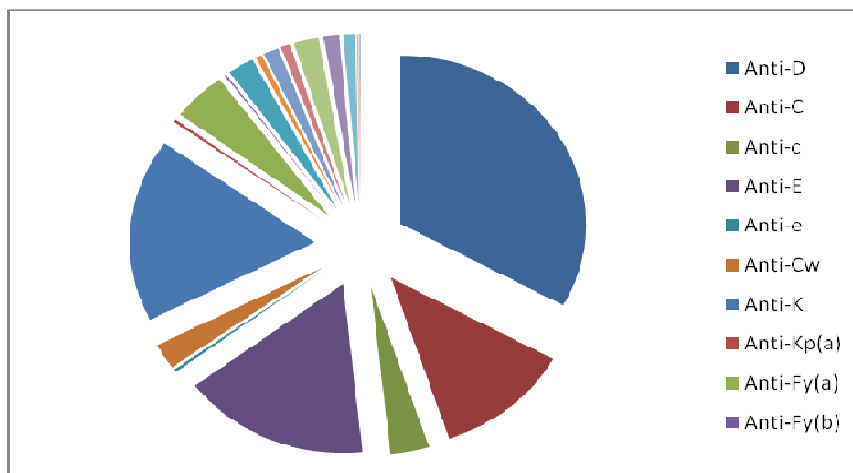


U pozitivních výsledků screeningu erytrocytárních protilátek byla provedena identifikace protilátky či směsi protilátek. Bylo identifikováno celkem 737 antierytrocytárních protilátek. Zastoupení jednotlivých protilátek udává tabulka 11.

Tabulka 11: Počet a procentuální zastoupení jednotlivých protilátek, u kterých byla zjištěna specifita antierytrocytárních protilátek na transfuzním oddělení ÚVN Praha v období od 1.1.2002 do 20.4.2010.

<b>Protilátka</b>	<b>Počet</b>	<b>%</b>
Anti-D	243	32,97
Anti-C	88	11,95
Anti-c	25	3,39
Anti-E	121	16,42
Anti-e	2	0,27
Anti-Cw	18	2,44
Anti-K	129	17,5
Anti-Kp(a)	2	0,27
Anti-Fy(a)	35	4,74
Anti-Fy(b)	1	0,14
Anti-Le(a)	17	2,31
Anti-Le(b)	4	0,54
Anti-Jk(a)	10	1,35
Anti-Jk(b)	6	0,81
Anti-M	16	2,18
Anti-S	10	1,35
Anti-Lu(a)	8	1,09
Anti-P1	1	0,14
Anti-PP1	1	0,14
<b>Celkem</b>	<b>737</b>	

Graf 2 Procentuální zastoupení jednotlivých protilátek na TO UVN Praha



## 11. DISKUSE

Od objevení ABO systému v roce 1900 byly objeveny další erytrocytární antigeny. Od roku 1945, kdy byly vyvinuty antiglobulinový test, detekující protilátky IgG, enzymový test a roztok o nízké iontové síle (LISS), byly objeveny další skupinové systémy. Dnes je již známo, jak již bylo uvedeno v úvodu, kolem 270 antigenů.

Pomocí dostupné laboratorní technologie jsou erytrocytární antigeny velmi dobře prozkoumány, jejich molekulární struktura, biochemické vlastnosti a jejich schopnosti imunologické odpovědi.

V osmdesátých letech 20. století byla vyvinuta první generace sloupcových (gelych) testů, založeny na nepřímém antiglobulinovém testu. V devadesátých letech byly vyvinuty metody na mikrotitračních destičkách založené na technice „pevné fáze“. Pomocí těchto citlivých testů jsou v laboratořích schopny zachytit protilátky, a tím připravit kompatibilní krevní transfuzi pro potřebu příjemce a předcházet tím nepříznivým imunologickým reakcím.

Detekce erytrocytárních protilátek *in vitro* je důležité vzhledem k tomu, že tyto protilátky *in vivo* mohou způsobovat urychlené odbourání (hemolýzu) erytrocytů, nesoucích příslušné antigeny.

Erytrocytární protilátky mohou způsobovat:

- 1) těžké hemolytické potransfuzní reakce následkem transfuze dárcovy krve s krevními antigeny, proti kterým jsou tyto protilátky zaměřeny

## Ostatní krevněskupinové systémy

- 2) hemolytické onemocnění novorozence a plodu v případě, kdy těhotná žena vytvoří IgG erytrocytární protilátky proti krevním antigenům na erytrocytech svého dítěte, tyto protilátky projdou placentární bariérou a následně erytrocyty dítěte destrukují.
- 3) pokud má jedinec erytrocytární protilátky namířené proti antigenu přítomnému na jeho vlastních erytrocytech, nastává autoimunní reakce. Tyto protilátky pak mohou vést k destrukci vlastních erytrocytů.

V praktické části této práce je shrnut záchyt jednotlivých protilátek na transfuzním oddělení Ústřední vojenské nemocnice Střešovice za období od 1.1.2002 do 20.4.2010. Do seznamu záchytu protilátek byly zahrnuty i protilátky Rh systému. I když popis Rh systém není součástí této bakalářské práce, přesto jsem zaevidovala i jejich záchyt, z důvodu toho, že patří mezi klinicky velice významné erytrocytární protilátky. Do Rh systému patří antigeny D, C,c, E, e a Cw. Poslouží nám zde i pro potvrzení pravdivosti literárních zdrojů o časnosti průkazu protilátek ostatních krevněskupinových systémů. Mezi klinicky důležité erytrocytární protilátky patří: anti-D, anti-C, anti-c, anti-E, anti-e, anti-K, anti-k, anti-Fy<sup>a</sup>, anti-Fy<sup>b</sup>, anti-Jk<sup>a</sup>, anti-Jk<sup>b</sup>, anti-S a anti-s.

Na transfuzním oddělení UVN Střešovice bylo vyšetřeno od 1.1.2002 do 20.4.2010 128 048 screeningů protilátek, z nichž bylo specificky identifikováno 737 antierytrocytárních protilátek. Výskyt nad 3% z celkově identifikovaných protilátek, je zaznamenán v tabulce 12.

Tabulka 12 Výskyt nad 3% z celkově identifikovaných protilátek na TO-UVN Praha

<b>Protilátka</b>	<b>Počet</b>	<b>%</b>
Anti-D	243	32,97
Anti-K	129	17,5
Anti-E	121	16,42
Anti-C	88	11,95
Anti-Fy(a)	35	4,74
Anti-c	25	3,39



## 12. ZÁVĚR

Záměrem této práce bylo shrnout charakteristiku jednotlivých erytrocytárních antigenů, kromě ABO a Rh systémů, a na základě dostupné literatury a zkušenosti jejich autorů poukázat na potenciální nebezpečí některých protilátek a naopak zmírnit obavy z jiných.

Práce předkládá základní popis antigenů a protilátek proti nim, jejich biochemický charakter a případný vliv protilátek na organismus po podání krevních transfuzí, či během těhotenství, pokud nejsou tyto protilátky včas zachyceny dostupnými testy. Upozorňuje na možnost spojení s jinými onemocněními, jako např. rezistenci vůči *Plasmodium vivax* u jedinců s fenotypem Fy (a-b-), či spojitost krevního systému Kidd s transportem urey.

Vzhledem k tomu, že k dnešnímu dni je známo kolem 270 antigenů, které jsou rozděleny do 26 systémů, představuje tato práce jen malou část z celkového množství známých erytrocytárních antigenů.

**13. SEZNAM LITERATURY**

- [1] Klein Harvey G., Anstee David J., Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 11th edition, Přepřacováno 10th edition written by P.L. Mollison, C.P. Engelfriet, Marcela Contreras: Blackwell, 2005. s. 209-253. ISBN 978-0632-06454-0
- [2] Daniels Geoff, Human Blood Groups, 2th Edition: Blackwell Science Ltd. 2002, s. 4-472, ISBN 978-0-6320-5646-0
- [3] Roback John D., Combs Martha Rae, Grossman Brenda J., Hillyer Christopher D., Technical Manual, 16th Edition, AABB, 2008, s.411-434. ISBN 978-1-56395-260-9
- [4] Schenkel-Brunner Helmut, Human Blood Groups Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity, 2th Edition, Springer WienNewYork 2000, s. 184-588. ISBN 3-211-83471-0
- [5] Reid Marion E., Lomas-Francis Christine, The Blood Group Antigen, 2th Edition, Academic Press, 2007, s.29-501, ISBN 978-0-12-586585-2
- [6] Daniels Geoff, Bromilow Imelda, Essential Guide to Blood Groups, Blackwell, 2007, s. 45-59, ISBN 978-1-4051-5349-2
- [7] . Issitt Peter D., Anstee David J., Applied Blood Group Serology, 4th edition 1999, s 614
- [8] Hrubíško M a kol., Hematologie a krevní transfuze II, 1983, s. 35-36
- [9] Písačka M., Transfuze a Hematologie dnes číslo 2/Ročník 12, červen/2006, Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, s. 107-108, ISBN 1213-5763
- [10] Banzetová Helena, Transfuze a Hematologie dnes číslo 2/Ročník 13, červenec/2007, Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, s. 89-93, ISBN 1213-5763
- [11] C.P. Engelfriet, A.J. Meulenbroek, Imunohematology, 2003, Sanquin, ISBN 90-5267-029-3
- [12] návod Capture-R Screen, ImmucorGamma, Insert code 346-10, Rev 12/05
- [13] návod DG Gel Coombs, Diagnostics Grifols, S.A., revize 10/2003