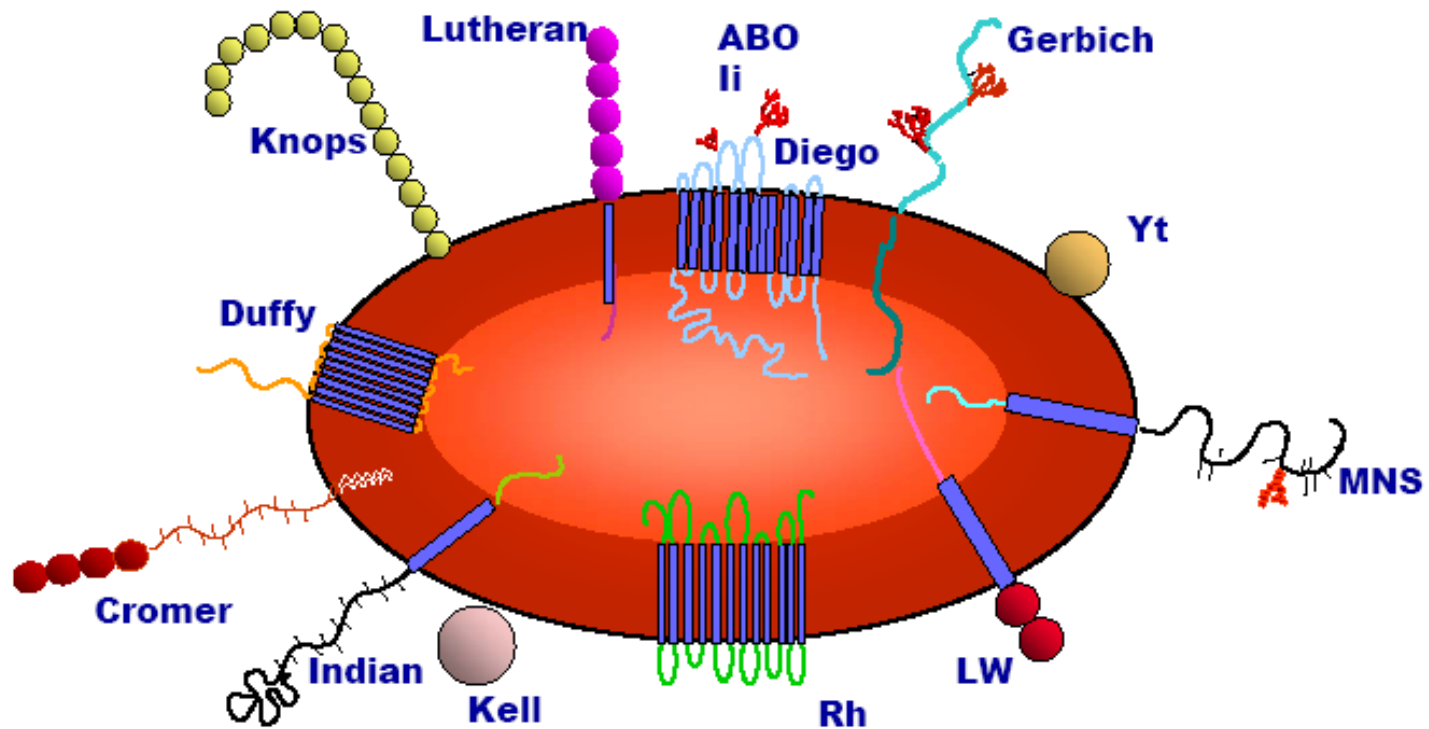


# Krevní skupiny erytrocytů

# Blood Groups on the RBC



# Krevní skupiny /skupinové systémy

- Krevní polymorfizmy
- Antigeny na povrchu membrány erytrocytů
- Produkty jednoho genu nebo komplexu vzájemně souvisejících genů
- Bialelické systémy
- Podléhají pravidlům mendeliánské dědičnosti
- Dnes 26 skupinových systémů s 270 antigeny

# Krevní skupiny

- Syntéza:
  - přímo na erytrocytech (nerozpustná forma)
  - v plazmě nebo tělních tekutinách (rozpustná forma)
  - adsorpce z plazmy nejen na erytrocyty, ale také na jiné buňky (nejen krevní, ale i ostatní tkáňové)
- Některé skupiny jsou histokompatibilní (ABO)
- Sloučeniny proteinové nebo sacharidové s biologickými funkcemi
- Detekovatelné různými metodami / serologicky, precizně DNA analýzou
- Aloantigeny, vznikají proti nim protilátky

# Rozdělení krevních skupin podle funkce v erytrocytu

## 1. Strukturální skupiny

- Integrální membránové proteiny (traverzují x-krát membránou nebo mají extracelulární N-nebo C-zakončení)

## 2. Funkční skupiny

- Udržují integritu buňky
- Transportéry
- Aktivní enzymy
- Receptory pro ligandy, adhezivní funkce



# Terminologie

ISBT terminologie od r.1980, kontinuální up-date, databaze.

Numerické označení:

- Šestimístné číslo pro antigen (005001 Lu<sup>a</sup>)
- První trojčíslí pro systém (005 Lutheran)
- Druhé trojčíslí identifikuje antigen (001Lu<sup>a</sup>)
- Systému odpovídá abecední symbol (LU, např. LU 1)
- V genotypu oddělení místem nebo \* (LU 1, LU\*1)
- Ve fenotypu znaménko + a – pro přítomnost nebo nepřítomnost antigenu (LU:-1,2)

Alternativní označení (běžně používané):

- LU:-1,2 odpovídá fenotyp  $\text{Lu}(a-b+)$
- LU:-1.-2 odpovídá  $\text{Lu}_{\text{null}}$  nebo  $\text{Lu}(a-b-)$
- DO:1,2,3,4,5 odpovídá  $\text{Do}(a+b+)$   $\text{Gy}(a+)$   $\text{Hy}+$   $\text{Jo}(a+)$



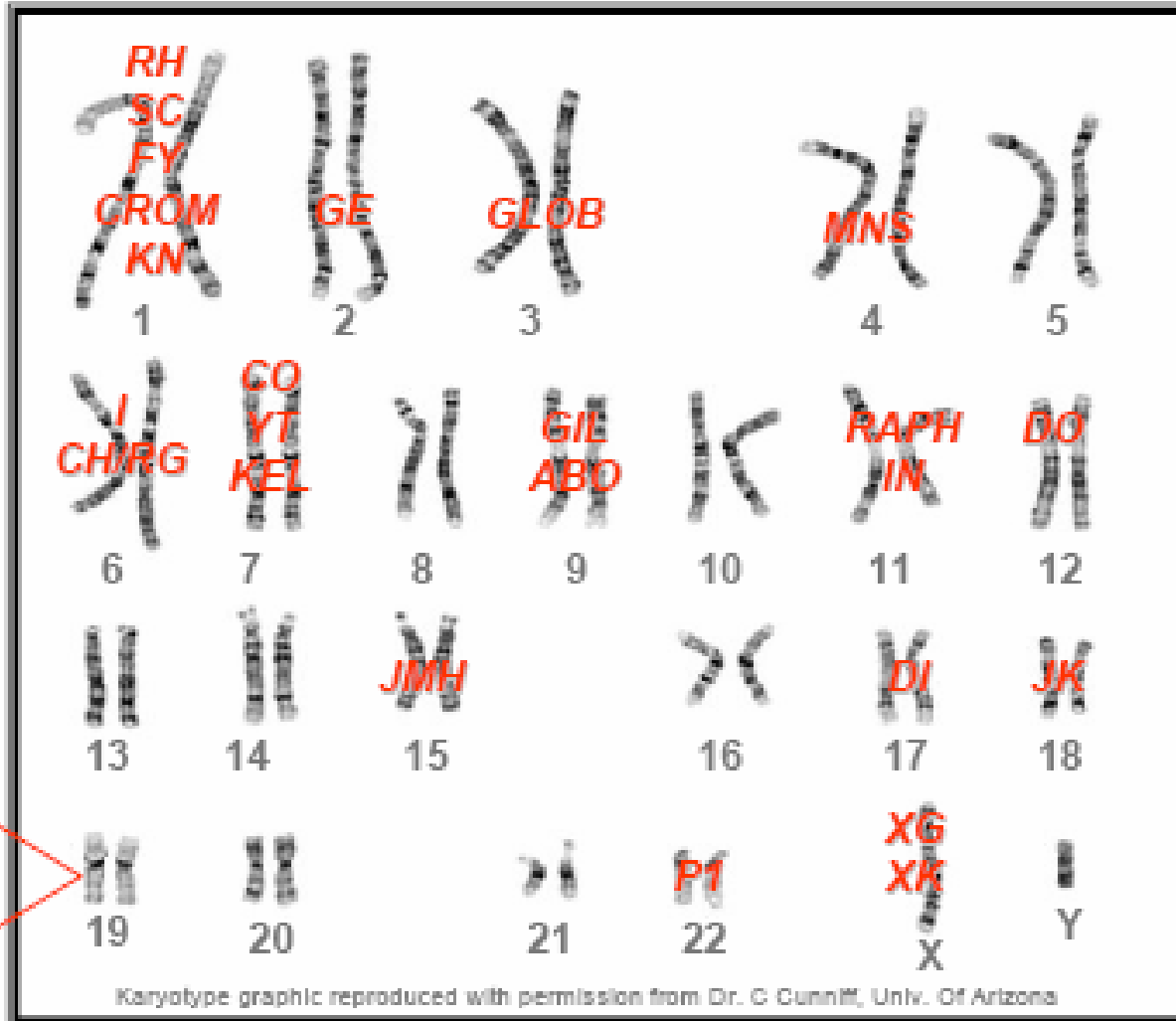
Table of examples of phenotype designations

Numerical terminology	Alternative terminology
ABO:- 1,- 2,- 3	O
ABO:1,- 2,3,4	A <sub>1</sub>
ABO:1,- 2,3,- 4	A <sub>2</sub>
MNS:1,2,- 3,4,5,- 6,7	M+ N+ S- s+ U+ He- Mi(a+) (in ISBT order)  Symbols such as Mi.III or GP.Mur, En(a-), M <sup>k</sup> are all acceptable
P:1	P1+ or P <sub>1</sub>
P:-1	P1- or P <sub>2</sub> (if shown to be GLOB:1)
RH:1,2,- 3,4,5,- 8,- 32,33,- 36	D+ C+ E- c+ e+ C <sup>w-</sup> Rh:-32,33 Be(a- ) (in ISBT order)  The order D C c E e would be an acceptable alternative. Probable genotypes as phenotypes (e.g. R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> or DCE/dCE; R <sub>1</sub> r C <sup>w+</sup> or DCE/dce C <sup>w+</sup> ) are acceptable, providing it is made clear that they are only probable genotypes based on haplotype frequencies.  Null and mod phenotypes: Rh <sub>null</sub> ; Rh <sub>mod</sub> .
LU:- 1,2,3,4	Lu(a- b+) Lu:3,4.  Null phenotype: Lu <sub>null</sub> or Lu(a- b- )
KEL:- 1,2,- 3,4,5,- 6,7,11,12,13,- 17,- 21	K- k+ Kp(a- b+c- ) Ku+ Js(a- b+) K:11,12,13,-17  Null and mod phenotypes: K <sub>0</sub> or Kell <sub>null</sub> ; K <sub>mod</sub> .
FY:1,2,3	Fy(a+b+) Fy:3
FY:- 1,- 2,- 3	Fy(a- b- ) Fy:-3  Fy <sup>x</sup> may be used as a phenotype
DI:1,2,- 3,4,- 5,- 6,- 7	Di(a+b+) Wr(a- b+) Wd(a- ) Rb(a- ) WARR-
DO:1,2,3,4,5	Do(a+b+) Gy(a+) Hy+ Jo(a+)

# Dědičnost krevních skupin

- Dědičné znaky jsou řízeny určitými oblastmi chromozomů (geny)
- Geny se vyskytují v párech (gen mateřský/otcovský)
- Varianty genu na molekulární úrovni = alely
- Obvykle dvě alely pro určitý gen (bialelismus), může být i více alel v genu (genový polymorfismus)
- Každý gen kóduje vznik specifického *proteinu* (antigenu), který je typický uspořádáním aminokyselin
- Genotyp = genetická charakteristika jedince, určuje, jaké antigeny mají vznikat (dominantní i recesivní znaky)
- Fenotyp = manifestní znaky (dominantní znaky)

# Blood Groups Are Inherited As The Products of Genes



LE  
OK  
LW  
LU  
H  
JK Storry

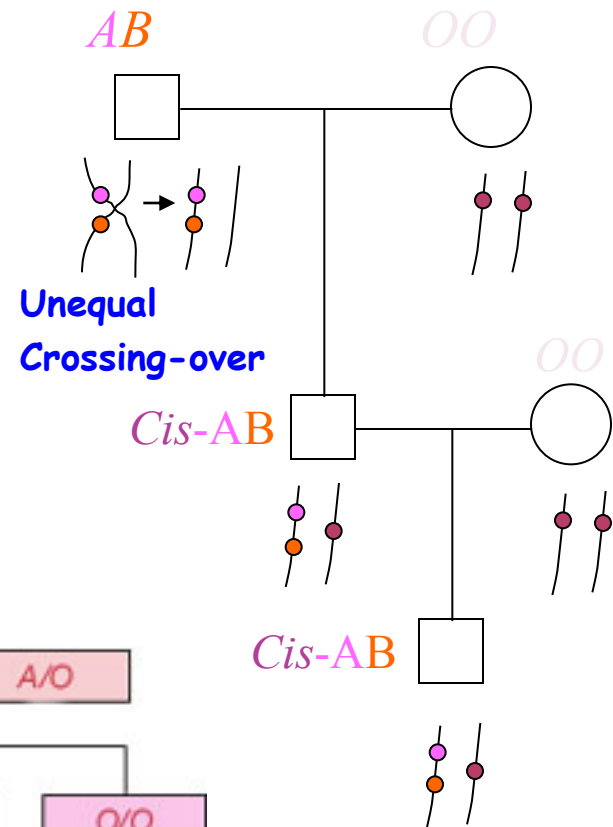
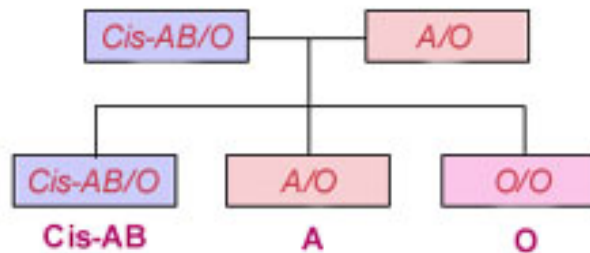
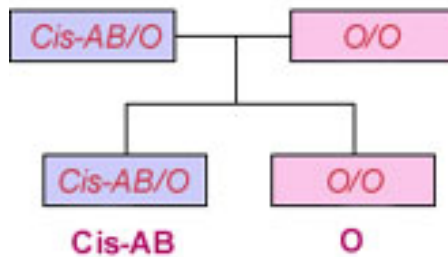
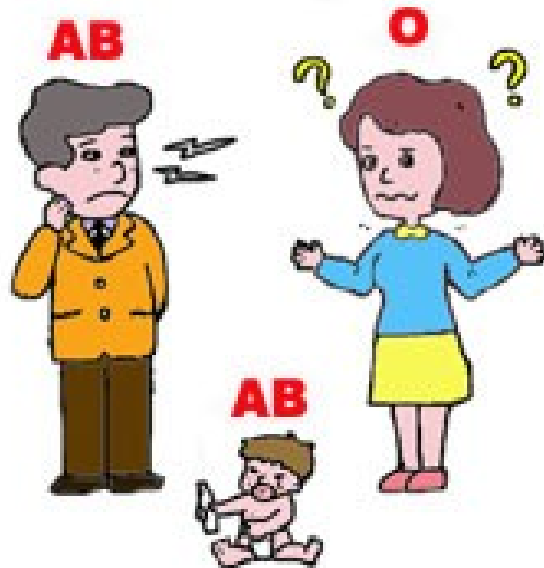
# Dědičnost krevních skupin

- Většinou bialelické systémy
- Alela zajišťuje konkrétní fenotypový projev genu
- Alela dominantní/ recesivní/ kodominantní
- Homozygotní jedinec: shodné alely v genu (A/A , B/B, 0/0)
- Heterozygotní jedinec: různé alely v daném lokusu (A/0, B/0, A/B)

## AB0 systém - dědičnost

Matka/otec Fenotyp/genotyp	00 0	AA,A0 A	BB,B0 B	AB AB
00 0	00 0	A0,00 A,0	B0,00 B,0	A0,B0 A,B
AA,A0 A	A0,00 A,0	AA,A0, 00 A,0	AB,A0, B0,00 AB,A,B,0	AA,AB, A0,B0 A,AB,A,B
BB,B0 B	B0,00 B,0	AB,A0, B0,00 AB,A,B,0	BB,B0, 00 B,0	AB,BB, A0,B0 AB,B,A
AB AB	A0,B0 A,B	AA,AB, A0,B0 A,AB,B	AB,A0, BB,B0 AB,A,B	AA,AB, BB A,AB,B

# Cis-AB

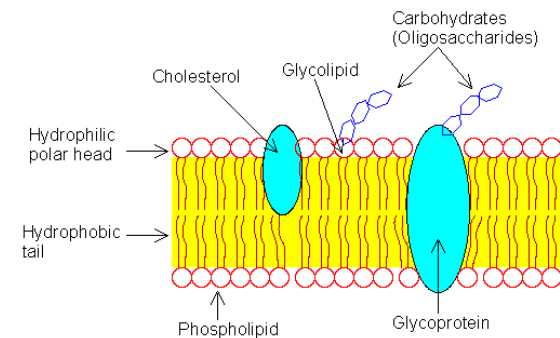


# Fenotyp a souvislost s laboratorním vyšetřením

- Větší množství antigenu (efekt dávky) u některých homozygotů proti heterozygotům
- Různá síla aglutinační reakce při serologickém vyšetření (silnější reakce u homozygotních typů)
- U některých krevních skupin: Rh, Duffy, MNSs, Kidd

# AB0 systém

- nejvýznamnější skupinový systém
- rozpoznání r.1900/Landsteiner
- AB0 gen na 9. chromozomu → alela A a/nebo B a/nebo žádná z nich u krevní skupiny 0
- Produkt genu: antigeny A a/nbo B ( jejich průkaz definuje AB0 skupinu)
- Skupina 0 (chybí geny A,B) → antigen H
- Specifické glykoproteiny nebo glykolipidy
- 4 fenotypy A ,B,AB,0





The agglutination of IgM is stronger due to the relatively large size of the IgM antibody, but the nature of the bodily reaction as a result of agglutination with IgG can be more dramatic.<sup>[7]</sup>

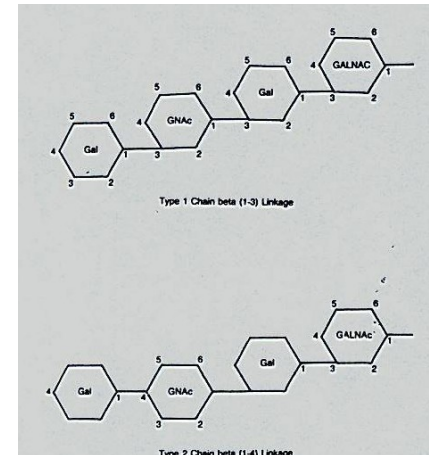
**Distribution of ABO and Rh Blood types (averages for each population)**

Population	O+	O-	A+	A-	B+	B-	AB+	AB-
Native South Americans <sup>[8]</sup>	100%		-		-		-	
Ireland <sup>[8]</sup>	52%		35%		10%		3%	
Hong Kong <sup>[9]</sup>	40%		26%		27%		7%	
Vietnam <sup>[8]</sup>	45.0%		21.4%		29.1%		4.5%	
Indigenous Australians <sup>[8]</sup>	44.4%		55.6%		-		-	
Germany <sup>[8]</sup>	42.8%		41.9%		11.0%		4.2%	
Bengal <sup>[8]</sup>	22.0%		24.0%		38.2%		15.7%	
Sami people <sup>[8]</sup>	18.2%		54.6%		4.8%		12.4%	
New Zealand <sup>[10]</sup>	38.4%	9.3%	31.8%	6.4%	8.8%	1.6%	3.2%	0.6%
Australia	40%	9%	31%	7%	8%	2%	2%	1%
Finland <sup>[11]</sup>	27%	4%	38%	6%	15%	2%	7%	1%
Sweden	32%	6%	37%	7%	10%	2%	5%	1%
Denmark <sup>[12]</sup>	35%	6%	37%	7%	8%	2%	4%	1%
France	36%	6%	37%	7%	9%	1%	3%	1%
South Korea <sup>[13]</sup>	27.4%	0.1%	34.4%	0.1%	26.8%	0.1%	11.2%	0.05%
United Kingdom <sup>[14]</sup>	37%	7%	35%	7%	8%	2%	3%	1%
United States <sup>[15]</sup>	38%	7%	34%	6%	9%	2%	3%	1%

### Other human blood group systems

# H antigen = základ pro ostatní ABO antigeny

- gen – enzym – antigen
- součinnost genů FUT1(H) na erythrocytech a FUT2 (Se) v sekrečních epiteliích
- geny kódují **H-transferázu**, která připojuje fukózu ke galaktóze prekursorové substance a vzniká **H antigen**
- H antigen *je nepřímý produkt genu*, glykanové jednotky antigenu obsahují **fukózu**



# H antigen

## Tkáňová distribuce

- FUT1 v erytroidních tkáních, endotelu, sensorických nervech
- FUT2 v sekretech exokrinních, v epitelích
- často aberantní exprese v maligních bb.

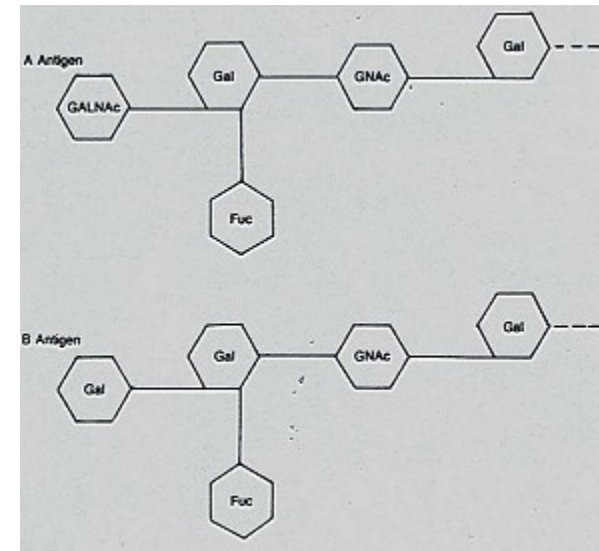
## Funkce

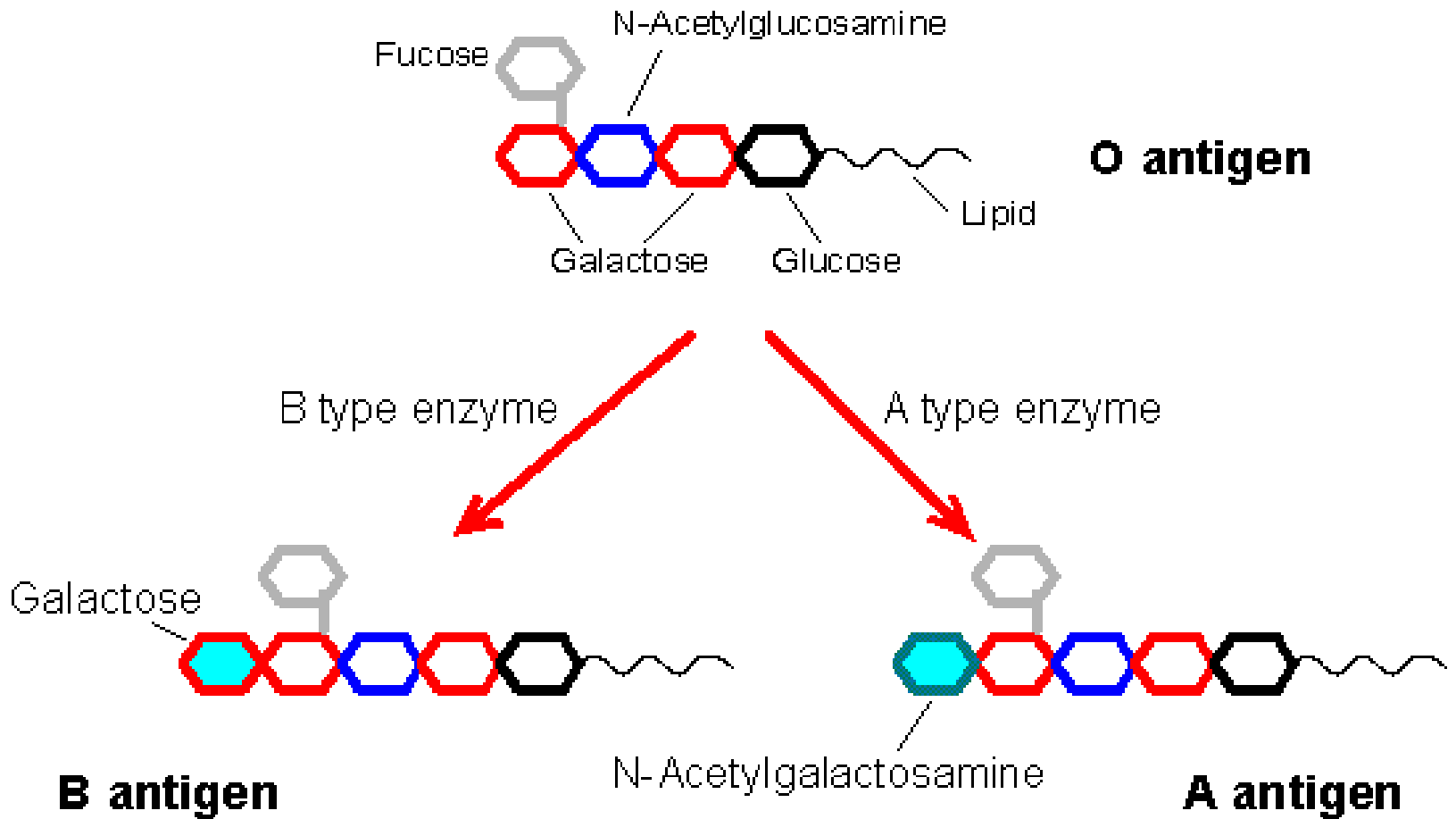
- substrát pro A a B antigeny
- prekurzor Lewis antigenu
- uplatnění v adhezi bb., receptor pro mikroorganismy

# Biosyntéza A, B antigenů

Probíhá stejným způsobem, tj. připojením sacharidů specifických pro A nebo B krevní skupinu k H antigenu. Vzniká tím specifický polysacharid A, B nebo AB.

- A alela = **A transferaza** = transfer **GalNAc** na Gal akceptor
- B alela = **B transferaza** = transfer **Gal** na Gal akceptor
- 0 alela = **neaktivní** = neprobíhá substituce oligosacharidů, má H antigen





# AB0 sekretorství (vylučovatelství)

- solubilní ABH antigeny/glykoproteiny v tělních tekutinách
- vyžadují gen FUT2(Se)
- Jedinec - nonsekretor se/se nevylučuje ABH antigeny
- 80% osob jsou sekretoři: podle AB0 skupiny mají stejné antigeny v sekretech (A+H, B+H nebo H)
- 20% osob jsou nonsekretoři: v sekretech nemají H ani A nebo B antigeny
- stanovení sekretorství: detekce **ABH substancí** (= rozpustné antigeny) ve slinách nebo geneticky

# A skupina: Podskupiny A1 a A2

## Kvantitativní rozdíly

- A1 nejfrekventovanější
- A1(A1B) silná exprese A antigenu (více aktivní enzym)
  - Počet Ag míst/ery pro A1:  $8-12 \times 10^5$   
pro A2:  $1-4 \times 10^5$

## Kvalitativní rozdíly

- A1 ery obsahují antigen A + A1
  - A2 ery obsahují pouze antigen A
- ⇒ Vznik anti-A1 protilátky u osob A<sub>2</sub> nebo A<sub>2</sub>B

# Slabé skupiny

- fenotypové změny- zeslabení A a B antigenu
- také změny antigenů v sekretech
- příčina: genové mutace, vzácné alely provázené změnou fenotypu

např.  $A_3, A_x, A_m, A_{el}, A_{end}$  /  $B_3, B_x, B_m, B_{el}$

- způsobují problémy při určení skupiny
- provází je nález nepravidelných AB0 protilátek



# Získané změny antigenů

Získaný antigen B u osob skupiny A (vzácně naopak):

- slabší reakce získaného antigenu B
- provází onemocnění GIT – deacetylase A sacharidu pomocí bakteriálních enzymů – zůstává sacharid podobný B antigenu – cross reakce s dg. sérem anti-B

Zeslabení antigenů (obvykle A antigen)

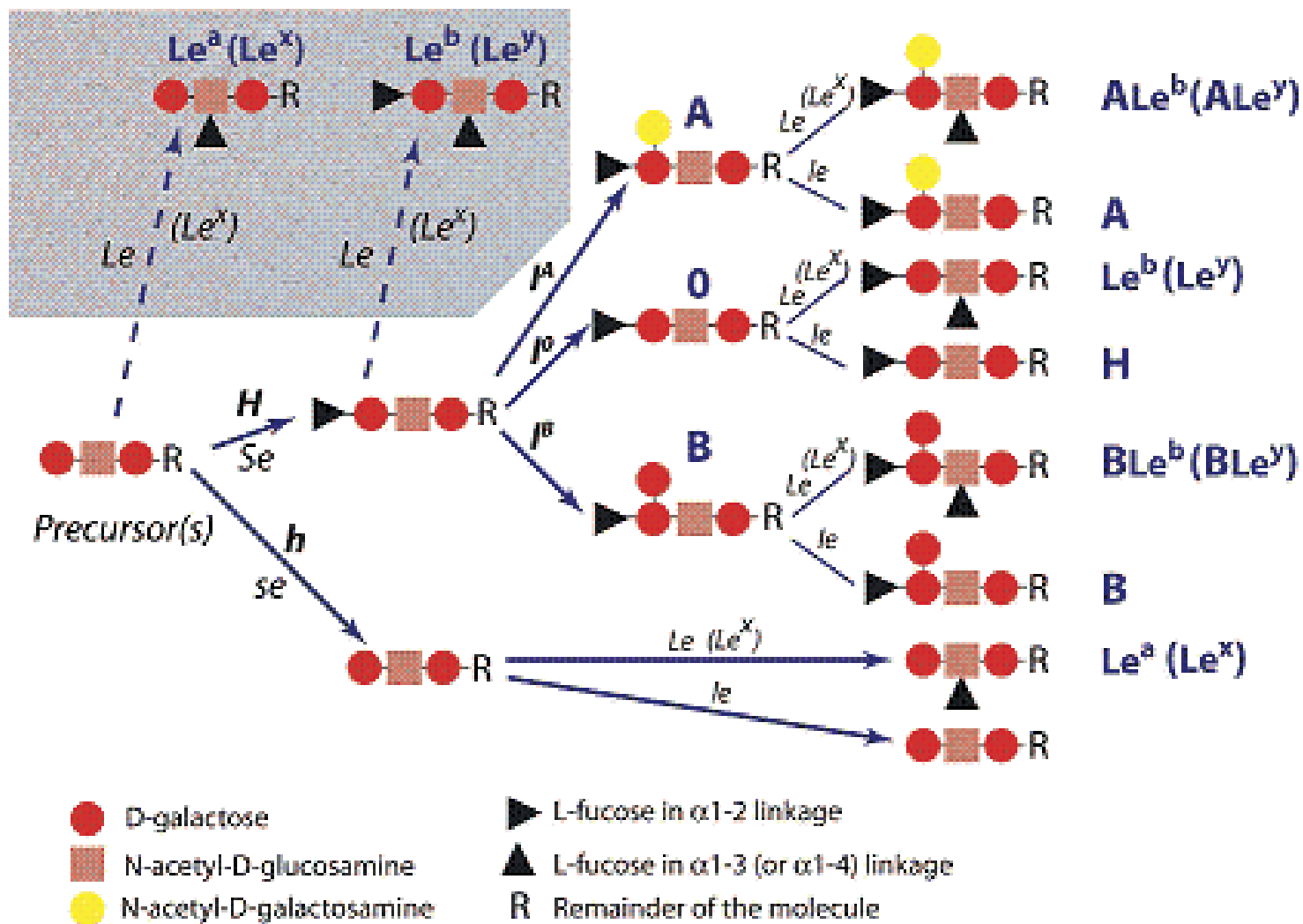
- leukemie (inaktivace A,B transferaz nebo inaktivace H transferazy se sekund. zeslabením A,B), malignity (neutralizace dg.séra solubilními A,B substancemi)

Chimérické antigeny

- potransfuzní, potransplantační, F-M krvácení, genetická chiméra

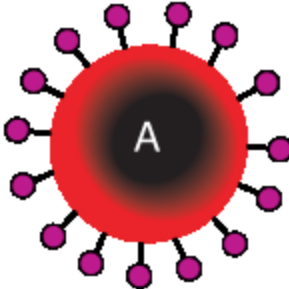
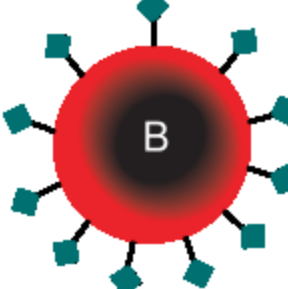
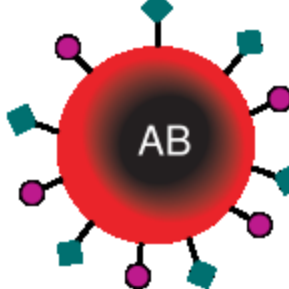
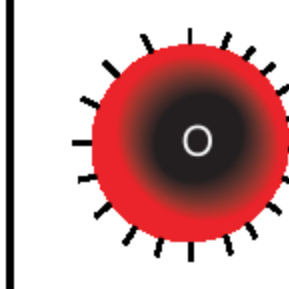
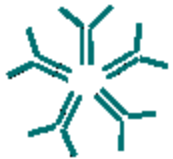

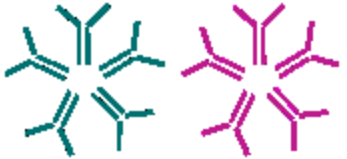



# H - deficitní fenotypy

- homozygotní forma inaktivního FUT1 genu pro syntézu H antigenu (h/h)
- nevzniká H transferáza a H antigen, chybí prekurzor pro A a B antigeny
- fenotypově skupina 0, které chybí také antigen H a má proto navíc přirozenou protilátku anti-H
- dva typy tohoto hh fenotypu:
  - nonsekretoři/**typ Bombay** (nemají antigeny H,A,B Ag na erys ani v sekretech + pravidelně mají v séru kromě anti-A a anti-B tepelnou a klinicky významnou anti-H)
  - sekretoři/**typ paraBombay** (mají H a A,B Ag v sekretech, ale ne na erys + mohou mít v séru nevýznamnou protilátku anti-HI)



# AB0 protilátky

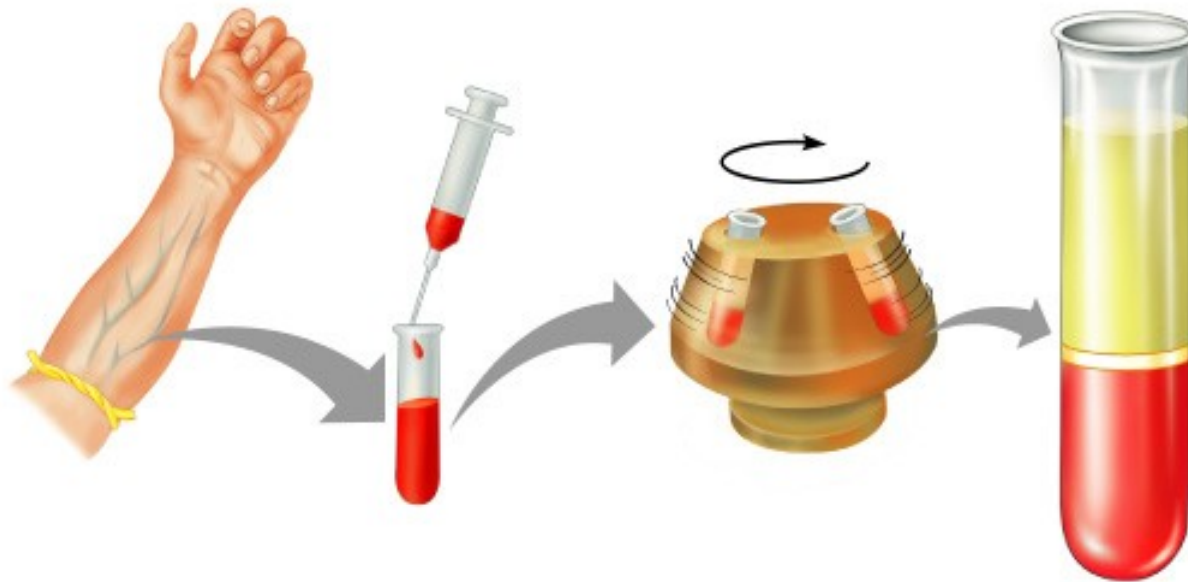
- odlišují AB0 systém od všech ostatních skupin – jsou to **pravidelné protilátky a odpovídají** AB0 antigenům
- „přirozené“ protilátky v důsledku „imunizace“ mikrobiálními substancemi podobnými A,B antigenům
- AB0 protilátky IgM, ale i IgG nebo IgA
- dvě protilátky: anti-A a anti-B/ u osob 0 také anti-A,B
- od 3.měsíce věku dostatečný titr, stacionární během života, změny při imunizujících stavech v těhotenství,
- vzácně jiný nález: novorozenci, slabé skupiny, nemoci
- transfuzích

	Group A	Group B	Group AB	Group O
Red blood cell type	 <p>A</p>	 <p>B</p>	 <p>AB</p>	 <p>O</p>
Antibodies present	 <p>Anti-B</p>	 <p>Anti-A</p>	<p>None</p>	 <p>Anti-A and Anti-B</p>
Antigens present	 <p>A antigen</p>	 <p>B antigen</p>	 <p>A and B antigens</p>	<p>No antigens</p>

## Slabé A podskupiny - serologie

Skupina	Anti-A sérum	Anti-AB sérum	Anti-A protilátka	Anti-A1 protilátka	Antigeny sliny sekret.
A <sub>3</sub>	mf	mf	ne	někdy	A H
A <sub>end</sub>	mf	mf	ne	někdy	H
A <sub>x</sub>	-/w	+	-/+	často	H (A <sub>x</sub> )
A <sub>m</sub>	-/w	-/+	ne	ne	A H
A <sub>y</sub>	-	-	ne	ne	A H
A <sub>el</sub>	-	-	někdy	ano	H

# Laboratorní vyšetření AB0 skupiny



Průkaz A,B antigenu na erytrocytech

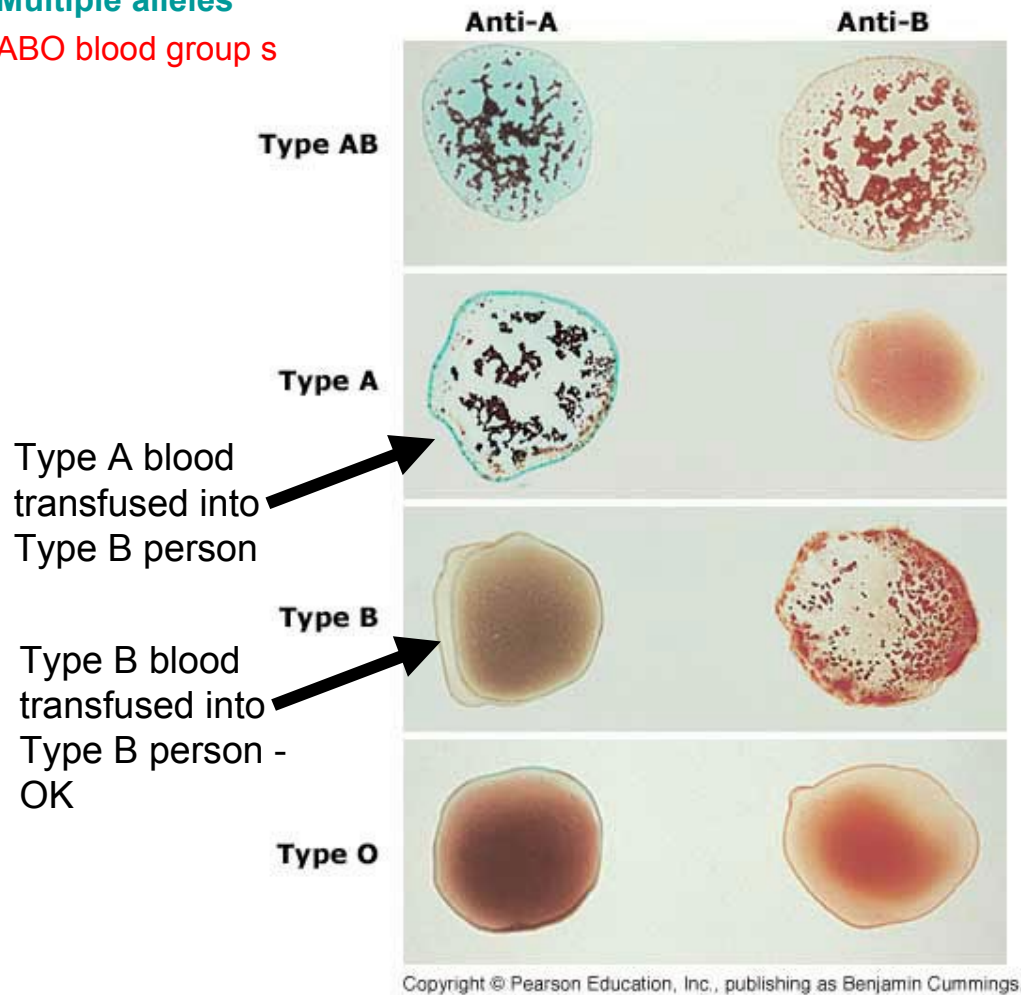
Průkaz anti-A, anti-B v plazmě/séru

# 1. Laboratorní vyšetření AB0 skupiny: AB(0) antigeny na erytrocytech

- dg.sérum anti-A, anti-B
- monoklonální séra pro přímý solný test /pokojevá T nebo polyklonální séra -A,-B,-A,B
- metoda zkumavková, sloupcová aglutinace, pevná fáze, na skle, mikrotitrační desce
- rostlinné lektiny (monoklonální séra) pro odlišení A1 podskupiny
- rutinně prováděná kontroly kvality reagensů ( kontrola dg. sér a dg. erytrocytů) = při nesouhlasu v kontrole nelze uzavřít výsledek krevní skupiny



**Multiple alleles**  
ABO blood groups



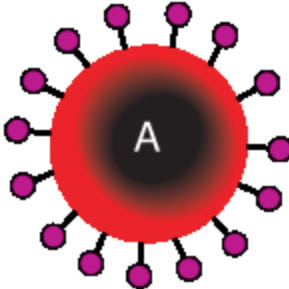
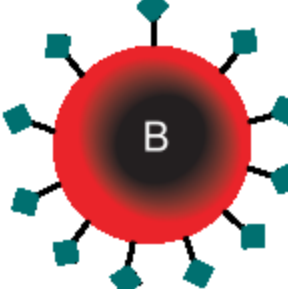
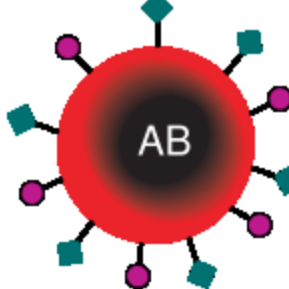
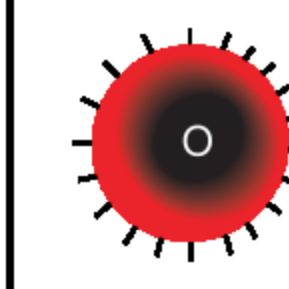
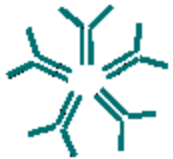

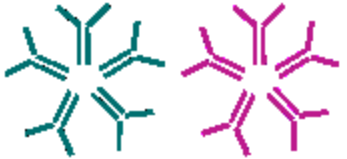



A medical problem - some blood transfusions produce lethal clumping of cells.

Don't worry about details yet...

## 2. Laboratorní vyšetření AB0 skupiny: pravidelné AB0 protilátky

- detekce pomocí dg.erytrocytů A<sub>1</sub>,B (ery 0 nebo autoctl.)
- testy pro přímou aglutinaci / pokojová teplota s inkubací (doplňující testy pro 4°C event. 37°C)
- zřetelné makroskopické reakce
- do 4. měsíce věku se nevyšetřují (chybí, mateřské Ig)

	0 (anti-A,B v séru)	A (anti-B v séru)	B (anti-A v séru)	AB(žádné protilátky)
Dg.ery 0	0	0	0	0
Dg.ery A1	+	0	+	0
Dg.ery B	+	+	0	0

	Group A	Group B	Group AB	Group O
Red blood cell type	 <p>A</p>	 <p>B</p>	 <p>AB</p>	 <p>O</p>
Antibodies present	 <p>Anti-B</p>	 <p>Anti-A</p>	<p>None</p>	 <p>Anti-A and Anti-B</p>
Antigens present	 <p>A antigen</p>	 <p>B antigen</p>	 <p>A and B antigens</p>	<p>No antigens</p>

### 3. Nepravidelné AB0 protilátky

- anti-A1 u osob A2, anti-H u osob A1
- chladový typ /RT/4°C, vzácně anti-A1 při 37°C
- nebývá klinický význam, vedlejší nálezn při vyšetření KS

	anti-A1	anti-H
Ery 0	0	+
Ery A1	+	0
Ery A2	0	+
Ery B	+++	+++



<b>A</b>	<b>B</b>	<b>AB</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>ctl</b>
human/humain					
Code 097/b 000208 0403					
4	-	4	1	2	-

- Princip serologického vyšetření všech krevních skupin je stejný: antigeny na vyšetřovaných erythrocytech detekujeme pomocí specifických diagnostických protilátek (dg. sér) v testu a technikou, které umožňují jejich průkaz. Je to naprosto dostačující pro běžné diagnostikování. U AB0 skupiny se prokazují také pravidelné AB0 protilátky.
- Genetické vyšetření umožní precizní diagnostikování skupinových antigenů, je zvláště přínosné u abnormálních forem antigenů, u transplantovaných a transfundovaných jedinců.

# AB0 diskrepance

- Při vyšetření antigenů nebo protilátek
- Diskrepance je nutné vyřešit před uzavřením výsledku
- **Pokud nelze – podávat 0 erytrocyty, AB plazmu**
- Opakovat vyšetření, provést vyšetření z nového vzorku, použít jiné reagensie spolu s kontrolami, jiné reakční teploty, promytí erys apod. dle typu problému
- Validace testů – přední x zadní řada, kontroly dg.sér

Příčiny: Technické chyby. Abnormální sérové proteiny.

Abnormální antigeny. Polyaglutinabilita. Získané, zeslabené antigeny. Nadbytek substancí. Chimérismus.

Protilátky/autoprottilátky. Imunodeficity. Jiné příčiny.

## *Aberantní reakce při vyšetření AB0 skupiny*

### **Pozitivní výsledek**

#### **Přední řada**

#### **Zadní řada**

Získaný antigen B (A) Nemoci GIT (ca, obstrukce, infekty) Karcinom pankreatu	Abs přítomné v reagentech proti Ag pacienta
Rouleau Vyšší globulinemie Vyšší fibrinogen Wartonův rosol Přítomnost makromolekul	Genetická chiméra cis-AB
Polyaglutinabilita Mikrobiální T aktivace erys Nonmikrobiální Tn aj.	AB0 protilátky v séru pacienta Anti-A1 Anti-H
Autoaglutinace Silné chladové autoprotilátky	Rouleau Vyšší globulinemie Vyšší fibrinogen Wartonův rosol Přítomnost makromolekul
Senzibilizované erythrocyty Tepelné autoprotilátky Potransfuzní reakce	Aloprotilátky v séru pacienta proti Ag dg.erythrocytů
Netypické protilátky proti složkám reagentů	Chladové auto nebo aloprotilátky

### **Negativní výsledek**

#### **Přední řada**

#### **Zadní řada**

Slabé A,B skupiny	Zeslabení nebo deficit protilátek Hypogamaglobulinemie Novorozenci, stáří Imunodeficitní stavy Imunosuprese Agamaglobulinémie
Nadbytek skupinově specif. Solubilních substancí Ca GIT Ca pankreatu Mukozní cysty ovaria	Genetická chiméra cis-AB
Zeslabení při nemoci Akutní leukemie	



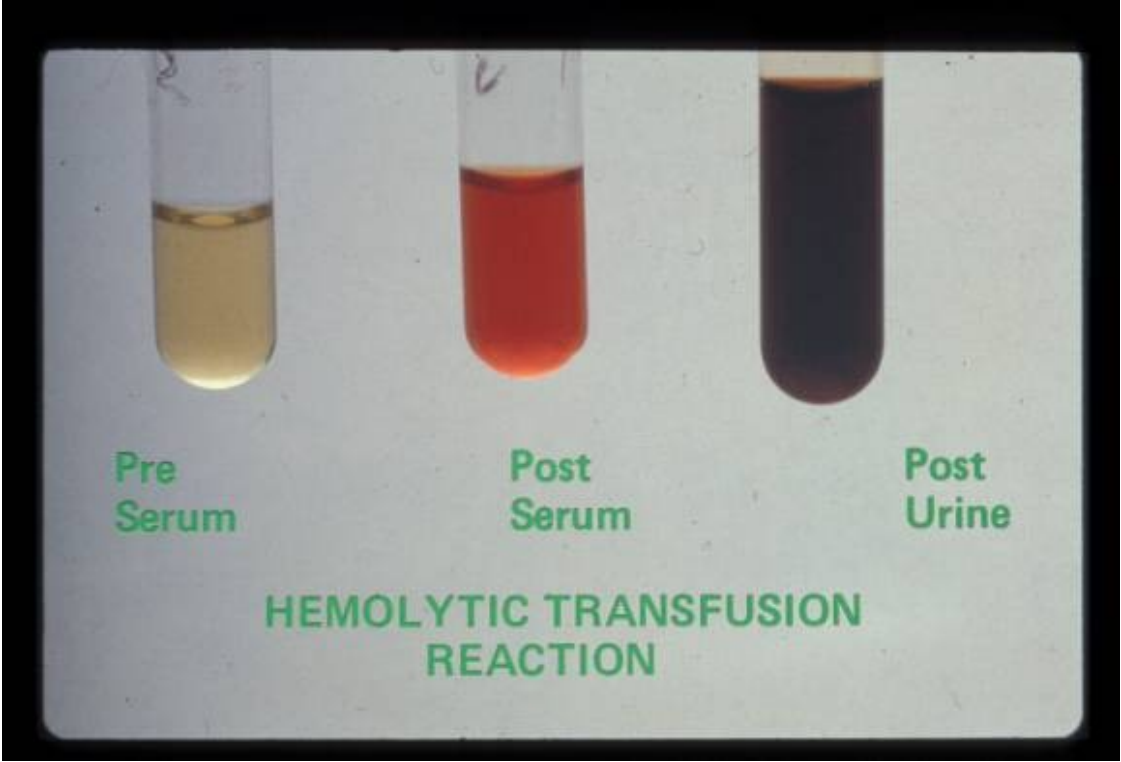
# Klinické souvislosti

Asociace s nemocemi vzácně

- H antigen: pouze v souvislosti s hyperakutní rejekcí transplantovaného orgánu u osob typu Bombay a paraBombay, u kongenitální poruchy glykosylace (není dodána fukoza do Golgiho aparátu)

Asociace s transfuzí často

- AB0 inkompatibilní krev vede k HTR a jejím komplikacím
- velká (nové antigeny dárcovské dárce A/příjemce 0 ) nebo malá inkompatibilita (nové protilátky dárcovské příjemce A/dárce 0)
- **velká inkompatibilita je pro transfuzi nepřijatelná**



Pre  
Serum

Post  
Serum

Post  
Urine

HEMOLYTIC TRANSFUSION  
REACTION

## Asociace s transplantacemi

- periferních hematopoetických kmenových bb.(PBSCT) nebo kostní dřeně (BMT)
- solidních orgánů (ledviny, srdce, játra vs. rohovka, kost)
- časně a pozdní hemolytické komplikace a rejekce graftu při velké a malé nebo oboustranné inkompatibilitě

## Asociace s HON

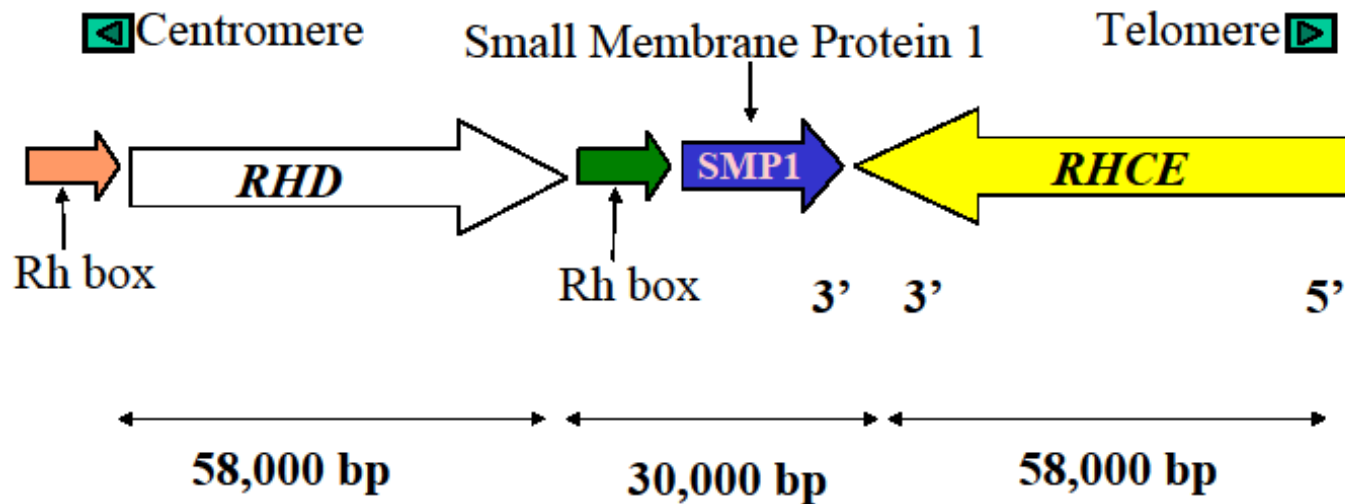
- Při AB0 typu neshody matky vs. plod (typicky matka 0)
- IgG protilátky v etiologii HON

## Uplatnění ve forensní medicíně

# Rh systém

- dva vzájemně spojené homologní geny RHCE a RHD na 1.chromozomu
- RHD gen kóduje RhD protein (antigen D. Nepřítomnost genu = chybí antigen D)
- RHCE gen kóduje RhCcEe protein (kombinace antigenů Ce,ce,cE,CE)
- RHAG gen je nutný pro Rh aktivitu: tetramerické komplexy Rh glykoproteinu s Rh proteiny
- každý gen 10 exonů
- opozitní orientace RhD a RHCE - Rh boxy – gen SMP1

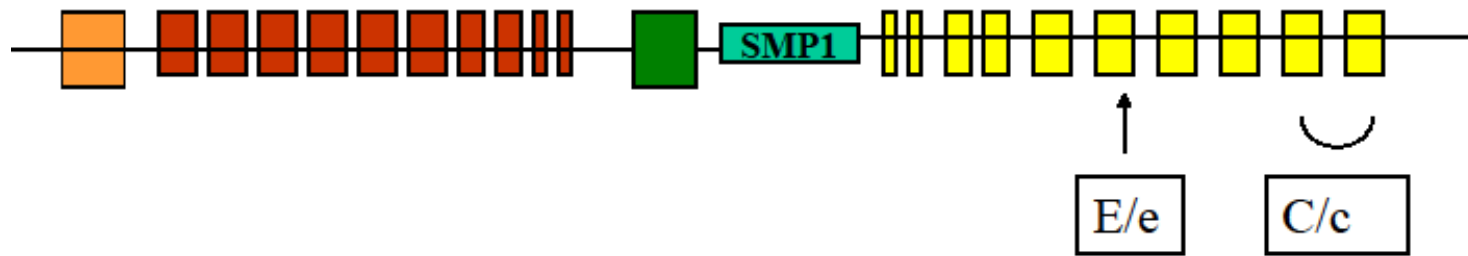
# *D* and *CE*



**Chromosome 1p34.1-1p36 (short arm). Opposing orientation.**

Wagner and Flegel. ISBT Vienna 2000

# Organisation of genes encoding RhD and CcEe



10 exons encoding the D protein plus 2 Rh boxes

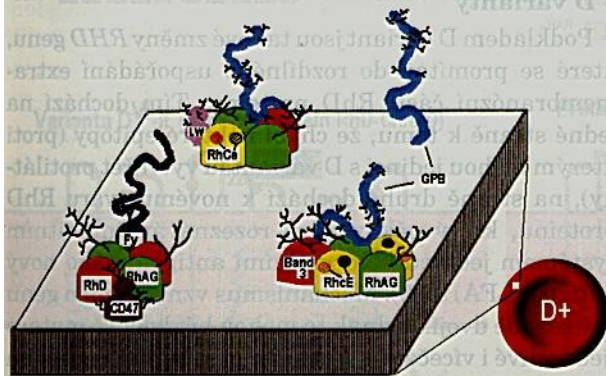
10 exons encoding the CcEe protein

RhCcEe zároveň mohou být způsobeny zesílené exprese D antigenu (u fenotypu D<sup>+</sup>/D<sup>+</sup> je tak vysoký počet D antigenů, že dochází k aglutinaci těchto krvinek i účinkem inkompletních (IgG) anti-D protilátek.

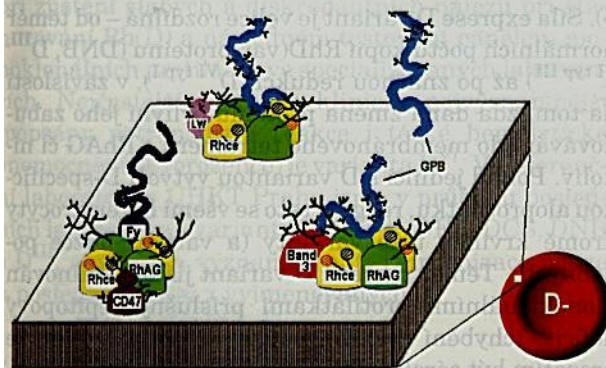
**• Rh<sub>null</sub> a Rh<sub>mod</sub> fenotypy**

Na krvinkách těchto fenotypů nejsou prokazovány žádné Rh antigeny (Rh<sub>null</sub>), nebo jsou velice zeslabené a prokazatelné jen nejcitlivějšími metodami (Rh<sub>mod</sub>). Podle způsobu dědičnosti byly rozeznávány dva typy Rh<sub>null</sub>: amorfní (heterozygotní potomci těchto jedinců – přenašeči amorfní alely, ač sérologicky vypadali jako homozygoti, přenášeli své Rh antigeny jen na 50 % potomků) a regulátorový typ (zde v potomstvu přenašečů regulátorové alely byly děděny Rh antigeny normálním způsobem). Metody molekulární biologie od-

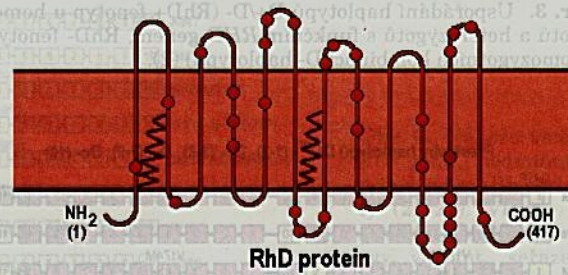
RhAG glykoproteiny. Následně je omezena i exprese ostatních struktur Rh komplexu.



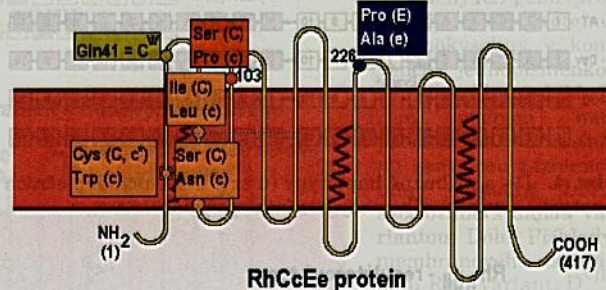
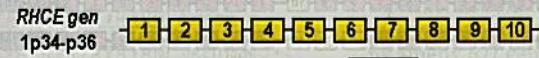
RhD<sup>+</sup> (D<sup>+</sup> C<sup>+</sup> c<sup>+</sup> E<sup>+</sup> e<sup>+</sup>) RHD-RHCE/RHD-RHcE



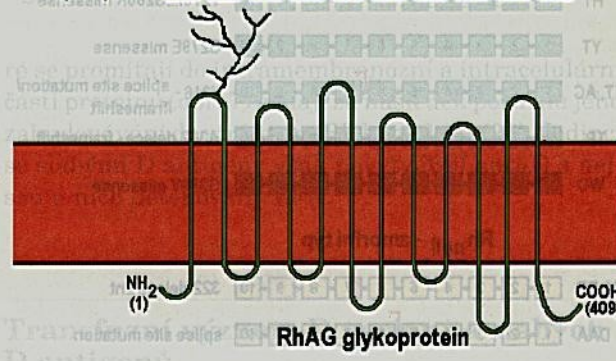
D-



RhD protein



RhCcEe protein



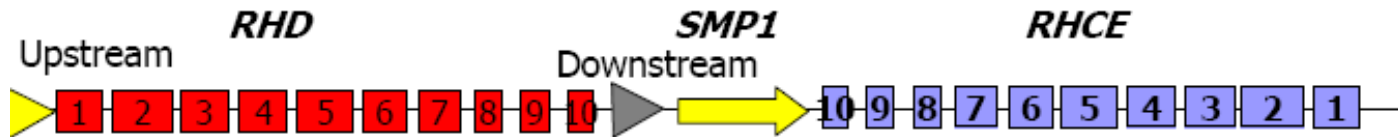
RhAG glykoprotein

Obr. 2. Schéma uspořádání RHD, RHCE a RHAG genů a předpokládaná dvourozměrná struktura proteinů RhD, RhCcEe a RhAG glykoproteinů.

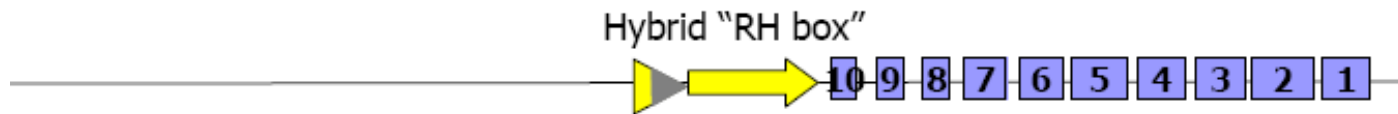
- D antigen je exprimován na membráně erytrocytu (RhD+)
- D antigen chybí na membráně erytrocytu (RhD-)
  - delece celého genu (naše populace)
  - mutace genu
  - hybridní gen
  - inaktivní RHD pseudogen
- D antigen je fenotypově odlišný' - slabší (různé genetické změny-mutace, hybridní alely, rekombinace genu- vedou ke vzniku vzácných alel, navenek se projeví změnou RhD)



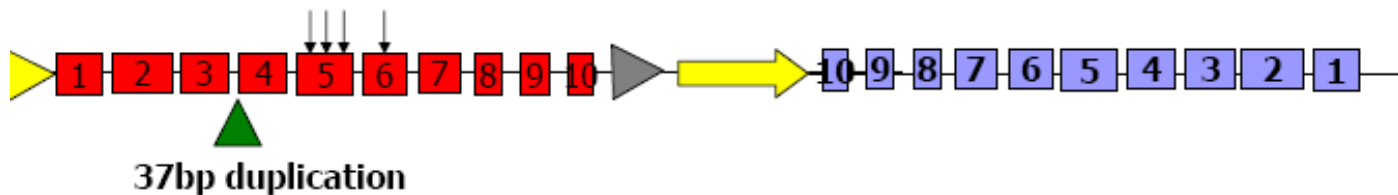
**1. Rh D Pos genome**



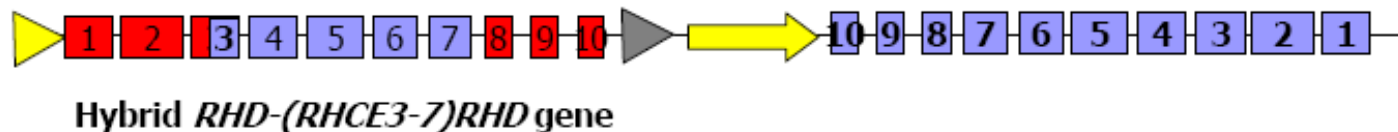
**2. Rh D Neg genome (Caucasian)**



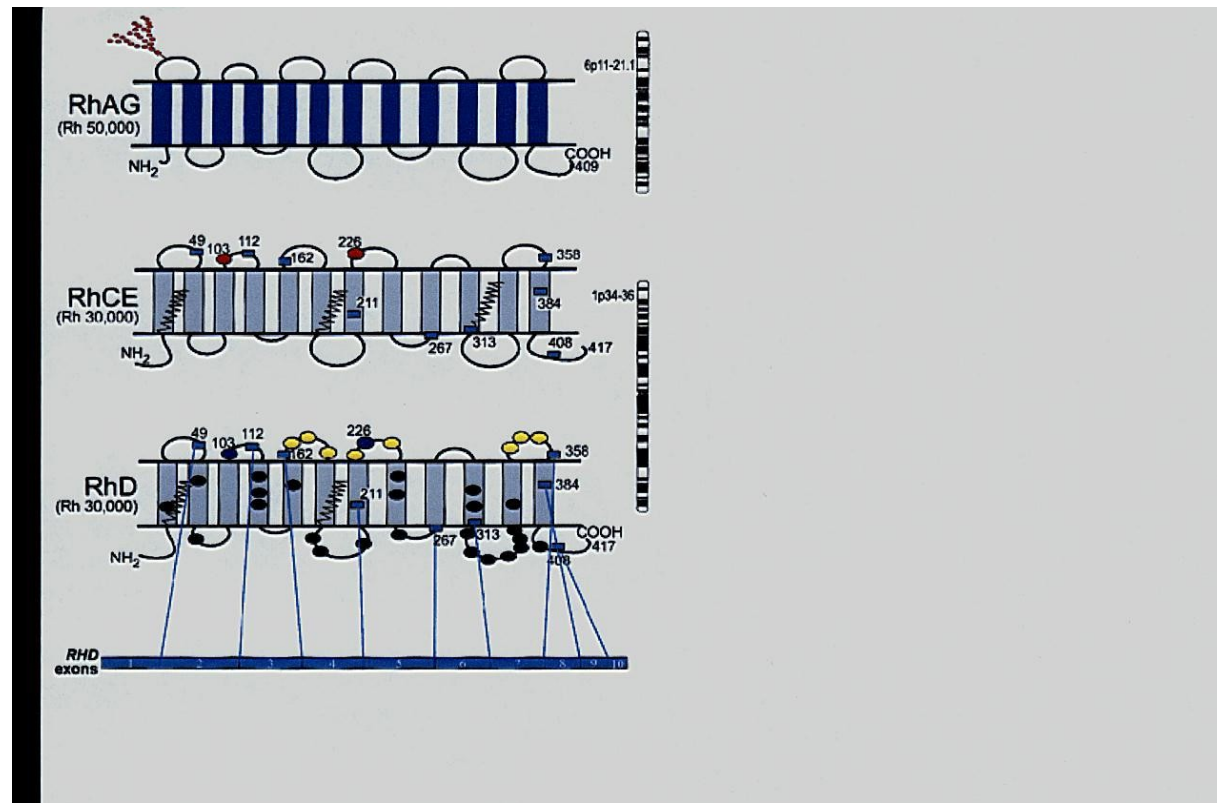
**3. Rh D Neg genome (African) *RHD<sub>ψ</sub>***



**4. Rh D Neg genome (African) *r<sup>S</sup>***



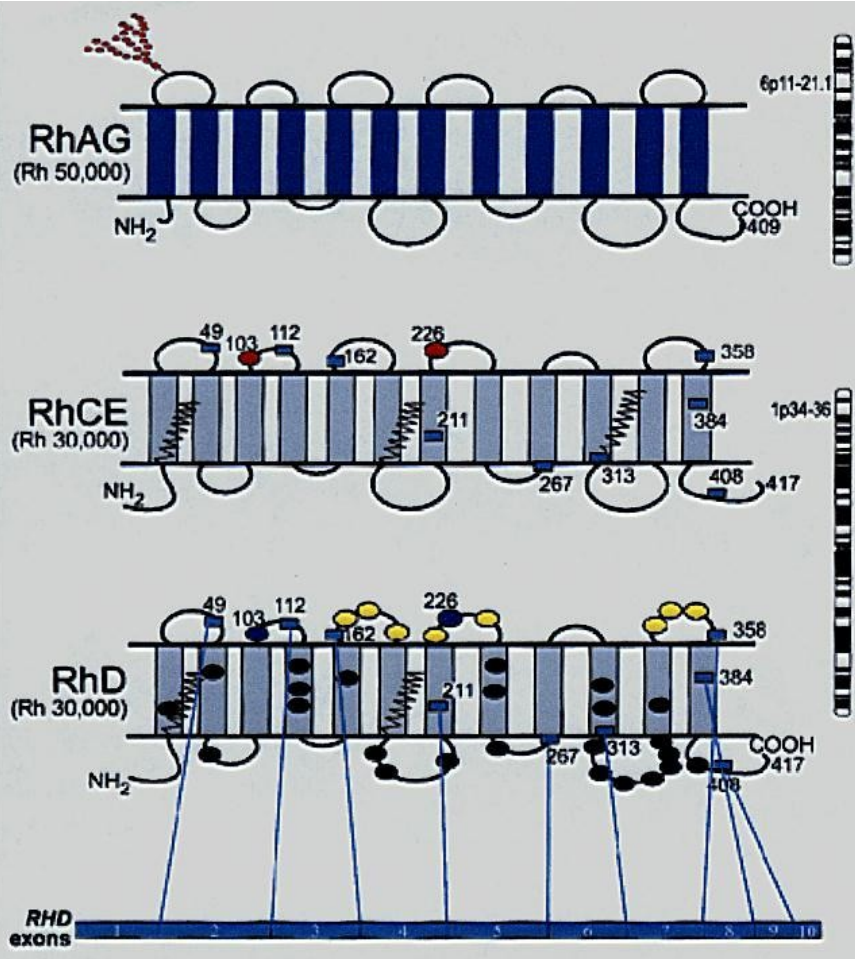
- Rh proteiny (antigeny) procházejí 12x membránou, každý vytváří 6 extracelulárních loopů, na kterých jsou umístěné Rh antigeny
- substituce několika aminokyselin Rh proteinu vzájemně odlišuje RhD a RhCcEe antigeny



# Rh antigeny

- antigeny D,C,c,E,e (Cw)
- výskyt dle typu populace (D+ cca u 85% Evropanů, 90% Afričanů, u 100% Asiatů)
- jsou podobné, rozdíl mezi RhD a RhCE proteinem 30-35 AMK
- vysoce imunogenní proteiny
- záleží na tvaru molekuly a na interakci mezi jednotlivými extracelulárními loopy
- několik desítek tisíc kopií/ery, závisí na genotypu
- epitop = charakteristické uspořádání AMK řetězce

Ostatní Rh antigeny: high nebo low frequency antigens



# Rh antigeny

- serologické rozeznání pomocí dg.sér anti-D,-C,-c,-E,-e
- zygocii D/D a D/d nelze serologicky odlišit (chybí anti-d)
- kombinace 3 párů alel Cc/Dd/Ee umožňuje vznik 8 haplotypů a 36 genotypů

Antigeny	Fenotyp	Genotyp
D+C+c-E-e+	DCe/DCe R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	DCe/DCe R <sub>1</sub> R <sub>1</sub> DCe/dCe R <sub>1</sub> r'
D+C-c+E+e+	DcE/dce R <sub>2</sub> r	DcE/dce R <sub>2</sub> r DcE/Dce R <sub>2</sub> R <sub>0</sub> Dce/dcE R <sub>0</sub> r''

Funkce Rh antigenů:

- udržení integrity membrány erys ( protein bandu 3)
- transport amoniaku
- kanál pro transport  $O_2/CO_2$

Tkáňová distribuce:

- erytroidní tkáň, ledviny, játra, kůže, mozek, testes

Asociace s nemocemi:

- hemolýzy - HON, HTR
- nemoc štěpu proti hostiteli - GVHD
- hemolytická anemie u Rh deficient.syndromu ( $Rh_{null}$ )

# Rh nomenklatura

- Písmenová: D,C,E,c,e, f,C<sup>w</sup>,C<sup>x</sup>,Hr<sub>0</sub>,Hr,Har,hr<sup>S</sup>...
- Fisherova + Wienerova: DCe = R<sub>1</sub>  
DcE = R<sub>2</sub>  
Dce = R<sub>0</sub>  
DCE = R<sub>z</sub>  
dce = r  
dCe = r'  
dcE = r''  
dCE = r<sup>Y</sup>

# Most Common RH Phenotypes

**Rh positive**

**DCe**

**DCce**

**Dce**

**DcEe**

**DcE**

**DCcEe**

**Rh negativ**

**ce**

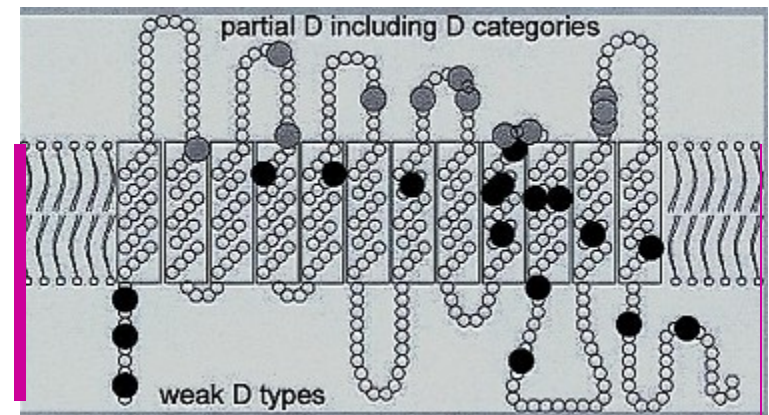


# Abnormální typy Rh antigenů

- u cca 1% všech RhD pozitivních osob
- D-- : chybí antigeny RhCcEe a zesiluje exprese RhD
- Rh<sub>null</sub>: chybí úplně všechny Rh antigeny
- Rh<sub>mod</sub>: změna exprese, zeslabení Rh antigenů
- **Variantní D antigeny:**
  - **Weak D**: kvantitativní změna antigenu
  - **Parciální D**: kvalitativní změna v mozaice antigenu

# Weak D: slabý antigen, D<sup>w</sup>

- původní terminologie „D<sup>u</sup>“
- téměř žádná změna AMK v extramembranozní části RhD proteinu, mutace postihují intramembranozní a intracelulární část proteinu
- porucha zakomponování Rh proteinu do tetrameru Rh komplexu
- nedochází k anti-D imunizaci



## Příčina D<sup>w</sup>: Dědičnost

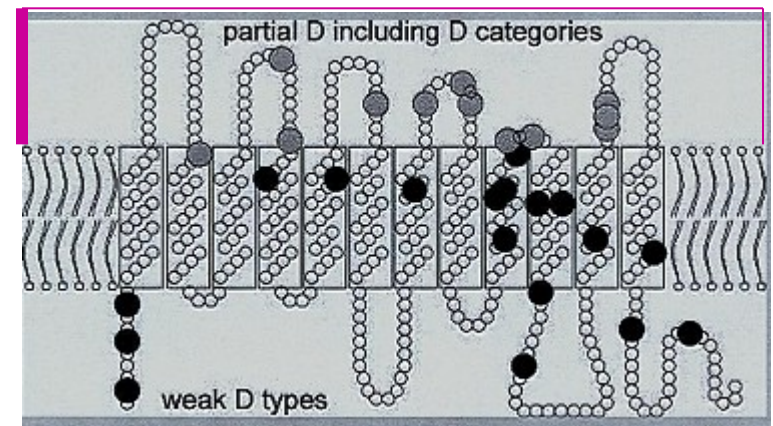
- zděděná zeslabená exprese D<sup>w</sup> antigenu při
  - kompletním D antigenem, ale jeho menším počtem na erys
- pouze slabé aglutinace nebo chybějící aglutinace v přímém aglutinačním testu
- silné aglutinace v NAT s AGH
- netvoří se anti-D, je možné bezpečně transfundovat D pozitivní krev

## Příčina $D^w$ : Efekt pozice

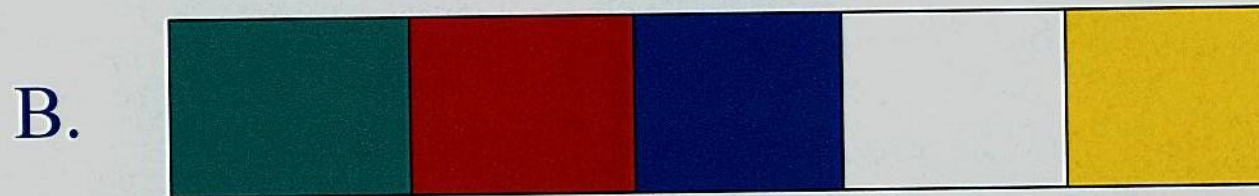
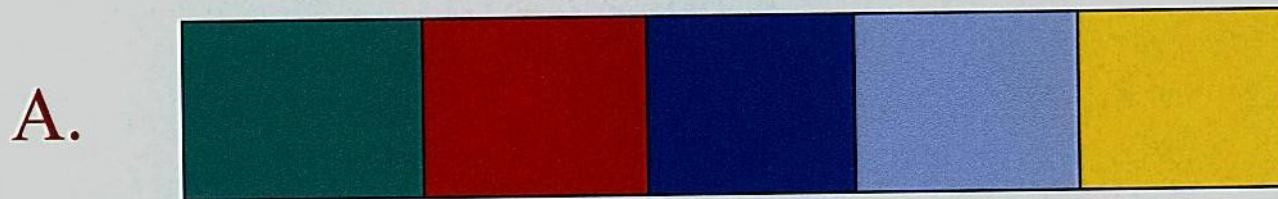
- interakce alely D a C u genotypu cDe/Cde
- C alela je v trans pozici k alele D
- netvoří se anti-D, je možné bezpečně trasfundovat D pozitivní krev

# Parciální D: varianty D, D<sup>var</sup>

- Chybí jedna nebo více obvyklých částí (epitopů) D antigenu
- Mutace , rekombinace RHD genu
- Změna se projeví v extramembranózní části RhD proteinu
  - některé epitopy zcela chybí
  - antigen je složený z jiných epitopů = **nový tvar proteinu**
- Problém: vznik alo-anti-D, která reaguje se všemi RhD+ kromě vlastních ery
- Problém: diagnostický + tvoří se alo-anti-D po transfuzi D+



**Partial D:** Multiple epitopes make up D antigen. Each color represents a different epitope of the D antigen.



Patient B lacks one D epitope.

The difference between **Patient A** and **Patient B** is a single epitope of the D antigen. The problem is that **Patient B** can make an antibody to **Patient A** even though both appear to have the entire D antigen present on their red blood cell's using routine anti-D typing reagents..

# Vyšetření RhD : Reagencie

- rutinní vyšetření D antigenu v rámci krevní skupiny
- dříve polyklonální protilátky, dnes monoklonální protilátky (dg.séra)
- výhody: silné reakce v přímém aglutinačním testu, nízký obsah proteinů - vhodné pro senzibilizované erys
- duplicitně provedené vyšetření dvěma odlišnými dg. séry (chybí přirozené protilátky)
- porovnávání shody výsledků u obou vyšetření
- validace testu - použití kontrolního séra (Ctl) + kontrola pozitivní (D+erys) a negativní (D- erys)

# Cíl vyšetření D antigenu:

Dárce krve/event. novorozenec:

- zachytit **všechny** typy D antigenu
- 2 různá séra pro aglutinační test (různé anti-Dep klony)
- **došetření slabých** antigenů v NAT

Příjemce/těhotná:

- ideálně: parciální D=RhD neg, weak D= RhD poz
- **nedetekovat DVI** variantu
- **nedošetřovat slabé** antigeny v NAT

Serologicky běžně nelze rozlišit Dw/v, molekulárně genetické metody (PCR).



## Falešně pozitivní výsledky:

- spontánní aglutinace vyšetřovaných erys se všemi dg. séry (oldiší Rh kontrola)
- aglutinace erys při obsahu chladových protilátek nebo paraproteinu ve vyšetřovaném vzorku (Rh kontrola, opakování vyšetření Rh po promytí erys)
- kontaminace diagnostika - bakterie, T, Tn aktivace erys
- laboratorní chyby

## Falešně negativní výsledky:

- selhání diagnostika (použití kontroly + a - )
- laboratorní chyby

# C,c,E,e antigeny

- produkty alely RHCE
- frekvence: C 68%, c 81%, E 29%, e 98%
- substituce AMK v RhCcEe proteinu vede ke vzniku slabých a variantních antigenů
- složené antigeny ce, Ce, CE, cE, antigen G
- antigen C<sup>w</sup>, C<sup>x</sup>, MAR

# Rh protilátky

- klinicky významné, imunní = vedou k destrukci erys
- IgG / lab. teplota 37°C/ nepřímá aglutinace
- neaktivují komplement, vedou k extravaskulární hemolýze
- Procházejí placentou
- HON, HTR
- anti-D, -E, -c, -C, -e, -Cw
- Rh autoprotiátky u AIHA
- zvýšená reaktivita v enzymovém testu, efekt dávky
- profylaktické použití anti-D u HON, klinické léčebné použití anti-D u ITP

# Ostatní krevní skupiny

- Ii
- Lewis
- Kell
- Kidd
- Duffy
- Lutheran
- MNSs
- P
- Ostatní s méně  
častými Abs  
(Dombrock, Diego,  
Colton,  
Chido/Rodgers,  
Gerbich, Cromer)
- HFA
- LFA

# Ii systém

- sacharidové struktury lineárně spojené
- antigen i je prekurzorem antigenu I
- fenotyp I dominuje u dospělých, i fenotyp u novorozenců
- od narození do 2 let věku se množství I antigenu zvyšuje
- antigeny jsou přítomné v sekretech, plazmě
- změny antigenu u akutních i chronických leukemií

## Funkce

- zajišťují připojení sacharidů k proteinům a lipidům buněčné membrány
- receptory a ligandy v adhesivních procesech

## Tkáňová distribuce

- všechny krevní buňky, sekrety, epitel, jiné tkáně (oční čočka)

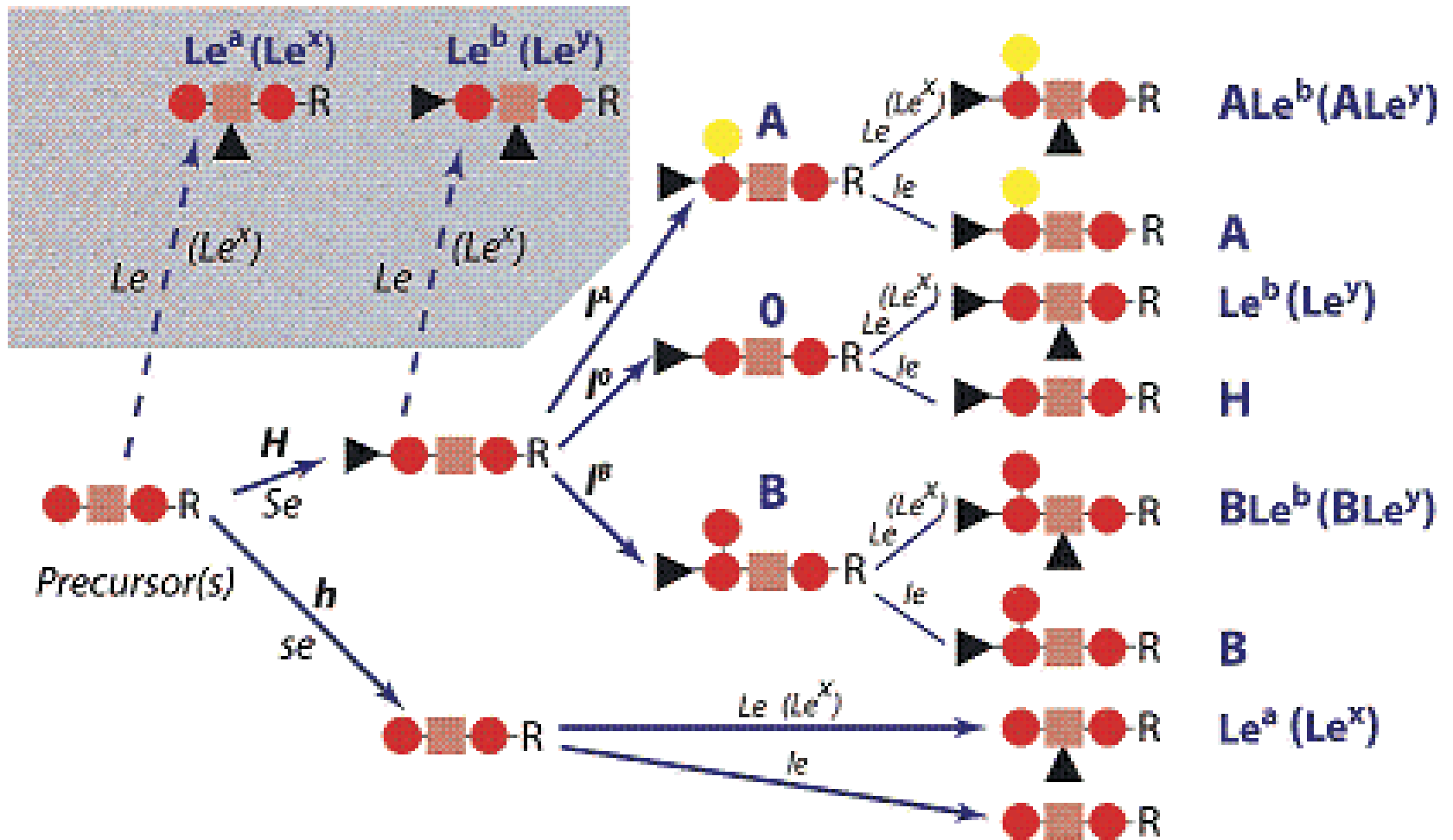
## Asociace s nemocemi

- anti-I u CAD (průkaz pomocí erys I-)
- zvýšená exprese i antigenu u thalasémie

# Lewis /Le

FUT3 (Lewis) FUT2 (Se)

- souvisí s AB0 a H/h systémem
- gen na 19. chromozomu
- addice specifických monosacharidů k prekurzorovému řetězci
- účast na syntéze antigenů  $Le^a$  a v přítomnosti genu Se také antigenu  $Le^b$
- syntéza neprobíhá v erytroidní tkáni, na erys se navazují z plazmy, jsou obsaženy v sekretech
- antigeny  $Le^a$ ,  $Le^b$ ,  $Le^X$  ( $Le^c$ ),  $Le^Y$  ( $Le^d$ )



- D-galactose
- N-acetyl-D-glucosamine
- N-acetyl-D-galactosamine

- ▶ L-fucose in  $\alpha$ 1-2 linkage
- ▲ L-fucose in  $\alpha$ 1-3 (or  $\alpha$ 1-4) linkage
- R** Remainder of the molecule



- Fenotypy

Le(a+b-)

Le(a-b+)

Le(a-b-)

Le(a+b+) ↓exprese H, nekompletní fukosylace: unikátní

- Funkce:

nejasné, nejsou patologické souvislosti, ligandy pro E-selektiny, adhesivní funkce

# Lewis protilátky

- přirozené protilátky, bez imunizačního podnětu
- anti-Le<sup>a</sup>, anti-Le<sup>b</sup>
- Časté protilátky
- IgM – lab. průkaz v chladových testech
- ne aktivní při 37°C ( někdy -Creaktivní, hemolýza)
- vzácně imunní: HON i HTR
- asociace s orgánovými transplantacemi

# Kell.

## Kel. Cellano

- Glykoproteinové antigeny, silné imunogeny
- Kell protein je připojený k membránovému proteinu XK
- Kell proteiny tvoří cca 25 antigenů
- Antitetické alely K2/K1, K4/K3, K7/K6, K11/K17
- Různá frekvence výskytu v populaci

### Funkce:

- Kell : aktivace bioaktivních peptidů /proteolýza
- XK: membránový transportní protein

### Asociace s nemocemi:

- absence XK (McLeod) u akantocytozy a svalové dystrofie s neurologickými defekty

# Kell protilátky

## Protilátky:

- známé od r.1949 při anemii novorozence
- imunní protilátky, IgG typ
- klinicky významné
- v etiologii HON (hlavně anemie, ne hemolýza), navíc suprese erythropoezy), HTR
- častá anti-K1, vzácně anti-K2, raritně anti-K<sub>u</sub>

# Kidd /Jk

- membránový glykoprotein
- produkt jednoho genu JK na 18 chromozomu
- alely JKA, JKB , ostatní jsou vzácné
- Jk(a+b-), Jk(a-b+), Jk(a+b+)

Funkce:

- transport urey
- udržení osmotické stability a deformovatelnosti ery

Tkáňová distribuce:

- erys, leukocyty, ledviny

# Kidd protilátky

- málo frekventované
- nebezpečné, podléhají rychlé fagocytoze - přehlédnutelné - rychlá sekundární anamnestická odpověď
- Imunní IgG typ, hemolyzující účinek při aktivaci komplementu
- efekt dávky u homozygotní exprese
- zesílené reakce v enzymových testech
- příčina HTR, vzácně u HON

# Duffy /Fy

- membránový glykoprotein
- Fy(a+b+), Fy(a-b+), Fy(a+b-)

## Funkce

- chemokinový receptor, receptor pro Plasmodium knowlesi
- protektivní fenotyp Fy(a-b-)
- úloha v zánětu a při malarické infekci

## Tkáňová distribuce

- erytroidní i nonerytroidní bb., epitel ledvin, endotel, plicní alveoly aj.

Asociace s nemocemi nejsou známe

# Duffy protilátky

Protilátky:

- méně časté
- imunní protilátky IgG
- HON vzácně, někdy HTR
- falešně negativní testy používající enzymy (destrukce Ag)



# Lutheran /Lu

- membránový GP
- přes 20 alel , většina vysokofrekventních
- po narození slabé Ag, postupně zesilují (nebývá HON)
- enzymy nepůsobí destrukci Ag

Funkce: buněčná adheze, erytropoeza

Tkáňová distribuce: epitel, endotel, erys (ne na lymfo, granulo, mono, trc)

Asociace s nemocemi: nejasná, bývá vyšší exprese Ag u malignit

# Lutheran protilátky

- málo časté
- většinou IgM, v chladových testech
- někdy IgG v testech při 37°C
- mohou vázat komplement
- často v kombinaci s HLA protilátkami
- efekt dávky u homozygotní exprese
- raritní anti-Lu<sup>3</sup> u null fenotypu

# MNS. Glykoforiny A,B,E

- GPA gen = MN skupina
- GPB gen = Ss skupina
- GPE u vzácných variantních alel
- membránové Ag, tvoří negativní povrchový náboj erys

Funkce:

- nejasná, absence nevede k fyziologickým abnormalitám
- receptor pro komplement ,cytokiny, bct, viry

Tkáňová exprese:

- pouze erys

Asociace s nemocemi: neznámá

# MNS protilátky

- většinou přirozené protilátky
- bez klinického významu
- efekt dávky u homozygotní exprese
- vzácně HON a HTR při aktivitě v NAT ( imunní protilátky anti-s,-S,-M)
- anti-N-like u dilazovaných pacientů
- raritní anti-U u jedinců S-s-

# P systém

- Globosidové antigeny P, P<sup>k</sup> a paraglobosid P<sub>1</sub>
- raritní fenotyp p

Funkce:

- v diferenciaci B lymfocytů
- adheze bb., P antigen je buněčný receptor pro bakterie - na erys pro parvovirus B19

Tkáňová exprese:

- erys a jiné krevní bb., endotel, svalové bb., GIT , tumory, bakterie

# P systém protilátky

- častá anti-P<sub>1</sub> jako přirozená chladová protilátka
- aktivace komplementu
- nebývá HON, HTR
- vzácné IgG
- anti-P, -P<sup>k</sup>, -p jsou vzácné
- anti-PP<sub>1</sub>P<sup>k</sup> u raritního fenotypu p
- anti-P jako IgG autoprotlátka u dětského typu AIHA (PCH) má charakter bifazického hemolyzinu
- v komplexu s jinými protilátkami (-IP<sub>1</sub>, -IP)

# T/T<sub>n</sub>

- antigenem je neúplně dostavěný polysacharid
  - za normálních okolností se tyto antigeny nevyskytují, za patologických situací umožňují polyaglutinabilitu různých krevních buněk (ery, trc, leu)
1. přechodná exprese T antigenu na ery u malignit, virových onemocnění (neuraminidázy uvolněné z mikrobů odstraňují kyselinu sialovou membrány)
  2. trvalé odhalení T antigenu u idiopatického T<sub>n</sub> syndromu, malignit (MDS, leukemie), autoimunních chorob
- pravidelná anti-T<sub>n</sub> protilátka v sérech zdravých lidí
  - odlišení typu T aktivace dle reaktivity s různými lektiny

# Chido/Rodgers

- Ag tvoří C4A (acid) a C4B (basic) 4.složky komplementu
- při aktivaci komplementu a jeho štěpení zůstane fragment C4d (tj.Ch/Rg) připojený na membránu ery
- přítomné v plazmě, odtud se navazují na erys

## Funkce proteinů

- patří ke klasické aktivaci C, pomáhají při interakci mezi Ag a Ab komplexem a jinými komponentami C



# Colton /Co

- 11 antigenů jednoho genu AQP1 (protein vodního kanálu)
- AQP1 a AQP3 exprimované na erys.

## Funkce

- Zajištění transportu molekul vody membránou erys podle osmotického gradientu

## Tkáňová distribuce

- většina tkání včetně erys (ledvinové tubuly, kapiláry, epitel oka, hepatální duktus aj.)
- Významné protilátky: HON, HTR

# Cromer /Cr

- součást DAF(CD55) = komplementregulační protein, tlumí aktivační kaskádu
- receptor pro adhezi některých mikroorganismů/ enterovirů

## Funkce

- regulace komplementu, chrání tkáň inhibicí C3 a C5 konvertázové aktivity při klasické a alternativní cestě

## Asociace s nemocemi

- nejsou pospané abnormality, pouze u null forem intestinální nemoci
- u PNH je deficientní DAF

# Diego /Di

- protein bandu 3
- exprimovaný v různých tkáních jako hlavní integrální protein membrány buňky
- čtvrtý loop z 12 nese AB0 epitopy
- absence bandu 3 je spojena se sferocytózou a hemolýzou

## Funkce

- udržuje strukturu a stabilitu buňky a její interakci s enzymy, Hb...
- účast při vzniku senescentních Ag na starých erys
- adheze parazitů (malárie) na erys
- zajištění flexibility a tvaru buňky, transportu iontů

## Distribuce ve tkáních

- erytroidní gen je na erytrocytech
- exprese v ledvinách, kostech

## Asociace s nemocemi

- v patogenezi ovalocytozy (Melanesie), kongenitální akantocytozy, hereditární sferocytozy

## Protilátky:

- imunní IgG
- hemolyzující účinek

# Dombrock /Do

- glykoproteinový Ag připojený k membráně erys GPI kotvou
- neznámá funkce
- tkáně: erytroidní, lymf.uzliny, testes, slezina
- asociace s nemocemi: ztráta Ag u PNH

## Protilátky:

- obvykle ve směsí jiných protilátek
- imunní IgG, neaktivují komplement

# Gerbich /Ge

- glykoproteiny membrány
- tři vysokoincidentní Ag, ale také Ge negativní fenotypy

## Funkce

- udržují integritu buňky, negativní povrchový náboj erys, participují při vstupu Plasmodia do erys

## Tkáňová distribuce

- erytroidní i nonerytroidní tkáně

## Asociace s nemocemi

- udržují tvar erys a zajišťují deformovatelnost erys, absence může vést k eliptocytoze nebo abnormálnímu tvaru erys

## Protilátky:

- imunní IgG
- vzácně HON, HTR
- autoprotilátky u AIHA, klinicky nevýznamné

# Ostatní skupiny

## Vysokofrekventní antigeny

- Vel, Lan, JMH, Sd<sup>a</sup>, At<sup>a</sup>
- Obtížně identifikovatelné / referenční pracoviště
- Téměř nelze najít kompatibilní krev
- Složitě potvrzení negativními fenotypy

## Nízkofrekventní antigeny

- Chr<sup>a</sup>, By, Bi, JONES, HJK, SARA
- Vzácně imunizace



# Registry dárců krve

Jsou:

- Národní registr dárců vzácných krevních skupin / Transnet
- Mezinárodní registry dárců vzácných krevních skupin
- Referenční laboratoře národní/mezinárodní

Cíl:

- Vyhledávání skupinově shodných dárců pro imunizované pacienty – zajištění substituce krve (mražené TU)
- Work shop

View Rare Blood Types  
Information

Blood Type	Monthly Donors	National Blood Bank	Frozen Blood Council/Europe
Oh	35	12	11
CDE/CDE	8	5	--
CdE/CdE	1	--	2
CwD-/CwD-	1	--	--
-D-/D-	86	--	--
Rhnull	9	--	5
Rh:-51	38	--	--
LW(a-b+)	45	--	11
LW(a-b-)	1	--	--
S-s-U-	328	37	21
S-s-U(+)	27	--	--
pp	74	2	38
Pk	11	5	3
Lu(a+b-)	323	32	49
Lu(a-b-)	151	37	13
Kp(a+b-)	145	37	39
Kp(a-b-)	2	--	--
Js(a+b-)	165	18	--
Ko	81	12	4
K:-11	2	--	--
Fy(a-b-)	563	69	75
Jk(a-b-)	91	19	3
Di(b-)	957	--	1
I-	93	12	--
Yt(a-)	230	17	107

CLB (Sanquin)



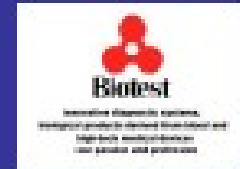
Amsterdam,  
Netherlands

Rotterdam,  
Netherlands

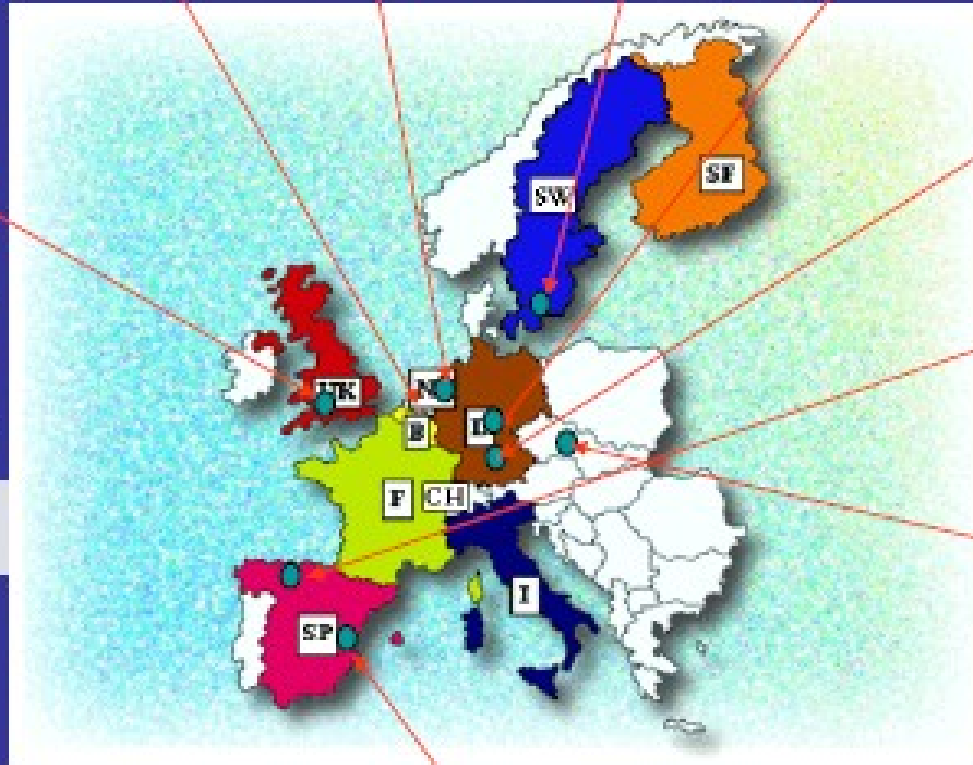


Lund, Sweden

Dreieich, Germany



Bristol, UK  
(UWE  
and BITS)



Ulm, Germany



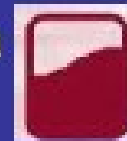
Derio, Spain



Prague,  
Czech Republic



Barcelona  
Spain



# Cave: Laboratorní průkaz

- **Antigenů** na vyšetřovaných erys **pomocí známých dg. sér**
- **Protilátek** ve vyšetřovaném séru **pomocí známých dg. Erys**
- **Průkaz** komplexu antigen+protilátka = **aglutinace**
  
- Zaškolený personál
- Standardní laboratorní postupy
- Postup dle správné laboratorní praxe